

Identifizierung und Quantifizierung von Verbindungen mit östrogenen Wirkung im Abwasser

Von der Fakultät Chemie
der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Peter Spengler
aus Pforzheim

Hauptberichter: Prof. Dr. rer. nat. Jörg W. Metzger

Mitberichter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Peter Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Mai 2001

Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und
Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart

2001

Die Arbeiten für die vorliegende Abhandlung wurden am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart durchgeführt.

Diese Arbeit wurde von mir selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Mittel durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von

Professor Dr. rer. nat. Jörg W. Metzger

in der Zeit vom Mai 1998 bis Mai 2001 am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart durchgeführt.

Teile der vorliegenden Arbeit sind veröffentlicht in:

Spengler P, Körner W, Metzger JW. 1999. Hardly degradable substances with estrogenic activity in effluents of municipal and industrial sewage treatment plants. *Vom Wasser* 92: 141-157.

Körner W, **Spengler P**, Bolz U, Hagenmaier H, Metzger JW. 1999. Monitoring of estrogenic substances in sewage plant effluents by biological and chemical analysis. *Organohalogen Compd* 42: 29-32.

Spengler P, Körner W, Metzger JW. 2001. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in South West Germany. Part I: Chemical analysis. *Environ Toxicol Chem* 20: in press.

Körner W, **Spengler P**, Metzger JW. 2001. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in South West Germany. Part II: Biological analysis. *Environ Toxicol Chem* 20: in press.

Danksagungen

Herrn Professor Dr. Jörg W. Metzger danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen.

Herrn Dr. Christoph Kempter danke ich ganz besonders für die sehr gute Einarbeitung, seine Ratschläge und die zahlreichen Anregungen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Wolfgang Körner von der Universität Tübingen danke ich sehr für die Durchführung und Auswertung des biologischen Wirkungstests und für die gute instituts- und universitätsübergreifende Zusammenarbeit.

Für die stets einwandfreie Zusammenarbeit im Labor und für die Aufarbeitung zahlreicher Proben danke ich vor allem Frau Cornelia Orth und Herrn Roland von der Recke.

Herrn Andreas Link danke ich für die hervorragenden Leistungen, die er im Rahmen seiner Diplomarbeit in die vorliegende Arbeit eingebracht hat.

Außerdem danke ich auch noch Frau Dr. Edda Möhle für die zahlreichen Hilfestellungen im Laufe der Arbeit und das stets gute Arbeitsklima.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Tanja Schultis für die im Rahmen ihrer Diplomarbeit erbrachten Leistungen, die zum Teil in die vorliegende Arbeit eingeflossen sind.

Dem Ministerium für Umwelt und Verkehr, Baden-Württemberg danke ich für die finanzielle Unterstützung und die sehr unkomplizierte Zusammenarbeit.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen, die hier nicht namentlich erwähnt sind, möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die stete Hilfsbereitschaft und die vielen anregenden Diskussionen bedanken.

Meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Literaturübersicht	1
1.1	Verbindungen mit hormoneller Wirkung - Definitionen	4
1.2	Estrogene und estrogenartig wirksame Substanzen	4
1.2.1	Natürliche Estrogene	7
1.2.2	Synthetische Estrogene	8
1.2.3	Xenoestrogene	9
1.2.4	Phyto- und Mykoestrogene	16
1.3	Wirkungsweise von Estrogenen und estrogenartig wirksamen Substanzen	18
1.4	Testverfahren zur Ermittlung der estrogenen Wirkung	22
1.4.1	<i>In vivo</i> -Verfahren	23
1.4.2	<i>In vitro</i> -Verfahren	26
1.4.3	Rezeptor-Bindungstests	28
1.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	30
2	Entwicklung eines Screening-Protokolls für estrogenartig wirksame Verbindungen im Abwasser	32
2.1	Auswahl der Komponenten für das Screening-Protokoll	32
2.2	In der Literatur beschriebene analytische Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung hormonell aktiver Verbindungen	37
2.2.1	Verfahren zur Bestimmung von Steroidhormonen	37
2.2.2	Verfahren zur Bestimmung von Alkylphenolpolyethoxylaten (APnEO) und ihren Abbauprodukten	38
2.2.3	Verfahren zur Bestimmung von Bisphenol A und Endosulfan	41
2.2.4	Verfahren zur Bestimmung von Phyto- und Mykoestrogenen	42
2.2.5	Verfahren zur Bestimmung von Phthalaten	43
2.2.6	Multianalyt-Verfahren	43
2.3	Entwicklung und Optimierung des eingesetzten GC-MS-Analyseverfahrens	44
2.3.1	Material und Methoden	45
2.3.2	Experimentelle Durchführung	48
2.4	Biologische Analytik	53
2.4.1	Beschreibung des Testsystems (E-Screen-Assay)	53
2.4.2	Quantitative Auswertung	54
2.5	Auswahl der beprobten Kläranlagen	57
2.6	Ergebnisse der GC-MS-Analyse	59
2.6.1	Identifizierung und Quantifizierung der Screening-Komponenten	59
2.6.2	Quantitative Ergebnisse aus der GC-MS-Analyse	67
2.6.3	Diskussion der Ergebnisse aus der GC-MS-Analyse	75

2.6.4	Weitergehende Untersuchungen einzelner Kläranlagen	77
2.6.5	Bestimmung zusätzlicher Verbindungen bei den Wiederholungs- beprobungen	80
2.6.6	Übertragung des Analyseverfahrens auf eine Flusswasserprobe	81
2.6.7	Übertragung des Analyseverfahrens auf eine Abwasserprobe aus einem Regenüberlaufbecken	83
2.7	Ergebnisse und Diskussion der biologischen Untersuchungen	87
2.7.1	Untersuchung von Einzelsubstanzen	87
2.7.2	Untersuchung von Kläranlagenabläufen	90
2.7.3	Einfluss der Abwasserreinigungstechnik auf die estrogenen Aktivität in Kläranlagenabläufen	92
2.8	Vergleich der Ergebnisse von GC-MS- und biologischer Analytik	95
2.8.1	Interpretation der Ergebnisse	97
2.8.2	Öko- und humantoxikologische Relevanz	99
2.8.3	Zusammenfassende Wertung und Interpretation	102
3	Fraktionierung einer Kläranlagenablaufprobe zur chemischen und biologischen Analyse	105
3.1	Entwicklung und Optimierung einer HPLC-Methode zur Fraktionierung von Abwasser aus Kläranlagenabläufen	105
3.1.1	Material und Geräte	106
3.1.2	Experimentelle Methodenentwicklung im analytischen Maßstab	106
3.1.3	Übertragung der optimierten analytischen Methode auf den präparativen Maßstab	110
3.1.4	Quantitative Fraktionierung des Abwassers aus einem Kläranlagenablauf	113
3.2	Ergebnisse der GC-MS-Analyse für die einzelnen Fraktionen	113
3.3	Korrelation der Ergebnisse aus GC-MS-Analyse und E-Screen-Assay	117
3.4	Zusammenfassung	119
4	Eliminationsverhalten estrogenartig wirksamer Verbindungen in Kläranlagen am Beispiel der 4-Nonylphenolpolyethoxylate	120
4.1	Herstellung und Anwendung	120
4.2	Eigenschaften der Nonylphenolpolyethoxylate (NPnEO) und einiger wichtiger Eliminationsprodukte	121
4.2.1	Bioakkumulation und akute Toxizität	122
4.2.2	Estrogene Wirkung	124
4.2.3	Löslichkeit	125
4.3	Abbauwege der NPnEO	126
4.3.1	Mechanismus des Abbaus	126
4.3.2	Elimination in Kläranlagen	128
4.3.3	Abbau nach der OECD-Methode und Untersuchungen zum biologischen Sauerstoffbedarf (BSB)	129

4.4	Material und Methoden	130
4.4.1	Materialien und Geräte	130
4.4.2	Versuchsaufbau für die Batchversuche	131
4.4.3	Versuchsbedingungen für die Batchversuche	132
4.5	Durchführung und Ergebnisse	134
4.5.1	Probennahme und HPLC-Methodenentwicklung	134
4.5.2	Ionisierung und Detektion über MS/MS	136
4.5.3	Quantifizierung	140
4.5.4	Vorversuche zu den Eliminationsversuchen	143
4.5.5	Eliminationsversuche in belebtem Schlamm	147
4.6	Zusammenfassende Wertung	153
5	Zusammenfassung	155
6	Summary	159
7	Literatur	163

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AD	Außendurchmesser
amu	<i>atomic mass units</i>
AP	Alkylphenol
AP(n)EC	Alkylphenolpolyethoxycarbonsäuren
AP(n)EO	Alkylphenolpolyethoxylate
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i>
APF	Analytpeakflächen
AS	Aminosäuren
B	Belebung
BBP	Benzyl-n-butylphthalat
BG	Bestimmungsgrenze
BPA	Bisphenol A [2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)propan]
BS	Belebter Schlamm
BSB	Biologischer Sauerstoffbedarf
BSB ₅	Biologischer Sauerstoffbedarf innerhalb von 5 Tagen
BSB ₁₀	Biologischer Sauerstoffbedarf innerhalb von 10 Tagen
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CD-FCS	Cyclodextran gestripptes fetales Kälberserum
CNPnEC	Carboxynonylphenolpolyethoxycarbonsäuren
CNP1EC	Carboxynonylphenoxyessigsäure
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
D	Denitrifikation
DAD	Dioden-Array-Detektor
DBP	Di-n-butylphthalat
DDD	Dichlordiphenyldichlorethan
DDE	Dichlordiphenyldichlorethylen
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DEHP	Di-(2-ethylhexyl)phthalat
DES	Diethylstilbestrol
DME	1,2-Dimethoxyethan (Dimethylglycol)
DMPP	Dimethylpropylphthalat
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonucleinsäure
E	Entfärbung
E1	Estron
E2	17 β -Estradiol
EC	Effektkonzentration
EC ₁₀	Konzentration, die bei 10 % der Testtiere einen Effekt hervorruft
EC ₅₀	Konzentration, die bei 50 % der Testtiere einen Effekt hervorruft (halbmaximal wirksame Konzentration)
EE2	17 α -Ethinylestradiol
EEF	17 β -Estradiol-Äquivalenzfaktor (= relative estrogene Potenz)
EEQ	17 β -Estradiol-Äquivalentkonzentration
EI	Elektronenstoss-Ionisation
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ELRA	<i>Enzyme-Linked Receptor Assay</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
ER	Estrogenrezeptor
ESI	Elektrospray-Ionisation
EW	Einwohnerwerte
F	Aktivkohlefiltration
GC	Gaschromatographie
GC-MS	gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-MS/MS	gekoppelte Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
HAA	<i>Hormonally Active Agent</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRE	<i>Hormone Response Element</i>
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
KA	Kläranlage
KN	Kläranlagennachbarschaft
(HP)LC-MS	gekoppelte Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
(HP)LC-MS/MS	gekoppelte Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
ID	Innendurchmesser
LC ₅₀	Konzentration, die sich für 50 % der Testtiere tödlich auswirkt

LD ₅₀	Dosis, die sich für 50 % der Testtiere tödlich auswirkt
LOED	<i>Lowest Observed Effect Dose</i>
log P _{OW}	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
MDDE	1,1-Dichlor-2,2-bis(4-methoxyphenyl)ethen
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
Ms	Mikrosieb
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MSD	Massenselektiver Detektor
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoracetamid
MW	Mittelwert
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
N	Nitrifikation
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NG	Nachweisgrenze
NH ₄ OH	Ammoniumhydroxid
NIS	Nichtionische Tenside
(4-)NP	4-Nonylphenol (Isomerenmischung)
(4-)n-NP	4-n-Nonylphenol
(4-)NP1EC	4-Nonylphenoxyessigsäure (Isomerenmischung)
(4-)NP2EC	4-Nonylphenoldiethoxycarbonsäure (Isomerenmischung)
(4-)NP1EO	4-Nonylphenolmonoethoxylat (Isomerenmischung)
(4-)NP2EO	4-Nonylphenoldiethoxylat (Isomerenmischung)
(4-)n-NP2EO	4-n-Nonylphenoldiethoxylat
(4-)NP10EO	4-Nonylphenoldecaethoxylat (Isomerenmischung)
NP(n)EC	Nonylphenolpolyethoxycarbonsäuren
NP(n)EO	Nonylphenolpolyethoxylate
(4- <i>tert</i>)-OP	4- <i>tert</i> -Oktylphenol
(4-)n-OP	4-n-Oktylphenol
OP(n)EO	Oktylphenolpolyethoxylate
P	Phosphateliminierung
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBSM	Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmittel
PCB	Polychlorierte Biphenyle

PE	Proliferationseffekt
PEC	Vorhergesagte Umweltkonzentration (<i>Predicted Environmental Concentration</i>)
PVC	Polyvinylchlorid
PVE	<i>Persistent Vaginal Estrus</i>
R ²	Bestimmtheitsmaß
RNA	Ribonucleinsäure
RP	<i>Reversed Phase</i> (Umkehrphase)
RPE	<i>Relative Proliferative Effect</i> (= relative estrogenische Wirkungsstärke)
SD	Standardabweichung
SIM	<i>Selectd Ion Monitoring</i>
SPE	Festphasenextraktion
SRB	Sulforhodamin B
T	Tropfkörper
TBT	Tributylzinn
TEF	Toxizitätsäquivalenzfaktor
TEQ	Toxizitätsäquivalente
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Total-Ionenstrom
TMCS	Trimethylchlorsilan
TSB	Theoretischer Sauerstoffbedarf
UV	Ultraviolett
YES-Assay	<i>Yeast-Estrogen Screen Assay</i> (Hefezellassay)
Zz	Zulaufzusammensetzung

Anmerkung

In der vorliegenden Arbeit wird in Substanzklassen- und Verbindungsnamen wie „Östrogene“, „Östradiol“, „Östron“, etc. „E“ statt „Ö“ verwendet. Diese Schreibweise wird auch in Römpps Chemie Lexikon benutzt. Aus Gründen der Einheitlichkeit wird daher auch in Ausdrücken wie „östrogenartig wirksam“, „östrogene Wirkung“, etc. kein Umlaut verwendet.

1 Einleitung und Literaturübersicht

Ein seit längerem existentes Umweltproblem wird in seiner Tragweite erst seit den 90er Jahren deutlich: In die Umwelt eingebrachte natürliche und synthetische Substanzen vermögen das hormonelle (endokrine) Gleichgewicht von Organismen empfindlich zu stören. Die Belastung der Umwelt mit hormonell aktiven Stoffen ist erst seit einigen Jahren in den Blickpunkt des Interesses von Wissenschaft und Öffentlichkeit gerückt; über erste Untersuchungen zu dieser Problematik wurde aber bereits in den 50er Jahren berichtet. Die in Theo Colborns viel beachtetem Buch „Die bedrohte Zukunft“ („*Our stolen future*“) [1] zusammengetragenen Beispiele zeigen sehr anschaulich, welche Folgen Stoffe mit einem hormonellen Wirkungsprofil in der Umwelt hervorrufen können. Diese reichen von Verweiblichungsphänomenen über Fortpflanzungsstörungen bis zu schweren Missbildungen und dem Aussterben ganzer Tierpopulationen [1].

Bei Möwen in Kalifornien und im Gebiet um die großen Seen sowie beim Weisskopfadler an der amerikanischen Ostküste wurden Störungen der Reproduktionsfähigkeit beobachtet. Neben einer Verdünnung der Eischalen und Verhaltensänderungen wurden vermehrt Wachstumsveränderungen und zum Teil Missbildungen festgestellt bis hin zur Feminisierung männlicher Vögel. Diese Effekte wurden mittlerweile auf die Verschmutzung der Gewässer mit DDT, PCBs und Dioxinen zurückgeführt, welche die Vögel über ihre Beutetiere, die Fische, aufgenommen hatten [2]. Auch die Dezimierung einer Alligatorpopulation im Apopka-See in Florida konnte ursächlich mit dem durch einen Chemieunfall in das Gewässer gelangten DDT und dessen Metaboliten verknüpft werden. Neben der akuten toxischen Wirkung wurde dabei auch eine Verkümmern der Reproduktionsorgane junger Alligatorenmännchen festgestellt, die eindeutig auf die Einwirkung hormonell aktiver Stoffe zurückzuführen ist und zur Zeugungsunfähigkeit bzw. Sterilität dieser Männchen führt [3-5].

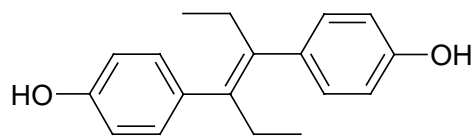
Die Problematik ist aber keineswegs auf die Chemikalie DDT beschränkt, wie durch zahlreiche Untersuchungen gesichert ist. So kommt es, in einem sehr gut belegten Fall hormoneller Auswirkungen in der Umwelt, durch das in Schiffsanstrichen als Bewuchsschutz (Antifouling-Mittel) verwendete Tributylzinn (TBT) zur Vermännlichung weiblicher Meeresschnecken. Das bereits in Konzentrationen ab 1 ng / L wirksame TBT führte entlang von stark benutzten Schifffahrtsrouten zum Aussterben ganzer Schneckenpopulationen [6]. Ein weiteres Beispiel für hormonelle Wirkungen ist der Nerz, bei dem Störungen in der Fortpflanzungsfähigkeit durch PCB-Belastungen ausgelöst wer-

den [7]. Auch natürlich vorkommende Isoflavone zeigen hormonelle Wirkungen selbst beim Menschen. Nach einer Untersuchung von Cassidy *et al.* führt die Einnahme von Isoflavonen bei Frauen vor der Menopause zu einer signifikanten Verlängerung des Menstruationszyklus, bei Frauen nach der Menopause kommt es zu zytologischen Veränderungen des Vaginalepithels [8].

In letzter Zeit wurden zahlreiche Fischarten intensiver untersucht. Junge männliche Regenbogenforellen, die in England unterhalb von Kläranlagen gehalten wurden, begannen Vitellogenin zu bilden, den Vorläufer eines Dotterproteins, das natürlicherweise nur in Weibchen vorkommt. Gleichzeitig wurde ein verlangsamtes Wachstum der Hoden festgestellt. Die Produktion von Vitellogenin wird beim Männchen durch Estrogene induziert. Als Ursache für die hormonelle Wirkung der Kläranlagenabläufe wurden synthetische Estrogene und Alkylphenole vermutet [9]. Untersuchungen an weiteren Flüssen ergaben darüber hinaus, dass der Vitellogeninpegel direkt mit der Entfernung des Lebensraums der Tiere zum Kläranlagenablauf korreliert. In Flüssen mit guter Wasserqualität sinkt die hormonelle Wirkung bereits nach wenigen hundert Metern unterhalb der Kläranlage deutlich ab, bei stark belasteten Flüssen bleibt sie über mehrere Kilometer erhalten [10]. Auch bei einer weiteren Fischart, den Rotaugen, konnten hormonelle Auswirkungen festgestellt werden. Abgesehen von einer hohen Inzidenz von Intersex bei männlichen Tieren wurde in den Gonaden weibliches Ovargewebe nachgewiesen. Der Vergleich von Fischen aus Fließstrecken ober- und unterhalb von Kläranlagen zeigt deutlich den Einfluss der Kläranlagenabläufe [11]. Die Konzentrationen hormoneller Wirkstoffe in geklärtem Abwasser liegen in einem Bereich, der in männlichen Fischen eine Induktion der Vitellogeninproduktion bewirkt [12,13]. Veränderungen in der Geschlechtsentwicklung von Fischen wurden auch in Flüssen unterhalb von Zellulosefabriken festgestellt. Aus Kanada wird über eine Reduktion der Testosteronkonzentration und eine verlangsamte Gonadenentwicklung bei Männchen berichtet, die mit einer reduzierten Entwicklung der sekundären Geschlechtsmerkmale verbunden ist [14,15].

Aufgrund dieser eindeutigen Befunde in der Tierwelt wurde auch die in den letzten Jahrzehnten gestiegene Häufigkeit der Krebserkrankungen von Brust, Endometrium, Prostata und Hoden beim Menschen auf Umweltchemikalien mit hormoneller Wirkung zurückgeführt [16-18]. Störungen der Entwicklung und Funktion des männlichen Reproduktionssystems wie die Zunahme von Kryptorchismus (Hodenhochstand) und Hypospadie (angeborene Fehlbildungen der Harnröhre) sowie die Abnahme der Sper-

mienproduktion werden gleichfalls in diesem Zusammenhang diskutiert [18-21]. Die kausale Verknüpfung zwischen Umweltchemikalien mit hormoneller Wirkung und Krebserkrankungen bzw. Fertilitätsstörungen beim Menschen ist wissenschaftlich allerdings umstritten. Wissenschaftlich sehr gut belegt ist dagegen die negative hormonelle Auswirkung des synthetischen Estrogens Diethylstilbestrol (DES), das bis in die 70er Jahre schwangeren Frauen zur Verhütung von drohenden Früh- und Fehlgeburten verschrieben wurde. Es führt bei weiblichen und männlichen Nachkommen zu schwerwiegenden Missbildungen im Genitaltrakt. Bei weiblichen Nachkommen treten zudem vermehrt Fälle einer speziellen Krebsform (Adenokarzinom der Vagina) auf [22]. Auch wenn es sich bei DES nicht um eine über die Umwelt aufgenommene Chemikalie handelt, sondern um eine gerade wegen ihrer hormonellen Wirkung gezielt eingesetzte Verbindung, zeigt sich hier sehr deutlich, dass hormonelle (Neben-)Wirkungen teilweise mit Langzeiteffekten verbunden sind und so ein nur schwer abschätzbares Risiko darstellen.



Diethylstilbestrol (DES)

Diese Aufzählung hormoneller Auswirkungen ließe sich aus der wissenschaftlichen Literatur beliebig erweitern. Auch die in dem Buch von Colborn aufgeführten Beispiele für Auswirkungen in der Umwelt, die mit Belastungen des Hormonhaushalts in Verbindung gebracht werden, geben nur einen kleinen Einblick in diese sehr komplexen Zusammenhänge. Die Sensibilisierung von Wissenschaft und Öffentlichkeit gegenüber dieser Problematik hat aber dazu geführt, dass hormonell aktive Verbindungen hinsichtlich ihres Auftretens in der aquatischen Umwelt und den damit verbundenen Auswirkungen auf Organismen in den letzten Jahren zunehmend untersucht wurden [23-64]. Schlagzeilen wie „Tote Hose durch Umweltgifte“, „Pille im Brunnen“ [65] oder „Der Fluch der Hormone“ (Stern 4/97) tragen zwar dazu bei, dass die weltweiten Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet zunehmen, führen aber zugleich zu einer sehr einseitigen Betrachtung der Thematik. Unter wissenschaftlichen Aspekten ist vor allem darauf zu achten, dass auch gesicherte Befunde nicht überinterpretiert werden.

1.1 Verbindungen mit hormoneller Wirkung – Definitionen

Verbindungen mit hormoneller Wirkung wurden und werden zur Zeit noch als endokrine Disruptoren (engl.: *endocrine disruptors*) bezeichnet, da sie in das endokrine (hormonelle) System eingreifen. Obwohl bislang mehr als hundert solcher Substanzen bekannt sind [65], gibt es keine allgemein anerkannte Definition für einen *endocrine disruptor*. Auf dem *European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife* (Weybridge, UK, 1996) wurde die sogenannte „Weybridge-Definition“ formuliert:

“An endocrine disruptor is an exogenous substance that causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, secondary (consequent) to changes in endocrine functions.” [22]

Eine weitere Definition wurde 1997 von der amerikanischen Umweltbehörde EPA (*Environmental Protection Agency*) eingeführt:

“An environmental endocrine disruptor is defined as an exogenous agent that interferes with the synthesis, secretion, transport, binding, action or elimination of natural hormones in the body that are responsible for the maintenance of homeostasis, reproduction, development and/or behavior.” [66]

Diese Definition spiegelt wesentlich besser als die Weybridge-Formulierung den aktuellen Stand der Wissenschaft wieder. So bezeichnet man als endokrine Disruptoren inzwischen Substanzen, die in den Hormonhaushalt von Lebewesen eingreifen, ohne dabei bereits eine negative Auswirkung vorauszusetzen. Da der Begriff „Disruptor“ im Sprachgebrauch aber dennoch eindeutig negativ belegt ist, wird in neuester Zeit immer häufiger der allgemeiner gefasste Begriff „hormonell aktive Substanz“ (*Hormonally Active Agent*, HAA) gebraucht, der auch im Rahmen dieser Arbeit in der Regel verwendet wurde.

1.2 Estrogene und estrogenartig wirksame Substanzen

Endokrin wirkende Hormone sind Signalstoffe, die in endokrinen Drüsen gebildet werden, über die Blutbahn an ihren Wirkungsort gelangen und dort bestimmte physiologische und biochemische Regulationsfunktionen ausüben. Die mehr als 100 Hormone im menschlichen Organismus lassen sich in lipophile und hydrophile Hormone ein-

teilen. Letztere leiten sich von Aminosäuren (AS) wie Histamin ab oder sind als Peptide oder Proteine aus AS aufgebaut wie beispielsweise Insulin. Zu den lipophilen Hormonen zählen neben der Retinsäure, den Eicosanoiden und dem Thyroxin vor allem die Steroidhormone, z.B. die Estrogene [67]. Deren Biosynthese aus dem Cholesterin verläuft über zahlreiche enzymatisch katalysierte Reaktionen (Abb. 1) [68]; im letzten Schritt, der Umwandlung vom Androgen (z.B. Testosteron) zum Estrogen (z.B. Estradiol) findet eine durch die Aromatase katalysierte Aromatisierung des Moleküls unter Abspaltung einer Methylgruppe statt.

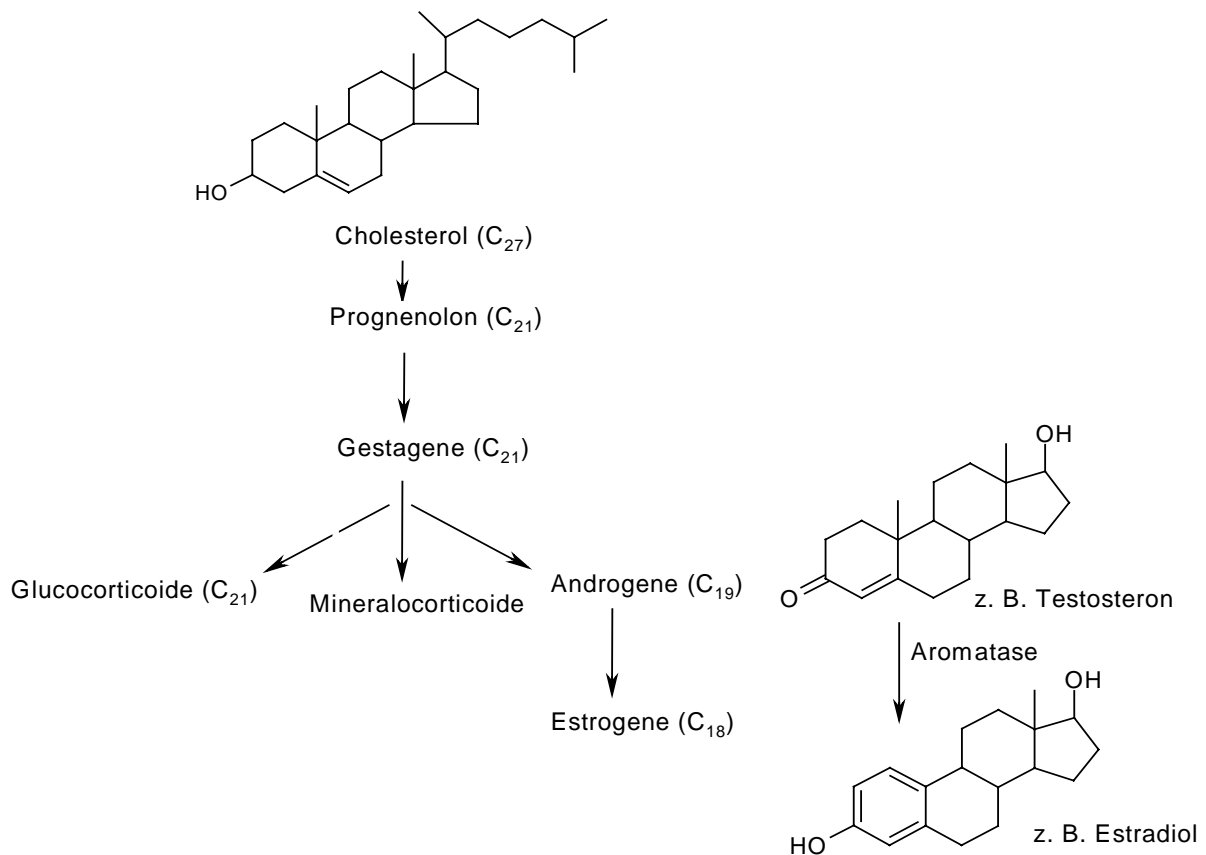
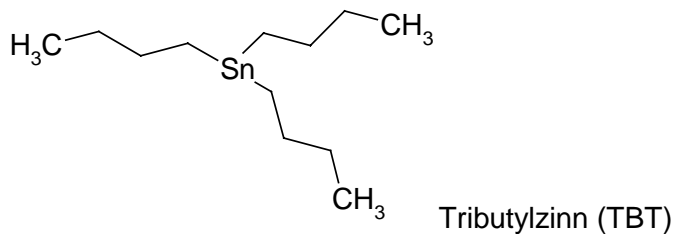


Abbildung 1: Cholesterin als Vorstufe der Steroidhormone [68].

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit beschränken sich auf Estrogene und estrogenartig wirksame Substanzen, da deren Vorkommen und Wirkpotential in der Umwelt durch zahlreiche Untersuchungen nachgewiesen ist. Vor allem die eigentlichen Estrogene haben bereits in extrem geringen Konzentrationen eine starke estrogenartige Wirkung (s. Kapitel 1.3); bei den übrigen estrogenartig wirksamen Verbindungen sind für eine estrogenartige Wirkung deutlich höhere Konzentrationen erforderlich.

Demgegenüber liegen über das Auftreten von androgenartig wirksamen Verbindungen in der Umwelt noch keine gesicherten Erkenntnisse vor, ausgenommen den in jüngster Zeit untersuchten organischen Zinnverbindungen wie Tributylzinn (TBT) [69].



Die eigentlichen Estrogene (Follikelhormone) gehören zu den Steroidhormonen; sie besitzen eine gemeinsame chemische Grundstruktur (Abb. 2) und werden beim Menschen in der Plazenta sowie in geringen Mengen in Nebennieren und Hoden gebildet. Als primäre weibliche Geschlechtshormone sind sie für die Ausbildung der weiblichen Geschlechtsmerkmale verantwortlich; sie kommen jedoch auch beim Mann vor und können an der Entwicklung bestimmter Formen von Krebs, z.B. Brustkrebs, beteiligt sein [70]. Für die Wirkung eines Hormons bzw. eines hormonell aktiven Stoffes kann der Zeitpunkt der Einwirkung entscheidend sein. Bei Wirbeltieren, wo das Geschlecht durch ein Geschlechtschromosom festgelegt ist, wird während der frühen Entwicklungsphase die Entwicklung der Geschlechtsorgane und spezifischer Zentren im Gehirn durch (Geschlechts-)Hormone gesteuert. Eine Störung dieser hochsensiblen Phase durch estrogenartig wirksame Stoffe kann daher zu bleibenden Defekten und Funktionsstörungen der Geschlechtsorgane führen bis hin zu einer Störung der Geschlechtsdetermination. Im adulten Organismus stimulieren oder hemmen die Hormone Organfunktionen wie etwa die Regulation der Spermienbildung. Diese Effekte sind aber reversibel und klingen unterhalb einer bestimmten Grenzkonzentration ab [71].

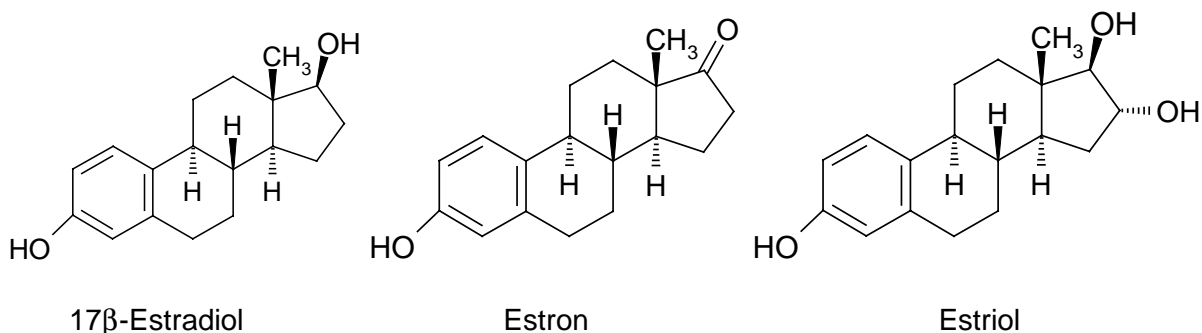


Abbildung 2: Wichtige natürliche Estrogene.

In der Umwelt finden sich vier Hauptgruppen von Estrogenen und estrogenartig wirksamen Substanzen: Die *natürlichen* und die *synthetischen Estrogene*, zahlreiche weitere anthropogene Chemikalien (*Xenoestrogene*) und Stoffe pflanzlicher Herkunft (*Phyto- und Mykoestrogene*). Die natürlichen und synthetischen Estrogene verursachen wegen ihrer hohen estrogenen Wirksamkeit (s. Kapitel 1.3) im allgemeinen den größten Teil der estrogenen Wirkung in der Umwelt. Daneben tragen aber auch Phytoestrogene und vor allem viele Xenoestrogene trotz ihrer geringeren estrogenen Potenz wegen der oftmals um mehrere Größenordnungen höheren Umweltkonzentration zu den estrogenen Effekten in der aquatischen Umwelt bei [25,36,40,46,50,51,54,60-62,72-76]. In diesem Zusammenhang stellt auch die zur Zeit noch nicht völlig bewiesene Bioakkumulation einzelner Verbindungen und ihre Persistenz in der Umwelt aufgrund schlechter biologischer Abbaubarkeit ein nicht zu unterschätzendes Gefahrenpotential dar [62,72,77-87]. Besonders juvenile Organismen bauen diese Verbindungen teilweise schlecht ab, sodass es zu einer Akkumulation in solchen nicht vollständig entwickelten und insofern besonders anfälligen Lebewesen kommen kann [77,88].

Da zur Zeit mehr und mehr Substanzen auf ihre estrogenen Wirkung getestet werden (s. Kapitel 1.4), wird für immer weitere Verbindungen ein estrogenes Wirkpotential festgestellt, das bei natürlichen und synthetischen Estrogenen selbstverständlich bzw. beabsichtigt ist, bei anderen Substanzen jedoch oft unerwartet und lange nach Inverkehrbringen dieser Substanzen zu Tage tritt. Die im Folgenden aufgeführte Auswahl an Substanzen zeigt, dass eine estrogenen Wirkung für die unterschiedlichsten Stoffklassen nachgewiesen ist.

1.2.1 Natürliche Estrogene

Die natürlichen Estrogene, vor allem 17β -Estradiol und Estron (s. Abb. 2), werden hauptsächlich in den Follikeln des Eierstocks gebildet und können im Organismus durch Oxidations- bzw. Reduktionsprozesse ineinander umgewandelt werden. Die tägliche Ausscheidung von Estrogenen (über die Niere im Urin) liegt bei der Frau je nach Zyklusphase bei 25 bis 100 μg ; gegen Ende einer Schwangerschaft kann dieser Wert auf bis zu 30 mg pro Tag ansteigen [89]. Die Ausscheidung der natürlichen Estrogene erfolgt größtenteils in Form der weitgehend inaktiven Konjugate (Glucuronide, Sulfate; s. Abb. 3). Diese werden zum Teil schon im Abwasserkanal, vor allem aber in den Kläranlagen durch mikrobielle Aktivität dekonjugiert, sodass spätestens im Kläranla-

genablauf ein Teil der Estrogene wieder in seiner ursprünglichen aktiven Form vorliegt [90]. Teilweise wird 17β -Estradiol auch vor der Veresterung mit Glucuron- oder Schwefelsäure zu Estron, Estriol oder 2-Hydroxyestron metabolisiert; diese Metabolite werden ebenfalls als Glucuronide bzw. Sulfate ausgeschieden (Abb. 3). Weder konjugierte noch freie Estrogene werden in Kläranlagen vollständig eliminiert und gelangen somit zumindest teilweise in die Oberflächengewässer [89,91].

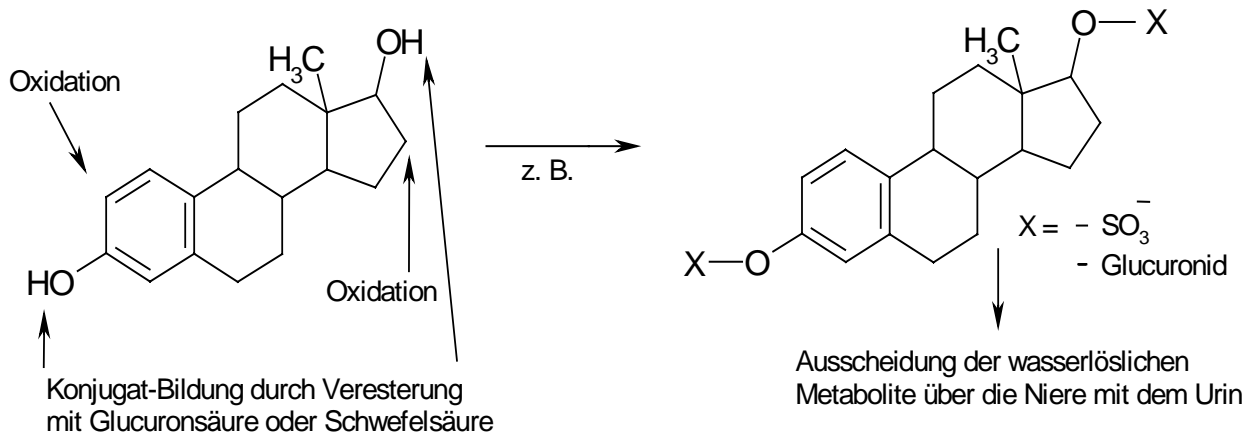


Abbildung 3: Metabolisierung von natürlichen Estrogenen am Beispiel von 17β -Estradiol durch Konjugatbildung zur Steigerung der Wasserlöslichkeit und damit der Ausscheidungsfähigkeit.

1.2.2 Synthetische Estrogene

Synthetische Estrogene, die als Wirksubstanzen in Kontrazeptiva (Mittel zur Empfängnisverhütung) enthalten sind, besitzen wie die natürlichen Estrogene eine steroidale Struktur (Abb. 4).

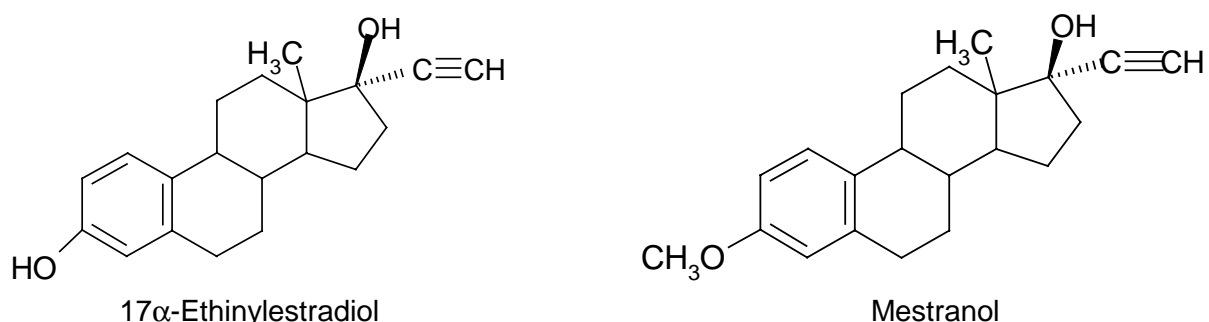


Abbildung 4: Zwei synthetische, in Kontrazeptiva enthaltene Estrogene.

Die Ethinylgruppe von 17α -Ethinylestradiol, das durch Addition von Ethinylmagnesiumbromid an die Carbonylgruppe des natürlichen Estrons hergestellt wird, macht diesen Steroidkörper deutlich schlechter abbaubar als 17β -Estradiol und ermöglicht so die

orale Applikation als Kontrazeptivum. Mestranol, ein weiteres synthetisches Estrogen, das Anwendung in Kontrazeptiva findet, wird durch Spaltung der Methyletherfunktion in Kläranlagen in 17α -Ethinylestradiol umgewandelt. Auch diese synthetischen Estrogene werden in Form von Konjugaten (Glucuronide, Sulfate) mit dem Urin ausgeschieden und spätestens bei der Abwasseraufbereitung durch mikrobielle Dekonjugation mit Glucuronidasen oder Sulfatasen in ihre aktive Form zurückgeführt [69,92].

1.2.3 Xenoestrogene

Während die estrogenische Wirkung von 17α -Ethinylestradiol ein primäres Syntheseziel war, wurde die estrogenartige Wirksamkeit von bestimmten Pflanzenschutzmitteln, Industriechemikalien und deren Abbauprodukten in den letzten 40 Jahren oft zufällig und lange nach Inverkehrbringen der Substanzen bekannt. Diese strukturell sehr unterschiedlichen synthetischen Verbindungen ahmen das Verhalten von natürlichen Estrogenen nach [61]; sie werden daher unter dem Begriff Xenoestrogene zusammengefasst.

DDT und seine Derivate

Das Insektizid *DDT* (*Dichlordiphenyltrichlorethan*) ist die erste gezielt in die Umwelt ausgebrachte Chemikalie, bei der später eine estrogenartige Wirksamkeit durch zahlreiche *in vivo*- und *in vitro*-Testverfahren eindeutig nachgewiesen wurde (s. Kapitel 1.4) [57]. Zu Beginn der 40er Jahre wurde DDT als Insektizid zur Bekämpfung der Überträgerinsekten von Malaria, Gelbfieber, Schlafkrankheit und Fleckfieber synthetisiert [93]. Das technische Produkt enthält hauptsächlich *p,p'*-DDT (ca. 70 %) und *o,p'*-DDT (ca. 20 %) sowie die Vorstufen und Eliminierungsprodukte *p,p'*-DDD (Dichlordiphenyldichlorethan), *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDE (Dichlordiphenyldichlorethylen) und *o,p'*-DDE (Abb. 5).

In Deutschland und vielen anderen Ländern ist der Einsatz von DDT bereits seit den 70er Jahren wegen seiner Persistenz und seinem Gefährdungspotential verboten [93], doch wird es zur Bekämpfung der Anophelesmücke, der Überträgerin von Malaria, in den Ländern der Dritten Welt immer noch eingesetzt. Aufgrund ihrer geringen Wasserlöslichkeit zeichnen sich Diphenylethane wie DDT durch eine starke Akkumulationsfähigkeit im Fettgewebe von Tieren und Menschen aus [93]; sie weisen zugleich eine erhöhte Sorptionsfähigkeit an Sediment-, Boden- und Schwebstoffpartikel auf.

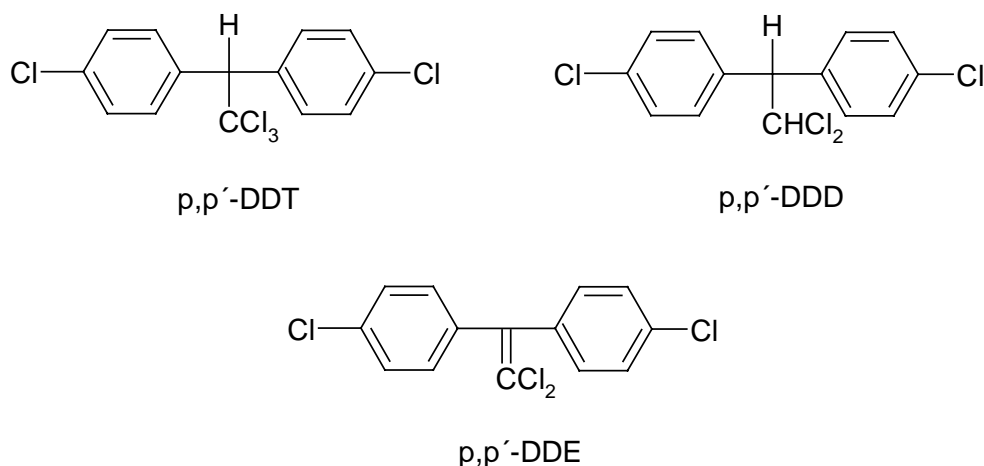


Abbildung 5: DDT und zwei Hauptmetabolite.

Methoxychlor und seine Derivate

Das Insektizid *Methoxychlor* [1,1,1-Trichlor-2,2-bis(4-methoxyphenyl)ethan], das seit Ende der 40er Jahre aufgrund seiner geringeren Persistenz und Toxizität als Ersatz für DDT eingesetzt wurde, ist seit 1986 in Deutschland ebenfalls verboten (Abb. 6) [94].

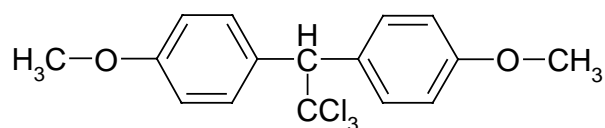


Abbildung 6: Struktur des 1,1-Diphenylethanderivates p,p'-Methoxychlor.

In technischen Gemischen wurden neben dem Hauptbestandteil p,p'-Methoxychlor (ca. 90 %) mehr als 50 Nebenprodukte nachgewiesen. Im Körper entstehen beim Abbau durch HCl-Abspaltung Derivate von 1,1-Dichlor-2,2-bis(4-methoxyphenyl)ethen (MDDE). Methoxychlor ist nur schlecht wasserlöslich, adsorbiert aber im Vergleich zu DDT weniger stark an organisches Material. Ein Abbau erfolgt vorwiegend durch Mikroorganismen unter *anaeroben* Bedingungen zu MDDE [93]. Wie für DDT ist auch für Methoxychlor die estrogenen Aktivität durch zahlreiche Testverfahren gesichert (s. Kapitel 1.4).

Weitere Organochlorinsektizide

Von Hexachlorcyclopentadien ausgehend werden u.a. die estrogen aktiven Insektizide Aldrin, Chlordan und Endosulfan synthetisiert (Abb. 7) [66,94]. Auch für diese Substanzen ist die Anwendung in Deutschland bereits seit den 80er Jahren verboten. Da sie in Nachbarländern aber immer noch eingesetzt werden und zudem wegen ihres hohen

Chlorierungsgrades in der aquatischen Umwelt sehr persistent sind, werden Oberflächengewässer auch heute noch auf ihr Vorkommen untersucht. Über die estrogenen Wirkung dieser Verbindungen existieren widersprüchliche Befunde; aufgrund der in *in vitro*-Tests festgestellten Wirkung sind aber alle drei zumindest als potentiell estrogen aktiv einzustufen [95-97]. Ein weiteres estrogenartig wirksames chlorhaltiges Pflanzenschutzmittel ist Kepon (Abb. 7); seine estrogenen Wirkung ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zweifelsfrei belegt [95,98].

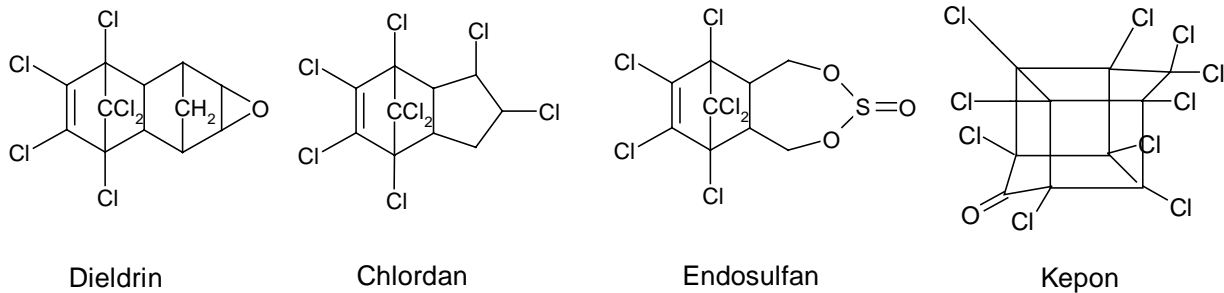


Abbildung 7: Die Organochlorinsektizide Dieldrin, Chlordan, Endosulfan und Kepon.

Polychlorierte Biphenyle (PCB)

Bis Mitte der 90er Jahre wurden ca. 1,5 Millionen Tonnen PCB hergestellt. Die Chlorierung von Biphenylen liefert stets Gemische der möglichen 209 Kongeneren, die sich durch hohe Stabilität und Unbrennbarkeit je nach Chlorierungsgrad auszeichnen. Aufgrund ihrer Eigenschaft als Dielektrika wurden PCBs vorrangig in Kondensatoren und Transformatoren eingesetzt, aber auch als Schmiermittel, Hydraulikflüssigkeiten, Weichmacher in Kunstharzen sowie als Farb-, Lack- und Papierzusätze [93].

Nicht alle PCBs zeigen eine estrogenen Wirkung; vor allem bei den koplanaren und dioxinähnlichen PCBs treten auch antiestrogenen Wirkungen auf. Das aufgrund der hohen Toxizität und Kanzerogenität der PCB seit 1983 bestehende internationale Anwendungs- und Produktionsverbot konnte nicht verhindern, dass rund ein Drittel der in Verkehr gebrachten PCBs durch nicht sachgerechte Entsorgung und Gerätedefekte in die Umwelt gelangten [93]. Davon abgesehen ist der Großteil der synthetisierten PCBs noch immer in elektrischen Anlagen im Einsatz; diese stellen daher neben Mülldeponien, Klärschlämmen und Flusssedimenten eine langfristige Eintragsquelle dar. Niedrig chlorierte Kongenere können zwar *aerob* von Mikroorganismen abgebaut werden, Biphenyle mit mehr als 7 Chloratomen akkumulieren jedoch aufgrund ihrer hohen Persistenz und ausgeprägten Lipophilie im Sediment oder im Fettgewebe aquatischer Organismen [93].

Bis(hydroxyphenyl)methane und deren Derivate

Bisphenol A (BPA, Abb. 8) stellt – neben Bisphenol F und weiteren Derivaten – das mengenmäßig bedeutsamste Derivat der Bis(hydroxyphenyl)methane dar; es wird zur Herstellung von Polycarbonaten und Epoxidharzen eingesetzt. Der Anwendungsbereich reicht von Lacken und Korrosionsschutz für Schiffe über Antioxidanzien in der Gummibearbeitung bis zur Kunststoffherstellung. BPA ist so auch in Lebensmittelverpackungen, Kunststoffzahnfüllungen und Saugflaschen für Kleinkinder zu finden [61, 99]. Bekannt wurde diese Substanz jedoch vor allem durch die Migration aus Kronkorken und Konservendosen in Lebensmittel [100,101]. Weltweit werden über 640 000 t jährlich synthetisiert, ein Drittel davon in Deutschland. Schätzungsweise gelangen allein in der BRD 109 t jährlich in die Umwelt (43 % in Wasser, 32 % in Sedimente, 24 % in Boden und $3,5 \times 10^{-5}$ % in Luft) [61].

Die relativ geringe estrogenen Wirkung von BPA ist seit mehr als 50 Jahren bekannt [102]. Bisphenol A ist aufgrund seiner polaren Hydroxygruppen gut wasserlöslich und wird im Wasser mikrobiell zu 4-Hydroxybenzoesäure und 4-Hydroxyacetophenon metabolisiert (Abb. 8) [93]. Bei einer Halbwertszeit von weniger als 4 Tagen ist eine signifikante Bioakkumulation in der aquatischen Umwelt nicht zu erwarten. Eine besonders ausgeprägte Sorption an Sediment und Schwebstoffen ist gleichfalls auszuschließen. Wegen der hohen Produktionsmengen stellt BPA aber trotzdem eine für die aquatische Umwelt relevante Verbindung dar.

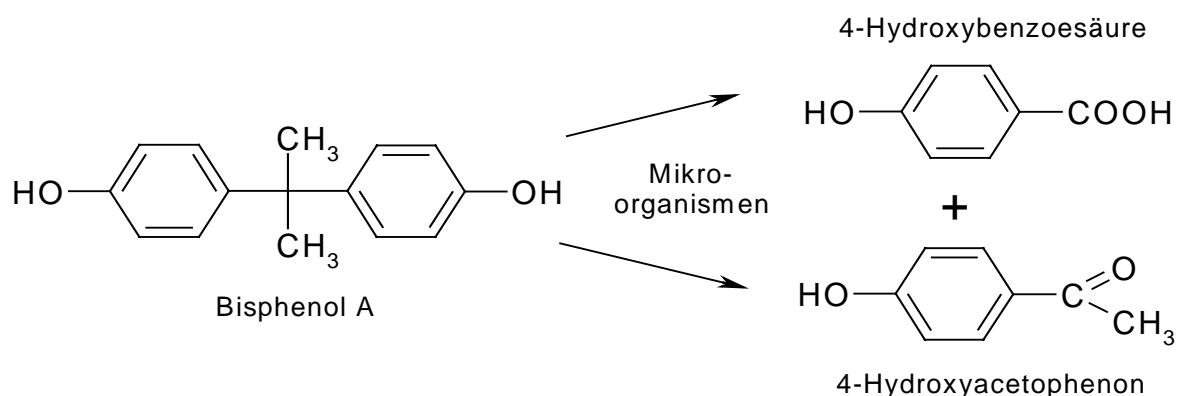


Abbildung 8: Mikrobielle Metabolisierung des Bis(hydroxyphenyl)methan-Derivates Bisphenol A in Wasser.

1,2-Diphenylethane und -ethene

In den 30er Jahren wurden auf der Suche nach therapeutisch applizierbaren Estrogenen zahlreiche 1,2-Diphenylethan- und 1,2-Diphenylethen-Derivate (Stilbene) syntheti-

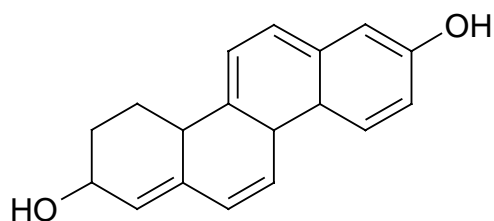
siert. Vor allem Hexestrol [3,4-Bis(4-hydroxyphenyl)hexan] und Diethylstilbestrol (DES, α,α -Diethyl-4,4'-dihydroxystilben) erreichen die Wirkstärke des natürlichen Estrogens 17 β -Estradiol [103-105]. Durch systematische Variation dieser Strukturen wurden weit mehr als 100 synthetische Estrogene dargestellt. Pharmazeutisch kam jedoch nur DES in größeren Mengen bei schwangeren Frauen zur Vermeidung von drohenden Früh- oder Fehlgeburten zum Einsatz. Kinder dieser Patientinnen zeigten nach der Pubertät eine Häufung von Missbildungen der Genitalien und eine deutlich erhöhte Inzidenz seltener Krebsarten. DES wurde in den USA außerdem als Wachstumshormon in der Tiermast eingesetzt; diese Praxis dauert vermutlich illegalerweise bis heute an [71,93].

Triphenylmethane

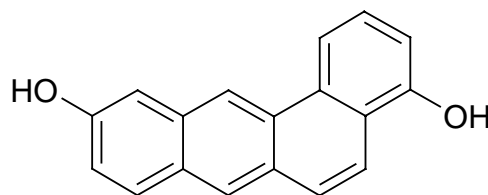
Triphenylmethan-Derivate finden vor allem als Farbstoffe sowie pH-Indikatoren Anwendung. Ihre estrogenen Potenz liegt im Allen-Doisy-Test (s. Kapitel 1.4) stets um vier bis fünf Zehnerpotenzen unter der von DES [104]. Neuere Untersuchungen von Phenolphthalol (2-[Bis(4-hydroxyphenyl)methyl]benzylalkohol) und Phenolphthalein (2-[Bis(4-hydroxyphenyl)methyl]benzoesäure) anhand des Glykogengehalts im Uterus bestätigen diese Einschätzungen [106]. Als bisher potentestes Estrogen dieser Verbindungsklasse wurde Bis(4-hydroxyphenyl)-[2-(phenoxy-sulfonyl)phenyl]methan identifiziert, welches nur um den Faktor 1000 schwächer wirkt als 17 β -Estradiol [107]. Die Verbindung ist als Verunreinigung (20 ppm) im pH-Indikator Phenolrot enthalten, der häufig Zellkulturmedien zugegeben wird; dadurch kann es zu Verfälschungen bei entsprechenden Biotests kommen.

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)

Aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu den Steroiden wurden auch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) auf ihre estrogenartige Wirksamkeit untersucht; dabei wurden hydroxylierte Chrysene und Dibenz[a]anthracene als aktivste Verbindungen identifiziert (Abb. 9). Die estrogenen Wirkung dieser Derivate im Allen-Doisy-Test (s. Kapitel 1.4) liegt nur um zwei bis vier Größenordnungen unter der von DES [108]. Der Benz[a]anthracen-Metabolit 3,9-Dihydroxybenz[a]anthracen (s. Abb. 9) bindet mit einer nur um den Faktor 10^{-2} geringeren Affinität als 17 β -Estradiol an den Estrogenrezeptor [109].



2,8-Dihydroxy-5,6,11,12,13,14-hexahydrochrysen



3,9-Dihydroxy-benz[a]anthracen

Abbildung 9: Estrogenartig wirksame Derivate der PAK Chrysen und Dibenz[a]anthracen.

Naphthole und ihre Derivate

Auch Naphthole weisen eine strukturelle Analogie zu den steroidalen Estrogenen auf. 1-Naphthol wird bei der Herstellung von Parfüms, Antioxidanzien, Pflanzenschutzmittel und Antiseptika verwendet und dient als Lösemittel für Fette, Wachse, Seifen und Öle. 2-Naphthol stellt die Ausgangsverbindung zur Synthese von Naphthylamin dar und wird bei der Herstellung von Farb-, Gerb- und Riechstoffen eingesetzt sowie als Antiseptikum in Salben. Die estrogene Wirkung von 1- und 2-Naphthol sowie der Derivate 5,6,7,8-Tetrahydro-2-naphthol und 6-Brom-2-naphthol konnte anhand der Bindungshemmung von 17β -Estradiol an Rezeptoren von Uteruszellen aus Kaninchen gezeigt werden [110]. 2-Hydroxy-6-naphthylpropionsäure erwies sich neben weiteren analogen Derivaten als potentes Estrogen im Uterusgewichtstest [111].

Phthalsäureester

Phthalsäureester stellen eine weitere Substanzklasse estrogen wirkender Verbindungen dar; ihr Produktionsvolumen beläuft sich allein in der BRD auf etwa 400 000 Tonnen jährlich. Phthalsäureester werden vor allem als Weichmacher in zahlreichen Kunststoffprodukten wie PVC, Polyvinylacetaten oder Polyurethanen eingesetzt, in denen sie mit einem Massenanteil von bis zu 40 % enthalten sind. Außerdem dienen sie als Löse- und Dispersionsmittel in Lacken und Farben sowie als Bestandteil von Kosmetika und Schmiermitteln. Bei der Herstellung überwiegen mengenmäßig die längerkettigen Homologe wie Diisononylphthalat und Di-(2-ethylhexyl)phthalat (Abb. 10). Vom Gesichtspunkt der estrogenen Wirkung, die bislang allerdings vor allem *in vitro* und nur selten *in vivo* beobachtet wurde [69], sind die kürzerkettigen Vertreter wie Di-n-butyl- und Benzyl-n-butylphthalat (Abb. 10) interessant. Für dieses wurde in zahlreichen *in vitro*-Tests eine estrogene Aktivität eindeutig nachgewiesen, die 5-6 Größenordnungen unter der von 17β -Estradiol liegt [97,112-115]. Die Produktions-

zahlen von Di-n-butyl- und Benzyl-n-butylphthalat liegen mit 20 000 und 10 000 Jahrestonnen allein in Deutschland so hoch, dass trotz der schwachen estrogenen Wirkung eine Relevanz für die aquatische Umwelt besteht.

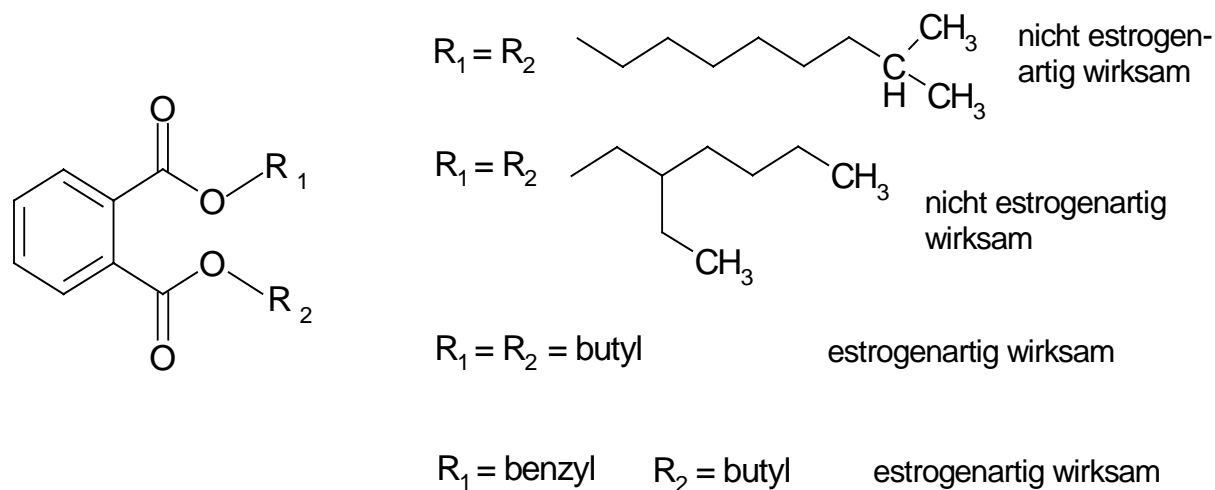


Abbildung 10: Estrogenartig wirksame und unwirksame Phthalsäureester.

Alkylphenolpolyethoxylate (APnEO) und ihre Abbauprodukte

Alkylphenolpolyethoxylate, die im Rahmen der Abbauntersuchungen in Kapitel 4 noch detaillierter betrachtet werden, sind 1998 weltweit in einer Menge von 600 000 Tonnen hergestellt worden [62,75,116]. Sie dienen als Hilfs- oder Grundstoffe bei der Textil- und Lederverarbeitung, bei der Herstellung von Papier und Farben sowie bei der Polymerproduktion. Darüber hinaus werden sie in der Agrochemie z.B. bei der Formulierung von Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmitteln sowie in der Metallindustrie zur Oberflächenbehandlung eingesetzt. Auch im nichtproduzierenden Gewerbe werden APnEO vor allem als Reinigungsmittel für Fahrzeuge, Textilien und zur Oberflächenbehandlung verwendet. Unter den APnEO überwiegen Nonylphenolpolyethoxylate (NPnEO) mit einem Anteil von etwa 80 % [93]. Die Ethoxylat-Kettenlänge liegt meist bei 8-12 (CH₂CH₂O)-Einheiten. Den Hauptanteil der restlichen APnEO bilden die Oktylphenolpolyethoxylate (OPnEO) [54].

Die NPnEO sind zwar selbst weder stark toxisch noch estrogenartig wirksam, werden jedoch in der Kläranlage mikrobiell zunächst größtenteils zu den stabileren und estrogen aktiven 4-Nonylphenolmonoethoxylaten und -diethoxylaten (4-NP1EO, 4-NP2EO) abgebaut [93]. Diese können an Schwebstoffen und Gewässersedimenten akkumulieren oder beim *aeroben* Abbau u.a. zu 4-Nonylphenoxyessigsäure (4-NP1EC) oxi-

diert werden. Unter *anaeroben* Bedingungen erfolgt vor allem ein Abbau zu 4-Nonylphenol (Abb. 11).

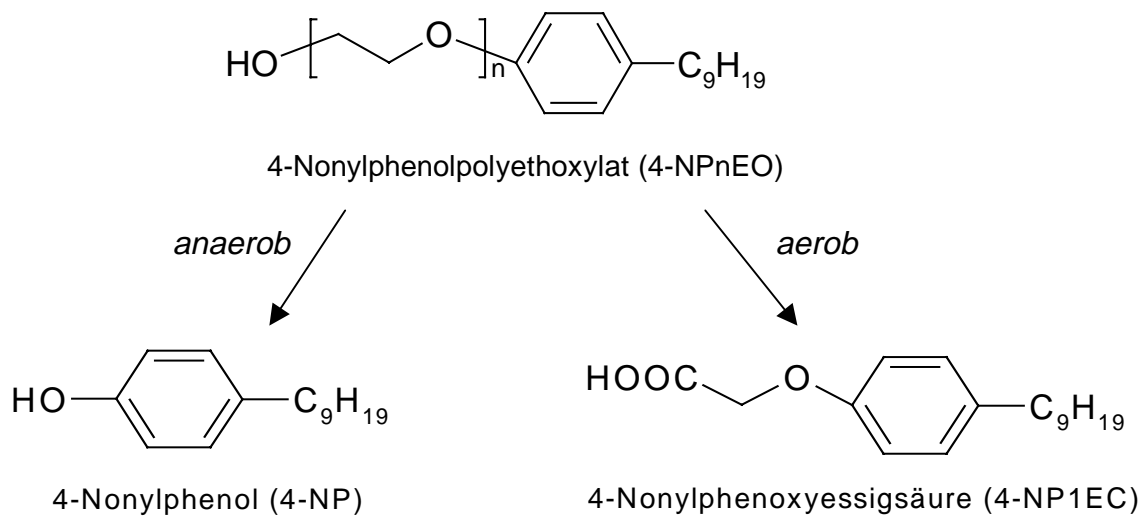


Abbildung 11: 4-NPnEO und zwei wichtige Eliminationsprodukte, die beim mikrobiellen Abbau in Kläranlagen gebildet werden.

1.2.4 Phyto- und Mykoestrogene

Verschiedene Pflanzen enthalten einerseits nichtsteroidale Inhaltsstoffe mit estrogenen Wirkung wie Flavonoide (z.B. Flavone, Isoflavone), Resorcyllsäurelactone (z.B. Zearalenon, Zearalenol) und Lignane, andererseits aber auch steroidale Verbindungen wie die Sterole (z.B. β -Sitosterol). Zahlreiche Substanzen der übrigen Gruppen weisen ebenfalls eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Estrogenen auf. Viele dieser pflanzlichen Inhaltsstoffe zeigen in entsprechenden Untersuchungen eine, wenn auch teilweise schwache, estrogenen Wirkung [117]. In mehreren Studien verlängerte eine phytoestrogenreiche Ernährung den weiblichen Menstruationszyklus und beeinflusste den normalen Metabolismus der Steroidhormone [118]. Ein kausaler Zusammenhang zwischen einer hohen Aufnahme von Phytoestrogenen beim Menschen, z.B. bei Vegetariern, und der Beeinflussung des endokrinen Systems ist bisher nicht schlüssig bewiesen. Besonders die Gefahren für Säuglinge und Kleinkinder, deren kommerziell erhältliche Nahrungsformulierungen seit Jahrzehnten überwiegend aus Sojapulver hergestellt werden, sind Gegenstand kontroverser Diskussionen. Außerdem kommen immer mehr Nahrungsmittelergänzungen und Produkte auf den Markt, die mit Phytoestrogenen als chemopräventiven Stoffen angereichert sind [93].

Während Flavone in Früchten, Gemüse und Getreide nahezu ubiquitär vorkommen, sind Isoflavone auf ganz bestimmte Pflanzengruppen konzentriert. Die beiden Isoflavone Genistein und Daidzein (Abb. 12) kommen in beträchtlichen Konzentrationen in Soja und Sojaprodukten vor, sind aber auch in Kleesorten und anderen Pflanzen vorhanden [69]. Ihre estrogenartige Wirkung ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen [69].

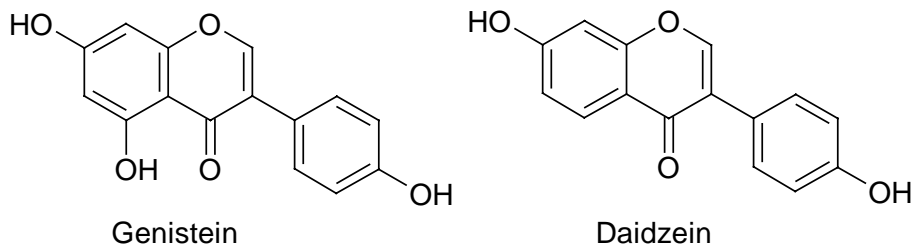


Abbildung 12: Zwei estrogenartig wirksame Isoflavone.

In bestimmten Kleesorten finden sich mit Coumestrol und Equol (Abb. 13) zwei weitere Flavonoide mit estrogenartiger Wirkung, von denen letzteres ebenfalls zur Gruppe der Isoflavone gehört. Equol wird auch bei der Metabolisierung vieler anderer Isoflavone [69] gebildet.

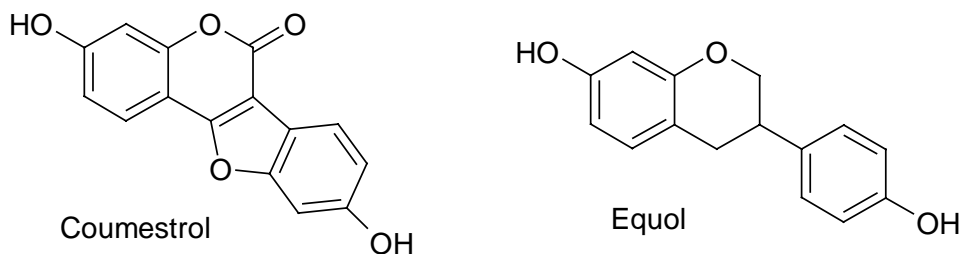


Abbildung 13: Zwei in Kleesorten enthaltene Flavonoide.

Das in Pflanzen wie z.B. der Kamille enthaltene β -Sitosterol weist ein den Estrogenen sehr ähnliches Steroidgerüst auf; es wird u.a. bei der Papierherstellung aus Holz freigesetzt und gelangt so in großen Mengen ins Abwasser [119]. Seine estrogenartige Wirkung wurde *in vivo* [63,120] wie *in vitro* [96,119] nachgewiesen. Neben dem mengenmäßig überwiegenden Eintrag ins Abwasser bei der Papierherstellung wird β -Sitosterol noch in geringen Mengen durch den Einsatz als Lipidsenker freigesetzt.

Auch die beiden Resorcyllsäurelactone Zearalenon und Zearalenol, die von Schimmelpilzen gebildet werden, zeigen bei Tests *in vitro* und *in vivo* eine estrogenartige Wirkung [39]; sie werden deshalb als Mykoestrogene bezeichnet.

1.3 Wirkungsweise von Estrogenen und estrogenartig wirksamen Substanzen

Die formale Einteilung in hydrophile und lipophile Hormone (s. Kapitel 1.2) ist auch bei der Diskussion der Wirkungsweise von Hormonen sinnvoll. Hydrophile Hormone gelangen bis auf wenige Ausnahmen ohne Bindung an sogenannte „Hormoncarrier“ über das Blut zu den Zielzellen; dagegen müssen die meisten lipophilen Hormone wie die Estrogene an spezifische Proteine (Carrier) binden, um über das Blut zu ihrem Wirkort zu gelangen. An der Zielzelle binden hydrophile Hormone an membranständige Rezeptoren, da sie die lipophile Zellmembran nicht direkt passieren können. Demgegenüber dringen die lipophilen Estrogene nach Trennung von ihrem Carrierprotein durch die Zellmembran in das Zytoplasma der Zielzelle ein, wo sie an entsprechende intrazelluläre Hormonrezeptoren (hormonbindende Proteine) andocken und die physiologische Wirkung auslösen. Während zellmembranständige Rezeptoren die Produktion eines „zweiten Boten“ bewirken, der im Zellinnern die Wirkung vermittelt, wirken intrazelluläre Rezeptoren wie im Fall der Estrogene direkt auf die Transkription, d.h. auf die Kontrolle der Genaktivität (Umkopieren der Basensequenz der DNA zur Synthese von Boten-RNA) [67,68,121].

Eine typische Zelle enthält nur 10^3 - 10^4 Rezeptoren, die allerdings eine sehr hohe Affinität und Spezifität für die entsprechenden Liganden besitzen. Die Rezeptorproteine gliedern sich in Domänen verschiedener Länge und Funktion und sind aus 400 bis 1000 Aminosäuren (AS) aufgebaut [67]. Der humane Estrogenrezeptor ER- α beispielsweise besteht aus 595 AS (Mol.-Masse 67 kDa) [122]. Unterschiedliche Steroidhormonrezeptoren weisen mehrere gemeinsame Struktur motive auf (Abb. 14 und 15) [68] wie die konservierte mittlere Domäne C, die für die DNA-Bindung verantwortlich ist, und die Kern-Lokalisierungssequenz D. Im Bereich der DNA-Bindungs-Domäne besitzen Hormonrezeptoren mehrere cysteinreiche Sequenzen, die Zinkionen koordinativ binden und deshalb *Zinkfinger* genannt werden [67]. Auch die hormonbindende Domäne E zeigt Übereinstimmungen zwischen den unterschiedlichen Steroidhormonrezeptoren. Die genaktivierenden Domänen A/B am Aminoende sind durch starke Variationen in der Länge charakterisiert. Sie regulieren die Aktivierung oder zum Teil auch Inhibierung der Gen-Transkription.

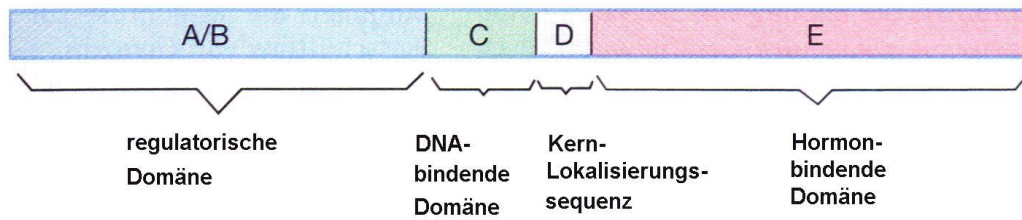


Abbildung 14: Allgemeines Schema der DNA-Sequenz von Steroidhormonrezeptoren [67].

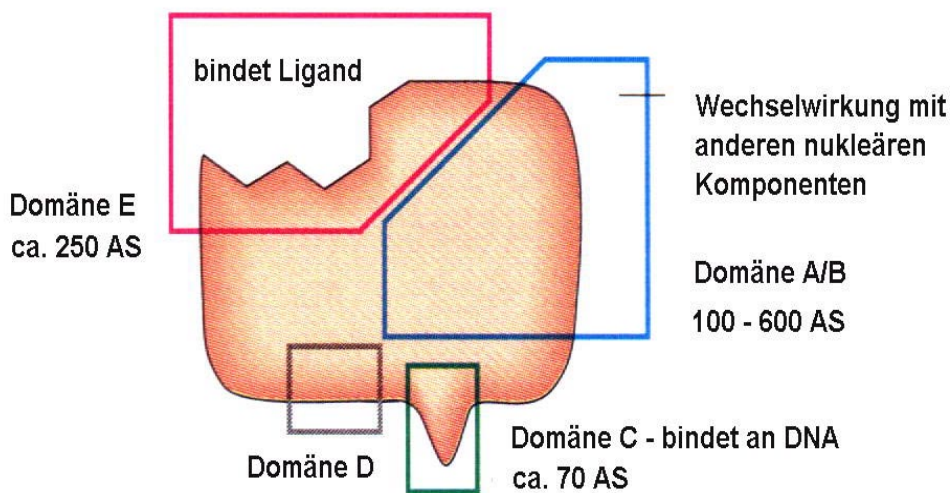


Abbildung 15: Allgemeiner Aufbau eines Steroidhormonrezeptorproteins [67].

Jedes Steroidhormon wird von einem anderen Mitglied einer Familie homologer Rezeptorproteine erkannt. Auf die Bindung eines Steroidhormonmoleküls an den Rezeptor folgt vermutlich die Dissoziation des an die mittlere Domäne gebundenen inhibitorischen hsp-90-Proteins. Durch die anschließende Dimerisierung des Rezeptor-Hormon-Komplexes wird der Rezeptor aktiviert, d.h. die Affinität zu einer spezifischen DNA-Sequenz wird erhöht (Abb. 16). Diese Nukleotidsequenzen, die man **Hormone Response Elements** (HRE) nennt, bestehen aus punktsymmetrischen DNA-Segmenten (Palindromen), die als Verstärkerelemente die Transkription und somit die Neusynthese von Proteinen regulieren [67]. Die HRE der Hormone weisen Sequenzunterschiede auf, die für die Spezifität der Hormonwirkung wichtig sind. Jeder Hormonrezeptor erkennt nur sein spezifisches HRE.

Die natürlichen Estrogene wie 17β -Estradiol und seine Abbauprodukte Estron und Estriol (Abb. 2) binden reversibel an Carrier-Proteine, werden von diesen im Blut zur

Zielzelle transportiert und dort wieder freigesetzt. Sie diffundieren dann durch die Zellmembran und binden wiederum reversibel an die Estrogenrezeptoren (Abb. 16).

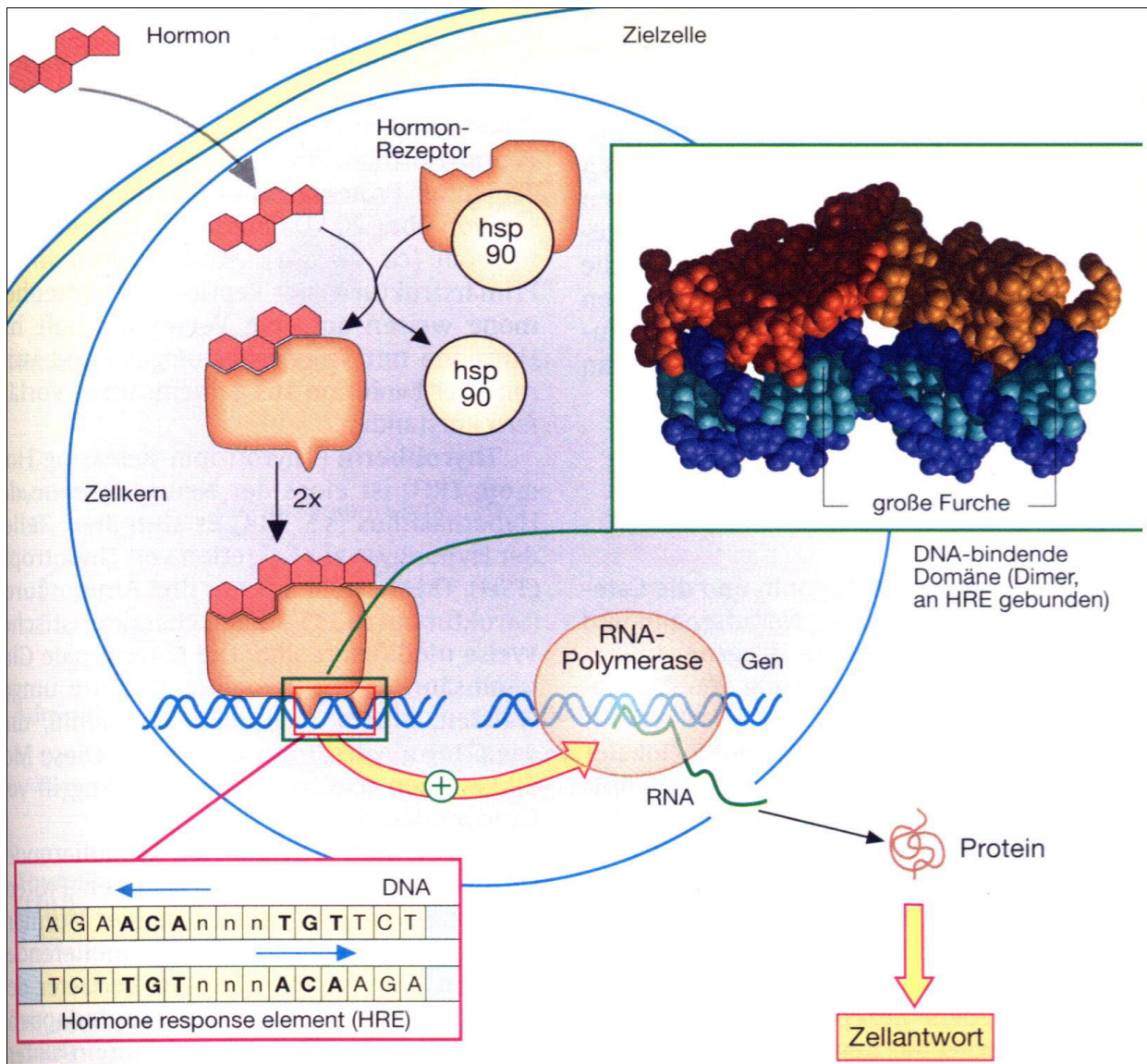


Abbildung 16: Wirkungsmechanismus eines lipophilen Steroidhormons nach Eintritt in die Zielzelle [67].

Die Kristallstruktur eines Estrogenrezeptor/Substrat-Komplexes (Abb. 17 und 18) zeigt deutlich die Fixierung von 17β -Estradiol in der Tasche des Estrogenrezeptors ER- α . Das Steroid bildet dabei Wasserstoffbrücken zu den basischen Aminosäuren Histidin 524 und Arginin 394, der sauren OH-Funktion der Glutaminsäure 353 sowie zu Wassermolekülen im Protein aus. Wasserstoffbrücken liegen in ihrer Stärke mit 12-29 kJ / mol zwischen kovalenten Bindungen und reinen Van-der-Waals-Kontakten [68]. Die stärkste Wasserstoffbrücken-Bindung liegt dann vor, wenn Donor-, Akzeptor- und Wasserstoffatom linear angeordnet sind [68]. Aufgrund der Unspezifität von Wasser-

stoffbrücken und der Größe der Rezeptortasche, die mit 450 \AA^3 fast doppelt so groß ist wie das Molekylvolumen von 17β -Estradiol (245 \AA^3) [123], können statt der eigentlichen Substrate auch viele andere Substanzen an den Estrogenrezeptor binden und eine agonistische oder antagonistische Wirkung hervorrufen. Bei einer agonistischen Wirkung löst das Andocken des Substrats an den Rezeptor nach Dimerisierung und Bindung an das HRE eine Genantwort aus, bei einer antagonistischen Wirkung wird der Rezeptor durch das Andocken des Substrats deaktiviert. Es kann keine Dimerisierung und Bindung an DNA-Sequenzen stattfinden; zudem ist der Rezeptor blockiert und kann nicht durch ein natürliches Substrat, z.B. ein Estrogen, aktiviert werden [67].

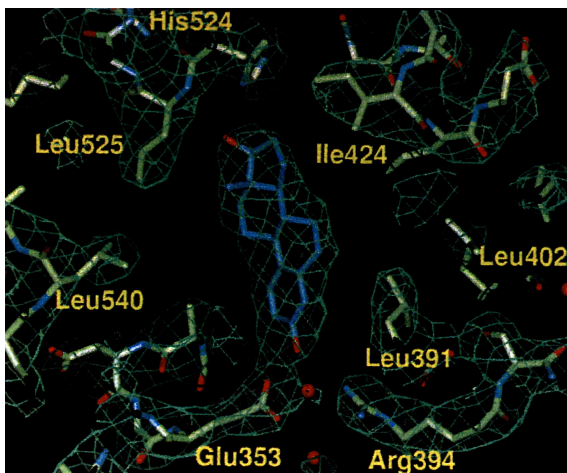


Abbildung 17: Kristallstruktur des Estrogenrezeptors α nach Bindung an 17β -Estradiol [123].

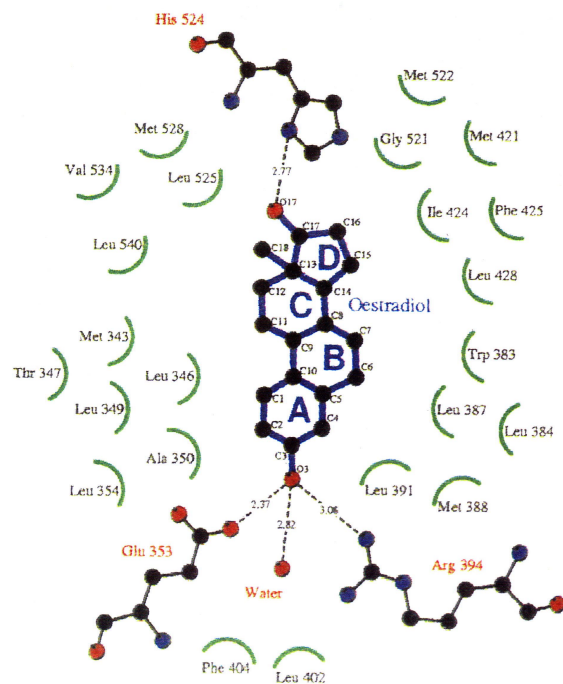


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Estrogen-Rezeptor-Bindung über Wasserstoffbrücken [123].

Die typischen estrogenen Wirkungen werden auf den klassischen Estrogenrezeptor ER- α zurückgeführt, der beispielsweise bei der Ratte aus 558 Aminosäuren (AS) besteht [124]. Ende 1995 wurde von Kuiper *et al.* der Estrogenrezeptor ER- β der Ratte mit 457 AS identifiziert [125], kurz darauf von Mosselman der menschliche ER- β mit 477 AS [126]. Während ER- α in den typischen Estrogen-Zielorganen, vor allem der Uteruszelle, vorkommt, findet sich ER- β auch in Prostata, Hoden und Eierstöcken sowie in einigen Teilen des Gehirns [57]. Beide Rezeptortypen weisen eine hochgradige Homologie hinsichtlich ihrer DNA- und ligandenbindenden Domänen auf. Auch in

Bezug auf die Bindungseigenschaften zu ihrer DNA-Erkennungssequenz, die Dimerisierung der Rezeptormonomeren sowie die Affinität zum natürlichen 17 β -Estradiol verhalten sie sich sehr ähnlich [127]. Mittlerweile gibt es aber Hinweise auf unterschiedliche Funktionen der beiden Rezeptoren. So zeigt ER- β beispielsweise eine erhöhte Bindungsaffinität zu den Phytoestrogenen Coumestrol und Genistein und zu dem Xenoestrogen Bisphenol A, während die Bindungsaffinität zu Diethylstilbestrol geringer ist als bei ER- α [124]. Vermutlich spielen Sequenzunterschiede in der aminoterminalen Region von ER- α und ER- β hierbei eine entscheidende Rolle [127].

1.4 Testverfahren zur Ermittlung der estrogenen Wirkung

Alle Ansätze zur Bestimmung der estrogenen Wirkung basieren auf einer quantitativen Erfassung der Interaktion der Wirksubstanzen mit den jeweiligen zellulären bzw. subzellulären Zielstrukturen. Die folgende Übersicht über verschiedene Testverfahren wurde von Tanja Schultis zusammengestellt und ist hier nach ihrer Diplomarbeit zitiert [128].

In vivo-Testverfahren zur Erfassung estrogenen Effekte werden mit Säugetieren, Vögeln, Reptilien und Fischen durchgeführt; dabei werden u.a. Veränderungen der Vagina, des Uterus (Gebärmutter) und der Ovarien (Eierstöcke) untersucht [93]. Solche *in vivo*-Tests haben eine sehr hohe Aussagekraft, da sie die Reaktion des gesamten Organismus auf Umwelteinflüsse erfassen. Nachteilig sind die lange Testdauer, die erforderliche apparative Ausstattung und der hohe Arbeitsaufwand. Die naturgemäß starke Streuung der Messergebnisse durch den Unterschied zwischen den einzelnen Testtieren erschwert zudem eine präzise Interpretation der Ergebnisse [65]. Zudem sind diese Untersuchungsmethoden unter Tierschutzaspekten nicht unproblematisch.

Bei *in vitro*-Testansätzen handelt es sich dagegen um suborganismische Testverfahren [65]; sie verwenden zelluläre und subzelluläre Systeme und stellen meist die schnellere und kostengünstigere Variante zur Bestimmung der estrogenen Aktivität von Substanzen dar. Der Vorteil bei zellgebundenen Messungen gegenüber den subzellulären Verfahren liegt darin, dass sie zusätzlich biologische Vorgänge wie beispielsweise die Membrandiffusion berücksichtigen. Der Hauptnachteil der *in vitro*-Tests liegt in der begrenzten Übertragbarkeit der Untersuchungsergebnisse auf den Gesamtorganismus: hormonelle Einflüsse werden bei solchen Tests letztlich immer nur durch ein kleines „Fenster“ betrachtet.

1.4.1 *In vivo*-Verfahren

Allen-Doisy-Test

Der Allen-Doisy-Test, das älteste *in vivo*-Verfahren, zeichnet sich durch sehr gute Spezifität, Sensitivität und relativ kurze Versuchsdauer aus [65]. Nach Entfernen der Ovarien bei Ratten und Mäusen und anschließender subkutaner, intramuskulärer oder intravaginaler mehrfacher Estrogenapplikation wird nach 2 bis 3 Tagen die Verhornung des Vaginalepithels als Nachweis estrogener Wirkung beobachtet [93,94,129]. Werden unterschiedliche Dosierungen vorgenommen und mehrere Tiere pro Dosisgruppe eingesetzt, kann eine Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt werden. Aufgrund der Fülle von Testmodifikationen ist eine Interpretation der Ergebnisse nur relativ zu einer Kontrollsubstanz wie 17 β -Estradiol sinnvoll. Mit diesem Test wurde bereits in den 30er Jahren eine Reihe von Substanzen wie Diphenylmethan, -ethan, -ethen, und -propan auf ihre estrogene Wirkung untersucht; dies führte u.a. zur Entwicklung von Diethylstilbestrol (DES) [93,130].

Uterusgewichtstest bei Nagetieren

Die zu prüfende Substanz wird juvenilen oder ovariectomierten Ratten und Mäusen einmalig oder über mehrere Tage verteilt mit dem Futter verabreicht [93,94,131]. Eine hormonelle Wirkung zeigt sich in einem Uteruswachstum aufgrund erhöhter Zellteilungsrate in der Uterusschleimhaut. Nach Entnahme und Gewichtsbestimmung des Uterus wird die hormonelle Wirkung einer Substanz im Vergleich zu unbehandelten Tieren bestimmt. Auch bei diesem Test dient die Zellproliferation durch natürliche Estrogene wie 17 β -Estradiol als Vergleichswert. Die LOED (**L**owest **O**bserved **E**ffect **D**ose) beträgt 10^{-4} mg 17 β -Estradiol / kg Körpergewicht [65]. Baker *et al.* fanden 1998 ein signifikantes Uteruswachstum ab 0,4 mg / kg Körpergewicht pro Tag für 17 β -Estradiol sowie ab 20 mg / kg Körpergewicht pro Tag für Coumestrol, ein hormonell aktives Phytoestrogen [47]. Die Ergebnisse des Uterusgewichtstests hängen naturgemäß von der zum Test verwendeten Tierart, der Form der Verabreichung und den Dosisintervallen ab [94]. Viele der heute als estrogen wirkend bekannten Verbindungen wie o,p'-DDT, Methoxychlor, Chlordecon und einige PCBs wurden mit diesem Testverfahren identifiziert [94].

Sexuelle Entwicklung von weiblichen Nagetieren

Die Verabreichung von hormonell aktiven Substanzen während der neonatalen Phase führt bei weiblichen Ratten und Mäusen zu einer verfrühten Geschlechtsreife, einer Störung des Reproduktionszyklus durch dauerhafte Verhornung des Vaginalepithels, dem sogenannten PVE Syndrom (*Persistent Vaginal Estrus*) sowie zu einer Schädigung der Ovarien [94,132]. Estrogene können jedoch bei neonataler Verabreichung nicht nur Schädigungen der Sexualorgane selbst, sondern auch Veränderungen in Hypothalamus- und Hypophysenfunktionen auslösen, wie Untersuchungen an Ratten und Mäusen von Gellert *et al.* 1974 mit o,p'-DDT sowie 1978 mit Chlordecon gezeigt haben [132,133].

Eileitergewichtstest

Hierbei wird die zu testende Substanz juvenilen Hühnern mit dem Futter über mehrere Tage oder Wochen verabreicht [94,134] und anschließend das Eileitergewicht bestimmt. Dieses kann, abhängig von Dosis und Zeitraum der Substanzgabe, bis zum 100fachen des Normalgewichtes betragen. In den Ovarien zeigt sich neben einer Gewichtszunahme durch verstärkte Zellteilung auch ein erhöhter Glykogengehalt sowie eine gesteigerte Synthese von Ovalbumin und Conalbumin. Bereits 1968 untersuchten Bitman *et al.* mit diesem Test die estrogene Wirkung des Insektizids DDT [135].

Geschlechtsdifferenzierung bei Vögeln

Bei weiblichen Vögeln ist lediglich der linke Eierstock ausgebildet sowie der zugehörige linke Eileiter, der aus dem linken Müllerschen Gang entsteht; der rechte degeneriert üblicherweise während der embryonalen Phase [93,94,136]. Bei männlichen Vögeln sind beide Müllerschen Gänge degeneriert. Fry *et al.* wiesen 1981 nach, dass es in Anwesenheit von o,p'-DDT, p,p'-DDT und Methoxychlor bei männlichen Vogel-embryonen der Seemöwe zu einer Verweiblichung kommt [136]. Die Verweiblichung führt dabei zu einer Verkümmern bzw. Abwesenheit des rechten Hodens und der Entwicklung eines großen linken sowie eines kleinen rechten Eileiters.

Geschlechtsdifferenzierung bei Reptilien

Die Festlegung des Geschlechts ist bei vielen Reptilien wie Schildkröten, Eidechsen und Alligatoren nicht genetisch vorbestimmt, sondern von der Inkubationstemperatur der Eier abhängig [93,94]. So führen beispielsweise bei der Schildkrötenspezies *Trachemys Scripta* Temperaturen von ca. 32 °C zu weiblichen, Temperaturen um 26 °C

zu männlichen Nachkommen. Sind aber während des Prozesses der Geschlechtsdifferenzierung Estrogene in der Eischale enthalten, kommt es auch bei tieferen Temperaturen zur Ausbildung von Eierstöcken. Wibbels und Crews wiesen 1992 diesen Effekt für Gestagene (Norethisteron), Antiestrogene (Tamoxifen), Antiandrogene (Triphenylethylene) und selbst Androgene (Testosteron) nach [137]. Bergeron *et al.* fanden 1994 für verschiedene chlorierte Biphenyle, Hydroxybiphenyle, Terphenyle und Diphenylether einen eindeutigen Einfluss auf die Geschlechterdifferenzierung bei kalt inkubierten Schildkröteneiern [138].

Vitellogeninsynthese in Fischen

Vitellogenin ist ein Sammelbegriff für eine Gruppe von Proteinen mit einer Gesamtmasse von 240 kDa, die beim Huhn aus mehreren Untereinheiten bestehen [139]. Unter Vitellogeninen versteht man spezielle Lipoproteine (Anlagerungsverbindungen von Lipiden an Proteine), die in der Leber von Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen synthetisiert und durch das Blut in die Eier transportiert werden [93,94]. Sie gehören zu den Lipoproteinen mit sehr geringer Dichte und bestehen aus Lipovitellin und Phosvitin [140]. Als Vorstufe des Eidotters sind sie normalerweise in männlichen oder juvenilen Individuen nicht zu finden. Bei Anwesenheit von hormonell aktiven Verbindungen wird Vitellogenin jedoch auch von männlichen Nachkommen produziert.

Zum Nachweis estrogenartig wirksamer Substanzen wird dieser Test seit den 90er Jahren mit der Regenbogenforelle *Oncorhynchus Mykiss* als Testorganismus angewendet. Die Nachweisgrenzen liegen bei 0,3 ng / L für 17 α -Ethinylestradiol oder 20 μ g / L für das estrogenartig wirksame Syntheseprodukt 4-Nonylphenol. Die Versuchsdauer bei diesem Test beträgt 8 bis 12 Tage [65]. Erste Untersuchungen des Anstiegs der Vitellogeninproduktion bei Regenbogenforellen, die in häuslichem Abwasser gehalten wurden, haben 1994 Purdom *et al.* durchgeführt [9]. Weitere Tests mit dieser Spezies erfolgten 1994 und 1996 anhand von Kläranlagenabläufen in Harpenden und Chelmsford (Großbritannien) [43] sowie anhand von Ausflüssen der ESSO-Slagentangen Öltraffinerie durch Knudsen *et al.* [24]. Von Tremblay *et al.* wurde dieser Test zum Vergleich zwischen dem Phytoestrogen β -Sitosterol und dem Abwasser zweier kanadischer Papiermühlen herangezogen [64]. White *et al.* [54] zeigten, dass bei Forellen zahlreiche Abbauprodukte der APnEO die Vitellogeninproduktion stimulieren. Die Untersuchung der Induktion der Vitellogenin-Synthese stellt heute das am häufigsten verwendete *in vivo*-Verfahren dar [65].

1.4.2 *In vitro*-Verfahren

Bindung von radioaktiv markiertem 17 β -Estradiol an Uterusgewebe und Zell-extrakte

Voraussetzung für eine Antwort in den Zielzellen eines Organismus ist die Bindung der estrogenartig wirksamen Substanz an den entsprechenden Rezeptor [93,94]. Eine Messung dieser Bindung kann über einen Kompetitionstest mit radioaktiv markiertem 17 β -Estradiol [³H-17 β -Estradiol] erfolgen [141,142]. Dieser Test benötigt lediglich 4 Stunden Versuchsdauer; die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 μ g / L für 17 β -Estradiol [141,142]. Verwendet werden rezeptorreiche Gewebe wie beispielsweise Uterusgewebe von Nagetieren, Lebergewebe von Forellen oder menschliche Brustkrebszellen (MCF-7) [94]. Mit Uterusgewebe von Ratten, Mäusen und Kaninchen wurden DDT, DDT-Derivate und Methoxychlor getestet [94,142]. Ferner fanden 1974 Untersuchungen von PCB-Mischungen durch Nelson sowie 1978 von Naphtolen, Phenolen und Alkylphenolen durch Mueller und Kim statt [94,142,143]. Korach *et al.* verwendeten Uterusgewebe für die Testung von chlorierten Hydroxybiphenylen [144], Baker *et al.* Rattenuterus-Gewebe für die Untersuchung von Phytosterolen [47]. Thomas und Smith nutzten hingegen 1993 Leberextrakte von Forellen, um die Bindungsfähigkeit von DDT, Methoxychlor, Chlordecon, Benz[a]pyren sowie PCB zu ermitteln [145]. Für Bindungsexperimente mit Insektiziden verwendeten Soto *et al.* 1995 schließlich MCF-7 Zellextrakte [95] (s. u.).

Proliferation von estrogen-sensitiven Brustkrebszellen (E-Screen)

Seit Beginn der 70er Jahre werden Brustkrebspatientinnen estrogen-sensitive Brustkrebszelllinien entnommen, um Entstehung und Wachstum von Brustkrebs zu untersuchen [93,94]. Der Nachweis der estrogenen Aktivität von Bisphenol A durch Krishnan *et al.* und von Nonylphenol durch Soto *et al.* erfolgte mit diesen Zelllinien dabei eher zufällig [146,147].

In Gegenwart von Estrogenen kommt es in den MCF-7-Zellen neben der Zellproliferation u.a. zur Synthese zahlreicher Enzyme, Wachstumsfaktoren und Progesteronrezeptoren. Durch Klonierung entstandene Sublinien veränderten im Laufe der Zeit in zahlreichen Laboratorien unter unterschiedlichen Selektionsbedingungen, z.B. durch Veränderung von Kulturmedium und Serum, ihre biologische Charakteristik, d.h. auch ihre estrogen Sensitivität. Ein direkter quantitativer Vergleich zwischen den experi-

mentellen Ergebnissen aus unterschiedlichen Labors ist somit nur bedingt möglich. Der E-Screen-Test auf die estrogenen Wirkstärke von Substanzen wurde 1992 von Soto *et al.* mit einem MCF-7-Klon entwickelt, der auch in serum- und estrogenfreiem Medium proliferieren kann [96]. In estrogen-sensitiven MCF-7-Zelllinien, die menschlichem Serum ausgesetzt werden, das mit dextranüberzogener Holzkohle behandelt wurde, ist die Proliferation inhibiert. Durch Zugabe von Estrogenen kann diese Hemmung aufgehoben werden. Der E-Screen-Test misst folglich nicht die durch Estrogene stimulierte Proliferation, sondern die Verminderung der Proliferationshemmung. Die estrogenen Aktivität wird in RPE-Einheiten (*Relative Proliferative Effect*) angegeben [41], die der maximalen induzierten Proliferation durch die Testsubstanz im Vergleich zu 17 β -Estradiol entsprechen. So kann ein vollständiger Agonist (RPE = 100 %) von einem partiellen Agonisten (RPE < 100 %) unterschieden werden. Anwendung und Ergebnisse dieses Tests werden im Rahmen des Screening-Programms (Kapitel 2) detailliert dargestellt und diskutiert.

Vitellogenin-Synthese in Zellkulturen

Mit Leberzellkulturen von Fröschen oder Fischen kann die Synthese von Vitellogenin auch über einen *in vitro*-Testansatz zur Bestimmung der estrogenen Aktivität herangezogen werden [93,94]. Neben verschiedenen Alkylphenolpolyethoxylaten (APnEO) wurden von Jobling und Sumpter 1993 auch deren Abbauprodukte, z.B. die Alkylphenole, untersucht [148]. Monteverdi *et al.* verwendeten 1998 Hepatozyten des Katzenfisches (*Ictalurus Punctatus*) zur Untersuchung der estrogenen Wirkung von DES, o,p'-DDT und Alkylphenolen [42]. Hock und Seifert berichten von Untersuchungen, bei denen über die Vitellogeninsynthese in Forellen-Hepatozyten Nachweisgrenzen von 3 $\mu\text{g} / \text{L}$ für 17 α -Ethinylestradiol und 2,2 mg / L für 4-Nonylphenol erreicht wurden; diese liegen deutlich über denen des entsprechenden *in vivo*-Verfahrens [65].

Yeast-Estrogen Screen Assay (YES-Assay) mit rekombinanten Hefezellen

Der *Yeast-Estrogen Screen Assay* arbeitet mit rekombinanten Stämmen von *Saccharomyces Cerevisiae*, die mit Hilfe des Vektors pYHER2 den menschlichen Estrogenrezeptor exprimieren können [93,94,149]. Auf einem Reporterplasmid besitzen diese Stämme zusätzlich eine Erkennungssequenz für den Estrogenrezeptor kombiniert mit einem Reportergen für das Enzym β -Galactosidase (lacZ-Gen). Bindet eine estrogenartig wirksame Substanz an den Hormonrezeptor-Komplex, werden die Rezeptormole-

küle transaktiviert und können nun an die auf dem Reporterplasmid lokalisierte DNA-Erkennungssequenz binden. So wird die Expression des lacZ-Gens und damit die Synthese von β -Galactosidase ausgelöst. Die β -Galactosidaseaktivität dient als Maß für die estrogenen Aktivität der Testsubstanz. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden in den 90er Jahren zahlreiche Pestizide, Phytoestrogene und Detergenzien mit dem YES-Assay untersucht [93,94]. 1998 testeten Rehmann *et al.* u.a. natürliche Steroidhormone, synthetische Estrogene sowie Phenol- und Chlorphenol-Derivate auf ihre estrogenen Wirkung [44].

1.4.3 Rezeptor-Bindungstests

In letzter Zeit wurden sogenannte Rezeptor-Bindungstests entwickelt, die sich aufgrund ihrer Schnelligkeit und einfachen Handhabung besonders für das rasche Screening von Umweltproben eignen [65,149,150]. Auf Basis ihrer Ergebnisse kann anschließend über die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen entschieden werden. Analog zu den *in vitro*-Testansätzen können Toxizitätsäquivalente quantitativ und mit hoher Reproduzierbarkeit erfasst werden, wozu eine in neuester Zeit verbesserte Rezeptorstabilität wesentlich beiträgt. Eine Unterscheidung zwischen Agonisten und Antagonisten ist bei keinem auf einer Rezeptorbindung basierenden Testansatz möglich; auch Synergismen können im Gegensatz zu entsprechenden Biotests nur bedingt nachgewiesen werden.

Enzyme-Linked Receptor Assay (ELRA)

Der ELRA-Test zählt zu den einfachsten und mit einer Versuchsdauer von ca. 4 Stunden auch zu den schnellsten subzellulären Testsystemen [65]; seit seiner Entwicklung 1997 durch Hock und Seifert wurde er bereits auf eine Vielzahl von Substanzen angewandt [149]. Der Testaufbau basiert auf dem Prinzip des indirekten kompetitiven Enzymimmunoassays (ELISA) [65,149], wobei im ersten Schritt (A) jedoch anstelle von Antikörpern Estrogenrezeptoren eingesetzt werden (Abb. 19). Die estrogen aktiven Wirkstoffe in der Probe konkurrieren mit immobilisiertem 17β -Estradiol (BSA-Beschichtungskonjugat) um die freien Bindungsstellen des in Lösung befindlichen Estrogenrezeptors (Schritt B). Anschließend wird über zwei Antikörperreaktionsschritte die Menge an Rezeptor quantifiziert, die am immobilisierten Beschichtungskonjugat gebunden bleibt. Zunächst binden rezeptorspezifische Antikörper an die immobilisierten Rezeptormoleküle (Schritt C). Die bei der nachfolgenden Inkubation eingesetzten

Anti-Antikörper tragen eine Peroxidase als Enzymmarker (*Schritt D*). Der Umsatz eines Farbstoffsubstrates durch diese Peroxidase wird photometrisch bei 460 nm verfolgt; dabei verhält sich die Menge des umgesetzten Substrates und damit des gebildeten Farbstoffes umgekehrt proportional zur Menge der estrogen wirkenden Substanz [65,149,150].

Die Rezeptoraffinität der Substanzen wird als Kreuzreaktivität in Prozent ausgedrückt [150]. Für 17 β -Estradiol wird die Affinität zum Estrogenrezeptor definitionsgemäß zu 100 % festgelegt. Nach Hock *et al.* haben alle getesteten Substanzen eine niedrigere Kreuzreaktivität ergeben, z.B. 80 % für DES, 58 % für 17 α -Ethinylestradiol und 0,1 % für Bisphenol A [65]. Die Kreuzreaktivitäten erlauben eine begrenzte Aussage über die biologische Aktivität der Substanzen. Stoffe, die in die Biosynthese und den physiologischen Abbau von Estrogenen eingreifen oder auch mit dem Serumtransport der Estrogene interferieren, lassen sich über diesen Bindungsassay nicht erfassen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass trotz Bindung an den Rezeptor bei einer entsprechenden *in vivo*-Untersuchung keine Reaktion ausgelöst wird. Die angegebenen Kreuzreaktivitäten stellen somit lediglich Maximalwerte dar und erfordern zu ihrer Validierung zusätzlich einen *in vivo*-Test. Aufgrund seiner einfachen Handhabung und Schnelligkeit ist der ELRA-Test jedoch sehr gut zum Screening sowie zur Erfassung der Summe der Wirkkonzentrationen aller estrogenartig wirksamen Substanzen in Wasserproben geeignet.

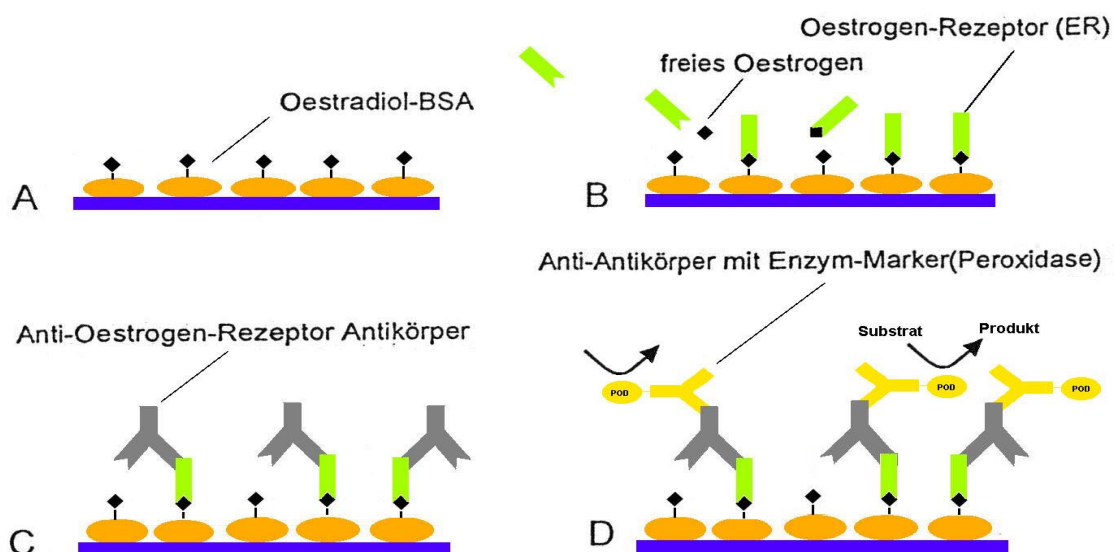


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Testprinzips beim ELRA-Verfahren [65].

DNA-Bindungsassay

Dieser Test beruht auf der Modellvorstellung, dass der Estrogenrezeptor nur dann in nennenswertem Umfang an die DNA bindet, wenn die Hormonbindungsstellen durch Estrogene bzw. estrogen wirkende Substanzen besetzt sind [65,151]. Nach Dimerisierung des Hormon-Rezeptorkomplexes bildet sich durch seine Bindung an biotinylierte DNA-Stränge der Biotin-Peroxidase-Streptavidin-Komplex (Abb. 20). Mit Hilfe eines optischen Biosensor-Systems (BIAcore) kann die Kinetik der Rezeptorbindung an das spezifische DNA-Element erfasst werden; dies ermöglicht eine on-line Analyse der DNA-Bindung in An- und Abwesenheit von Estrogenen und estrogen wirkenden Substanzen. Der von Cheskis *et al.* 1997 eingeführte DNA-Bindungsassay kann somit den subzellulären Testansätzen zugeordnet werden [151].

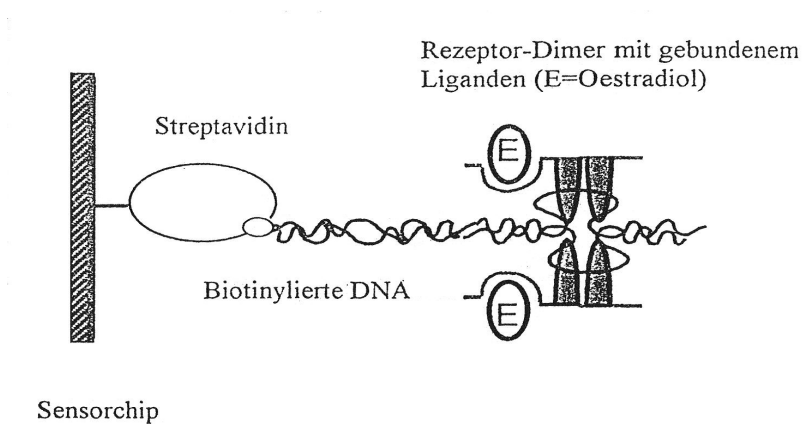


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Testprinzips beim DNA-Bindungsassay [65].

Fluoreszenzpolarisation

Die Fluoreszenzpolarimetrie nimmt unter den Bindungsassays eine besondere Stellung ein, weil sie eine schnelle und direkte Messung von estrogenartig wirksamen Substanzen sogar bei Anwesenheit von freien Liganden ermöglicht [152]; eine Abtrennung der ungebundenen Liganden vor der Messung ist im Gegensatz zum ELRA-Test nicht notwendig. Gemessen wird die Fähigkeit einer estrogen wirkenden Substanz, den fluoreszierenden Liganden durch Bindung an den Estrogenrezeptor aus dem Liganden-Rezeptor-Komplex zu verdrängen [128,153].

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Natürliche Estrogene und andere hormonell aktive Substanzen, die über kommunale oder industrielle Abwässer in eine Kläranlage gelangen, werden dort oft nur teilweise

oder gar nicht abgebaut [74,75,86,91] und so über das Abwasser des Kläranlagenablaufs in die Oberflächengewässer eingetragen. Für einige wenige Substanzen, die in verschiedenen Testsystemen (*in vivo* und/oder *in vitro*) als eindeutig estrogenartig wirksam eingestuft worden sind, liegen bereits Ergebnisse aus quantitativen Untersuchungen in Fließgewässern und im Abwasser von Kläranlagenabläufen vor [9,12,13,31,41,53,72,74,75,87,89-91,93,94,99,116,154-183]. Die Datenlage ist zur Zeit aber alles andere als vollständig.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird daher ein allgemein anwendbares Verfahren zur Extraktion und quantitativen strukturspezifischen Analyse verschiedener Klassen estrogenartig wirksamer Substanzen im Abwasser von Kläranlagenabläufen ausgearbeitet und optimiert. Dazu werden in einem Screening-Programm 21 Abwasserproben aus Kläranlagenabläufen in Baden-Württemberg durch kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC-MS) auf ihren Gehalt an ausgewählten hormonell wirksamen Substanzen untersucht.

Es ist jedoch wichtig, nicht nur die Konzentrationen estrogenartig wirksamer Substanzen in aquatischen Umweltkompartimenten zu bestimmen, sondern auch die Wirkungen dieser Verbindungen auf unterschiedliche biologische Testsysteme oder ganze Organismen zu untersuchen. Unabhängig von der vorliegenden Arbeit wurden daher an der Universität Tübingen sämtliche aufgearbeiteten Abwasserproben mit einem biologischen Wirkungstest (E-Screen-Assay) auf ihre estrogenen Gesamtaktivität getestet. Die Ergebnisse sollen in der vorliegenden Arbeit mit den GC-MS-Analysendaten verglichen werden. Das Abwasser eines Kläranlagenablaufs mit besonders auffälligen Werten wurde hinsichtlich seiner estrogenen Gesamtaktivität und der Konzentrationen hormonell aktiver Substanzen im zweiten Teil der Arbeit durch Fraktionierung der Probe detaillierter untersucht; dabei wurde sowohl der Beitrag der einzelnen Fraktionen zur estrogenen Gesamtaktivität als auch die Konzentrationen estrogen wirkender Verbindungen in den einzelnen Fraktionen ermittelt.

Die Konzentrationen estrogenartig wirksamer Substanzen in der aquatischen Umwelt sind neben den Eintragsmengen auch von der Abbaubarkeit und Elimination abhängig. Deshalb werden an ausgewählten Einzelsubstanzen, die während des Screenings in relativ hohen Konzentrationen im Abwasser von Kläranlagenabläufen gefunden wurden, Eliminationsversuche im umweltrelevanten Konzentrationsbereich durchgeführt.

2 Entwicklung eines Screening-Protokolls für estrogenartig wirksame Verbindungen im Abwasser

2.1 Auswahl der Komponenten für das Screening-Protokoll

Bei der Auswahl der zu untersuchenden Verbindungen wurden möglichst viele strukturell unterschiedliche Stoffgruppen mit estrogenen Aktivität berücksichtigt. So sollte gesichert werden, dass das optimierte Untersuchungsverfahren jederzeit auf weitere – in diesem Zusammenhang noch nicht berücksichtigte – Verbindungen ausgedehnt werden kann. Die untersuchten Proben aus Kläranlagenabläufen wurden auf 13 bzw. bei den Wiederholungsbeprobungen auf 15 verschiedene Verbindungen mit estrogenen Wirkung analysiert. Diese sind in Tab. 1 zusammengestellt und in Abb. 21a und 21b mit ihren Strukturformeln charakterisiert.

Tabelle 1: Zusammenstellung der in das Screening einbezogenen Verbindungen.

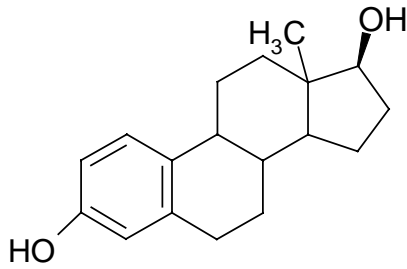
Stoffgruppen	Verbindungen	Summenformeln	CAS-Nr.	Mol.-Massen (g / mol)
Natürliche	17 β -Estradiol (E2)	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	50-28-2	272,4
Estrogene	Estron (E1)	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	53-16-7	270,4
Synthetische	Mestranol	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	72-33-3	310,4
Estrogene	17 α -Ethinylestradiol (EE2)	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	57-63-6	296,4
Phyto- und Mykoestrogene	β -Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	83-46-5	414,7
	Genistein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	446-72-0	270,2
	Zearalenon ^a	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	17924-92-4	318,4
	α -Zearalenol ^a	C ₁₈ H ₂₄ O ₅	26538-44-3	320,4
Xenoestrogene	4-Nonylphenol ^b (NP)	C ₁₅ H ₂₄ O	84852-15-3	220,4
	4-Nonylphenoxyessigsäure ^b (NP1EC)	C ₁₇ H ₂₆ O ₂	003115-49-9	278,4
	4-Nonylphenoldiethoxylat ^b (NP2EO)	C ₁₉ H ₃₂ O ₃	9016-45-9	308,3
	Bisphenol A	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	80-05-7	228,3
	Benzyl-n-butylphthalat (BBP)	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	85-68-7	312,4
	Di-n-butylphthalat (DBP)	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	84-74-2	278,4
	α -Endosulfan ^c	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	115-29-7	406,9
	4-tert-Oktylphenol ^a (OP)	C ₁₄ H ₂₂ O	140-66-9	206,3

^a Verbindung wurde erst bei den Wiederholungsbeprobungen bestimmt; ^b Isomerengemisch;

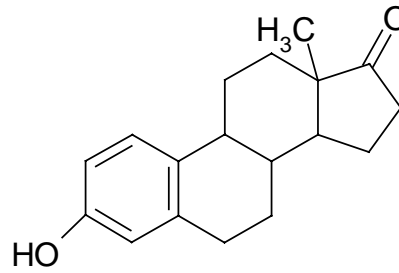
^c Verbindung wurde bei den Wiederholungsbeprobungen nicht mehr bestimmt.

Natürliche Estrogene:

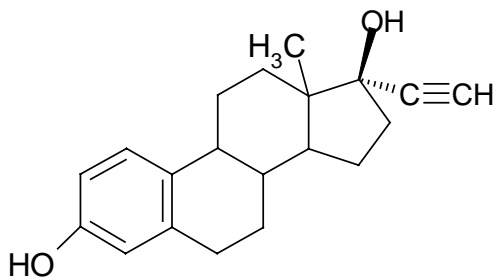
- 17 β -Estradiol:



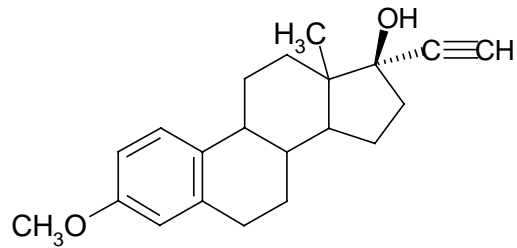
- Estron:

**Synthetische Estrogene:**

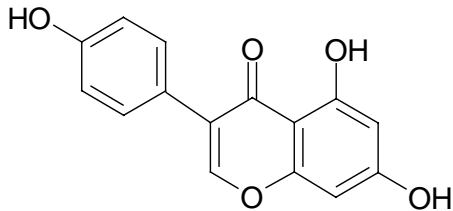
- 17 α -Ethinylestradiol:



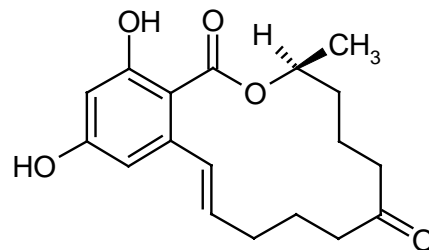
- Mestranol:

**Phyto- und Mykoestrogene:**

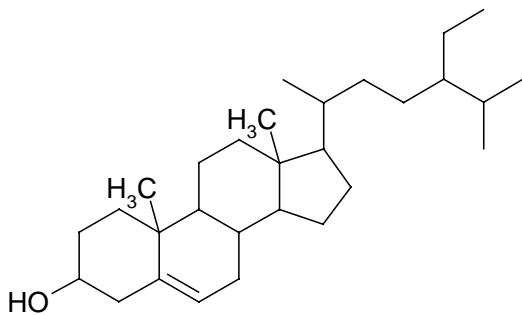
- Genistein:



- Zearalenon:



- β -Sitosterol:



- α -Zearalenol:

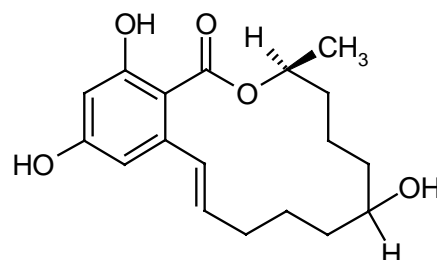
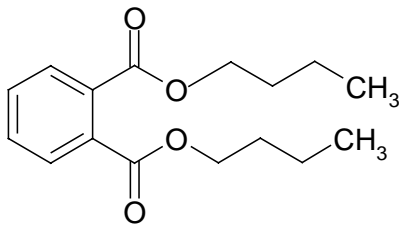


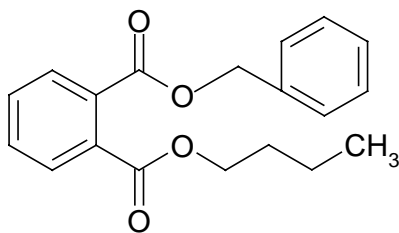
Abbildung 21a: Strukturformeln der ausgewählten Verbindungen (natürliche und synthetische Estrogene, Phyto- und Mykoestrogene).

Xenoestrogene:

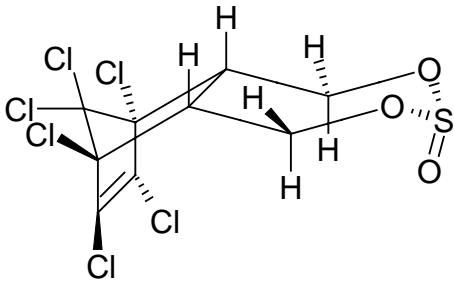
- Di-n-butylphthalat:



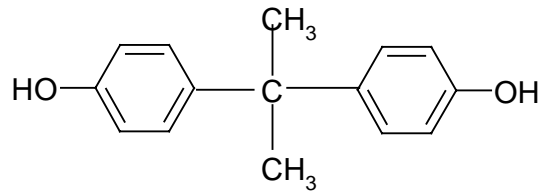
- Benzyl-n-butylphthalat:



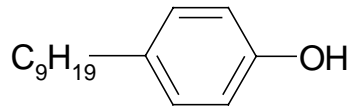
- α -Endosulfan:



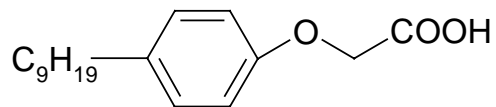
- Bisphenol A:



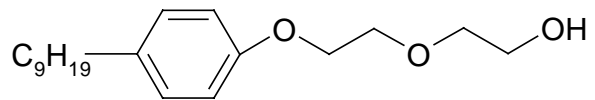
- 4-Nonylphenol ^a:



- 4-Nonylphenoxyessigsäure ^a:



- 4-Nonylphenoldiethoxylat ^a:



- 4-*tert*-Oktylphenol:

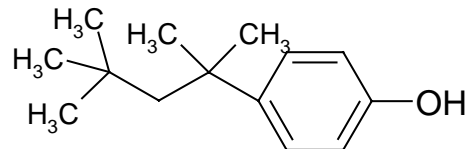


Abbildung 21b: Strukturformeln der ausgewählten Verbindungen (Xenoestrogene); ^a Isomerenmisch.

Aus der Gruppe der *natürlichen Estrogene*, die schon in geringsten Konzentrationen eine hohe estrogene Potenz aufweisen, wurden das weibliche Sexualhormon 17 β -Estradiol und der vor allem beim oxidativen Abbau von 17 β -Estradiol gebildete Metabolit Estron ausgewählt (Tab. 1, Abb. 21a). Estriol, ein weiterer Metabolit von 17 β -Estradiol, wurde nicht mit einbezogen, da die in der Literatur angegebenen Umweltkonzentrationen meist deutlich unter denen von 17 β -Estradiol bzw. Estron liegen [89,91]. Als Vertreter der *synthetischen Estrogene* wurden Mestranol und 17 α -Ethinylestradiol ausgewählt (Tab. 1, Abb. 21a). Letzteres ist mit 30-50 μ g in einer Kontrazeptiva-Tablette enthalten und stellt so den Hauptanteil eines potentiellen Ein-

trags dar. Beide Verbindungen wurden insbesondere wegen ihrer schlechten biologischen Abbaubarkeit in das Screening einbezogen (s. Kapitel 1.2.2).

Unter den *Phytoestrogenen* wurde stellvertretend für die Flavonoide das Isoflavon Genistein ausgewählt, das in beträchtlichen Konzentrationen in Soja und Sojaprodukten vorkommt, aber auch in Kleesorten und anderen Pflanzen vorhanden ist [69]. Das ebenfalls in Pflanzen enthaltene β -Sitosterol weist ein den Estrogenen sehr ähnliches Steroidgerüst auf und wird bei der Papierherstellung freigesetzt (s. Kapitel 1.2.4). Die strukturell recht unterschiedlichen Phytoestrogene Genistein und β -Sitosterol (Tab. 1, Abb. 21a) wurden bereits in verschiedenen Matrices in signifikanten Konzentrationen gefunden [89,184]; ihre estrogene Wirkung ist mit zahlreichen Testsystemen gesichert [38,64,185].

Bei der wiederholten Beprobung einzelner Kläranlagenabläufe wurden zusätzlich die Mykoestrogene Zearalenon und α -Zearalenol bestimmt (Tab. 1, Abb. 21a), die durch Schimmelpilze im Getreide gebildet werden [69] und *in vitro* wie *in vivo* eine deutliche estrogene Wirkung aufweisen [39]. Mit der Bestimmung dieser beiden Verbindungen sollte gezeigt werden, dass sich das eingesetzte Analyseverfahren auch auf strukturell völlig andersartige Verbindungen direkt übertragen lässt.

Die meisten für das Screening ausgewählten Verbindungen gehören zur Gruppe der Xenoestrogene. Sie wurden aufgrund einer breit angelegten Literaturrecherche unter dem Gesichtspunkt ausgesucht, dass sie ein möglichst breites Strukturspektrum abdecken und ihnen lediglich die estrogene Wirkung und das Vorkommen in der aquatischen Umwelt gemeinsam ist.

Großtechnische Produkte und ihre Abbauprodukte

Bisphenol A wurde vor allem wegen der hohen Produktionsmenge (allein in Deutschland 200 000 Tonnen jährlich) einbezogen [99-101]. Trotz der relativ guten Abbaubarkeit [72] und einer nur schwach estrogenen Wirkung, die in zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Tests nachgewiesen wurde [69], stellt Bisphenol A somit eine vor allem für die aquatische Umwelt relevante Verbindung dar (Tab. 1, Abb. 21b). Unter den großtechnisch hergestellten Phthalsäureestern finden sich ebenfalls estrogenartig wirksame Verbindungen; daher wurden Di-n-butyl- und Benzyl-n-butylphthalat (Tab. 1, Abb. 21b), die zumindest *in vitro* eine estrogene Wirkung zeigen [60], in das Screening einbezogen.

Auf die Gruppe der Alkylphenolpolyethoxylate und ihrer Abbauprodukte wird im Rahmen der Abbauuntersuchungen näher eingegangen (s. Kapitel 4). Für das Screening wurden 4-Nonylphenol, 4-Nonylphenoldiethoxylat und 4-Nonylphenoxyessigsäure als wichtige Abbauprodukte der 4-Nonylphenolpolyethoxylate ausgewählt; bei den Wiederholungsbeprobungen wurde zusätzlich 4-*tert*-Oktylphenol, ein Abbauprodukt der Oktylphenolpolyethoxylate, bestimmt. Für alle diese Verbindungen (Tab. 1, Abb. 21b) ist eine estrogenartige Wirksamkeit gesichert.

Pflanzenschutzmittel

Das Organochlorinsektizid Endosulfan (Tab. 1, Abb. 21b und 22) wird weltweit im Baumwollanbau und zur Bekämpfung von Stechmücken wie der Tse-Tse-Fliege eingesetzt. In Deutschland ist die Ausbringung von Endosulfan zwar seit mehreren Jahren verboten, doch ist diese Verbindung aufgrund ihrer Persistenz, die sich aus dem hohen Chlorierungsgrad (6 Chloratome) ableitet, mit hoher Wahrscheinlichkeit noch in der Umwelt vorhanden. Über die estrogenische Wirkung von Endosulfan herrscht bislang noch keine Klarheit. Neben einigen positiven *in vitro*-Testergebnissen [95,115,186] existieren *in vivo* und *in vitro* auch widersprüchliche Befunde [186-188]. Der Haupteintragspfad für Pflanzenschutzmittel in Oberflächengewässer liegt weniger im Kläranlagenablauf als vielmehr im Oberflächenabfluss intensiv landwirtschaftlich genutzter Flächen, die noch Endosulfan-Reserven im Boden enthalten oder wo der Stoff trotz des Verbotes noch ausgebracht wird. Vor allem aber wurde Endosulfan wegen seiner von den übrigen Verbindungen abweichenden Struktur in das Screening einbezogen. Das bei der Diels-Alder-Reaktion aus Hexachlorcyclopentadien und *cis*-2-Buten-1,4-diol gebildete Endosulfandiol wird mit Thionylchlorid zu einem Gemisch der beiden Stereoisomeren α - und β -Endosulfan umgesetzt (Abb. 22); ersteres wurde wegen seiner größeren Stabilität in der Umwelt in das Screening aufgenommen.

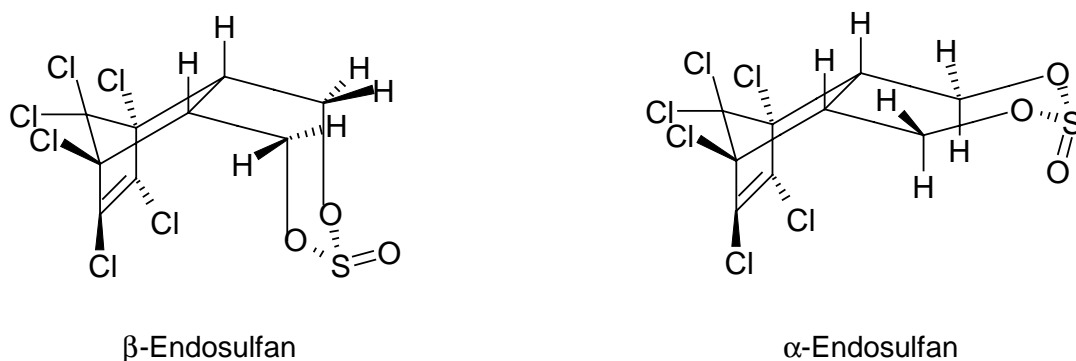


Abbildung 22: Bei der Herstellung aus Endosulfandiol gebildete Stereoisomere von Endosulfan.

2.2 In der Literatur beschriebene analytische Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung hormonell aktiver Verbindungen

Eine vollständige Zusammenstellung aller bislang zur Identifizierung und Quantifizierung hormonell aktiver Verbindungen in unterschiedlichen Matrizes beschriebenen Analyseverfahren ist nicht möglich. Der folgende Überblick beschränkt sich daher auf die grundsätzlich verwendeten Verfahrensschritte und die eingesetzten analytischen Methoden. Seit kurzem wird zwar versucht, mit sogenannten Multianalyt-Verfahren strukturell unterschiedliche Substanzgruppen gleichzeitig zu erfassen, doch sind die in der verfügbaren Literatur beschriebenen Methoden zumeist auf die Entwicklung von Analyseverfahren für strukturell ähnliche Verbindungen beschränkt. Deshalb ist dieser Überblick über die Verfahren ebenfalls nach Substanzgruppen eingeteilt.

2.2.1 Verfahren zur Bestimmung von Steroidhormonen

Die Analytik von Steroidhormonen erfordert wegen der starken estrogenen Wirkung Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im unteren ng / L- bis oberen pg / L-Bereich, so dass empfindlichste Methoden der organischen Spurenanalytik eingesetzt werden müssen. Die Mehrzahl der beschriebenen Verfahren benutzt die Kopplung von Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC-MS), vorzugsweise im SIM-Modus (*Selected Ion Monitoring*); in neuerer Zeit dringt aber auch die Kopplung von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie (HPLC-MS) immer mehr in diesen extremen Spurenbereich vor. GC- oder LC-MS/MS (Tandem-Massenspektrometrie) stellen aufgrund ihrer hohen Selektivität eine konkurrenzfähige Alternative dar.

Die Sorptionstendenz von Steroidhormonen ist sicherlich geringer als beispielsweise die von Alkylphenolpolyethoxylaten (s. Kapitel 2.2.2); trotzdem sollte die Probennahme prinzipiell in Glasgefäßen durchgeführt werden. Teilweise werden sogar silanisierte Glasgefäße verwendet [189]. Bei der Analyse auf Steroidhormone sollte und wird bei Kläranlagenzu- und abläufen mit 24h-Mischproben gearbeitet [89,159,190,191], während bei Trink- oder Oberflächenwasser eher auf Stichproben zurückgegriffen werden kann [89, 191]. Die Aufarbeitung der Proben erfolgt zum Teil direkt nach Probennahme vor Ort [160] oder innerhalb von 48 Stunden [91,159,190,191]. Als Konservierungsmethoden dienen die Behandlung mit Formaldehyd [159], die Aufbewahrung bei 4 °C

[189,191] und das Einfrieren der Proben [161]. Die Anreicherung von Steroidhormonen zur Analyse von Abwasser oder Flusswasser wird zumeist an *Reversed Phase*(RP)-C18-Material durchgeführt [87,89,91,159,189,191,192]; daneben kommen aber auch andere Materialien wie Lichrolut EN [89,91,191,162], Carbograph [163] und Aminosäulen [161] zum Einsatz.

Bei einer GC-MS- oder GC-MS/MS-Analyse ist der eigentlichen Messung meist ein Derivatisierungsschritt vorgeschaltet, u.a. mit Reagenzmischungen zur Silylierung freier Hydroxylgruppen [87,89,91,161,162,189,192]; daneben sind andere Derivatisierungsverfahren beschrieben [159,191]. Die Identifizierung und Quantifizierung der derivatisierten Steroidhormone erfolgt bei GC-MS-Verfahren zumeist im SIM-Modus anhand charakteristischer Molekül- bzw. Fragmentationen [87,159,162,190,192], bei GC-MS/MS-Verfahren durch Auswahl entsprechender Produktionen [91,189].

Bei der Bestimmung von Steroidhormonen mit LC-MS oder LC-MS/MS direkt aus wässriger Matrix erübrigt sich eine Derivatisierung. Lopez de Alda *et al.* haben mit einem LC-Verfahren durch Kombination von DA(Dioden-Array)- und MS-Detektion natürliche und synthetische Estrogene in unterschiedlichen aquatischen Matrices wie Kläranlagenzu- und abläufen mit hoher Selektivität bestimmt; die Nachweisgrenzen sowohl für die DA- wie die MS-Detektion lagen allerdings nur im mittleren bis oberen ng / L-Bereich [191]. Auch mit LC-MS/MS wurden Estrogene in Abwasser- und Flusswasserproben nachgewiesen [190]. Lagana *et al.* beschreiben beim Vergleich mit einem GC-MS-Verfahren eine um den Faktor 5 höhere Sensitivität (Nachweisgrenze 1 gegenüber 5 ng / L) des LC-MS/MS-Verfahrens [190]. Zur Quantifizierung von Steroidhormonen werden neben externen vor allem interne Standards verwendet z.B. deuteriertes 17 β -d₂-Estradiol [89,191], aber auch Methyltestosteron [192] und 17 β -Estradiol-17-acetat [87,91]. Kelly *et al.* haben mehrere deuterierte Estrogene gleichzeitig als interne Standards zur Quantifizierung der jeweiligen Steroidhormone eingesetzt [189].

2.2.2 Verfahren zur Bestimmung von Alkylphenolpolyethoxylaten (APnEO) und ihren Abbauprodukten

Probennahme, Aufbewahrung und Extraktion

Da APnEO und ihre Eliminationsprodukte vor allem an Matrices wie Klärschlamm, Sedimente und Böden gut sorbiert werden, müssen vor der Analyse, d.h. direkt nach der Probennahme interne Standards zugesetzt werden. Giger *et al.* haben dazu be-

reits in den 80er Jahren u.a. 2,4,6-Tribromphenol, 4-n-Nonylphenol und 2,4,6-Tri-methylphenol eingesetzt [154,193,194]; letzteres eignet sich vor allem als interner Standard für die HPLC-Analyse [155]. Das in der technischen Mischung isomerer 4-Nonylphenole nicht enthaltene 4-n-Nonylphenol diente zur Quantifizierung in der GC [193-195]. Um eine repräsentative Probenzusammensetzung zu sichern, sollte vor allem bei Kläranlagenzu- und abläufen mit 24h-Mischproben unter Verwendung auto-matischer Probennehmer gearbeitet werden. Die in Glasflaschen genommenen Pro-ben werden zumeist bei 4 °C nach Zusatz von 1 % Formaldehyd gelagert [156,196-199], manchmal auch nach Zusatz von Methylenchlorid mit Salzsäure auf pH 2 ange-säuert [200]. Kubeck *et al.* haben aber gezeigt, dass allein das Einfrieren von Fluss-wasserproben ausreicht, um diese für vier Wochen ausreichend zu konservieren [197].

Zur Extraktion der wässrigen Proben werden zumeist Festphasen- oder Flüssig/Flüssig-Extraktion angewendet; teilweise wird auch mit kombinierten Verfah-ren gearbeitet. Bei der Extraktion der APnEO und ihrer Abbauprodukte kommt häufig Amberlite (mit Divinylbenzol quervernetztes Styrol) zum Einsatz; dieses Material erlaubt eine sehr selektive Anreicherung aromatischer Verbindungen. Zur Elution werden u.a. Ace-ton/Wasser-Gemische [201], Diethylether und Methanol [202] verwendet. Daneben ist die Anreicherung von APnEO an Aktivkohle beschrieben [203-205], bei der chlorierte Lösungsmittel wie Methylenchlorid zur Elution eingesetzt werden sowie an Festphasen auf RP-C18-Basis, z.B. bei der Anreicherung von Meerwasser [199,206], gereinigtem und ungereinigtem Abwasser [207] und Flusswasser [208]. Marcomini *et al.* arbeiteten bei der Elution von RP-C18-Säulen mit Aceton [207], Blackburn *et al.* mit Ethylacetat und Dichlormethan [208]. Selbst Methanol ist zur Elution von RP-C18-Säulen be-schrieben [197], teilweise nach Ansäuerung der Proben mit Salzsäure auf pH 2 [198].

Flüssig/Flüssig-Extraktion wird gleichfalls zur Extraktion hydrophober organischer Ver-bindungen genutzt, wobei die Bandbreite der verwendeten Lösungsmittel von Dichlor-methan [154,209] über Hexan und Cyclohexan [210,211] bis zu Diethylether reicht [212]. Zur Extraktion aus festen Matrices wie Klärschlämmen, Böden und Sedimenten ist eine Vielzahl von Verfahren beschrieben [155-157,194,195,200,201,206, 213-217].

Identifizierung und Quantifizierung

Technische APnEO-Mischungen bestehen aus Homologen und Oligomeren mit Alkyl- und Ethoxylatketten unterschiedlicher Länge und erfordern zur Auftrennung in der HPLC sowohl polare Normalphasen als auch unpolare RP-Materialien. An Normalpha-

sensäulen erfolgt die Auftrennung durch Wechselwirkung mit der hydrophilen Ethoxylatkette, an RP-Materialien durch Wechselwirkung mit der hydrophoben Alkylkette, so dass APnEO, die sich nur in der Ethoxylatkettenlänge unterscheiden, hierbei in einem gemeinsamen Peak eluieren. Der aromatische Ring erlaubt UV- oder Fluoreszenzdetektion. Giger *et al.* haben bei zahlreichen Untersuchungen zur Bestimmung von APnEO und ihren Abbauprodukten in der aquatischen Umwelt Aminosilica-Säulen und UV-Detektion eingesetzt [155-157,218,219]. Die Bestimmung von APnEO und ihren Abbauprodukten mit Normalphasen-HPLC und Fluoreszenz-Detektion ist gleichfalls wiederholt beschrieben [158,220,221]. Zur Quantifizierung wird die externe oder interne Standardmethode verwendet, zum Teil auch unter Zuhilfenahme von *Response*-Faktoren geeigneter Standards, um die gerätetechnischen Empfindlichkeitsschwankungen zu ermitteln [155,218,221]. Marcomimi *et al.* haben in zahlreichen Untersuchungen vor allem Nonylphenolpolyethoxylate (NPnEO) und deren Abbauprodukte mit RP-HPLC und Fluoreszenz-Detektion sowohl mit externer Standardkalibrierung als auch mit dem Standardadditions-Verfahren quantifiziert [198,199,206,215].

In letzter Zeit wird zur Analyse von NPnEO die Flüssigkeitschromatographie zunehmend mit einem MS-Detektor gekoppelt (LC-MS). Mit dieser ebenso sensitiven wie selektiven Analysenmethode wurden Kläranlagenzu- und abläufe sowie Trinkwässer unter Verwendung eines internen Alkoholethoxylat-Standards untersucht [222]. So haben Di Corcia *et al.* mit LC-MS Kläranlagenabläufe auf Nonylphenoethoxycarbonsäuren, Eliminationsprodukte der NPnEO, analysiert [196].

Wegen der besseren gaschromatographischen Auftrennung wird zur Bestimmung von APnEO in variierenden Matrices häufig auch die GC-Analyse eingesetzt. Sie ist allerdings auf flüchtige Verbindungen beschränkt, d.h. auf APnEO mit weniger als vier (CH₂CH₂O)-Einheiten; insbesondere nach Silylierung können aber auch APnEO mit mehr (CH₂CH₂O)-Einheiten gaschromatographisch bestimmt werden. Mit GC gelingt nicht nur die Auftrennung nach Alkyl- und Ethoxylatkettenlänge, sondern auch der einzelnen Isomeren einer Homologenreihe. GC-MS-Verfahren dominieren wegen der hohen Selektivität und Sensitivität mehr und mehr die Analyse von APnEO und ihren Abbauprodukten in Umweltproben. Giger *et al.* haben kurzkettige NPnEO und Nonylphenol in Fluss- und Abwasser direkt ohne Derivatisierung identifiziert und über 2,4,6-Tribromphenol und n-Nonylbenzol als interne Standards quantifiziert; diese wurden direkt vor der GC-MS-Analyse zugegeben [154,223]. Durch Derivatisierung mit einer Mischung aus *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) und Trimethylchlorsilan

haben Rudel *et al.* mit GC-MS im SIM-Modus u.a. zahlreiche Abbauprodukte der APnEO im Abwasser und Grundwasser bestimmt; der interne Standard 2,4,6-Tribromphenol wurde hier bereits zu Beginn der Aufarbeitung zugesetzt [164]. Auch Alkylphenolethoxycarbonsäuren, weitere Abbauprodukte der APnEO, lassen sich nach Methylierung mit Diazomethan [223,224] oder Silylierung mit BSTFA [225] mit GC-MS quantifizieren. Die bislang beschriebenen Analyseverfahren zur Bestimmung von APnEO und ihren Abbauprodukten mit GC-MS in aquatischen Matrices sind in einem Review-Artikel von Thiele *et al.* [75] zusammengefasst.

2.2.3 Verfahren zur Bestimmung von Bisphenol A und Endosulfan

Für das in großen Mengen produzierte Bisphenol A werden zur Identifizierung und Quantifizierung in den zumeist wässrigen Proben in aller Regel GC-MS-Verfahren eingesetzt [99,164-167,226,227]. Da Bisphenol A eine einheitliche Verbindung ist und die Bestimmungsgrenze auch nicht bis in den unteren ng / L-Bereich reichen muss, ist die Analytik hier unproblematisch. Probennahme und Aufbewahrung sollten aber auch bei Bisphenol A wie oben beschrieben erfolgen (s. Kapitel 2.2.1 und 2.2.2), obgleich Bisphenol A weder stark sorbiert noch so leicht abgebaut wird wie 17 β -Estradiol. In der Literatur wird für bei 4 °C dunkel aufbewahrte wässrige Proben (z.B. Kläranlagenabläufe) eine Aufarbeitung innerhalb von vier Wochen als ausreichend erachtet [165]. Zur Anreicherung sind Flüssig/Flüssig-Extraktion [164,165,227] wie Festphasenextraktion über RP-C18-Säulen [99,166,167,226] bekannt. Rudel *et al.* bestimmten in Abwasser- und Grundwasserproben Bisphenol A gemeinsam mit zahlreichen APnEO und deren Abbauprodukten mit GC-MS nach Flüssig/Flüssig-Extraktion und Silylierung über den gemeinsamen internen Standard 2,4,6-Tribromphenol [164]. Oftmals werden bei Untersuchungen auf Bisphenol A die deuterierten Analogen Bisphenol A-d₈ und Bisphenol A-d₁₆ als interne Standards eingesetzt [165-167], daneben aber auch Biphenyl [226] und Anthracen-d₁₀ [99].

Endosulfan, ein Vertreter der chlorhaltigen Pflanzenschutzmittel, wird ebenfalls zumeist über die GC [228-231] oder GC-MS [232-236] bestimmt. Zur Extraktion aus wässrigen Proben werden Flüssig/Flüssig- [232] oder Festphasenextraktion [237] eingesetzt. Die Quantifizierung von Endosulfan erfolgt entweder über externe [237] oder interne [232] Standards.

2.2.4 Verfahren zur Bestimmung von Phyto- und Mykoestrogenen

Zur Bestimmung von pflanzlichen Verbindungen mit estrogenen Wirkung (Flavonoide, Sterole und Resorcyllsäurelactone) sind in der Literatur unterschiedliche Methoden angegeben, insbesondere HPLC mit UV-, Fluoreszenz- oder elektrochemischer Detektion [238-240], daneben aber auch GC-MS-Verfahren (nach Silylierung) [241,242] und Immunoassays [243,244]. In neuester Zeit sind auch LC-MS- und LC-MS/MS-Verfahren beschrieben [245-249].

Franke *et al.* haben in verschiedenen Gemüsesorten nach Aufarbeitung über HPLC an RP-C18-Säulen zahlreiche Isoflavone wie Genistein und Daidzein mit DAD unter Verwendung von Flavon als internem Standard bestimmt [250]. Barnes *et al.* wiesen Genistein und Genistin mit LC-MS in zahlreichen biologischen Matrices wie Blut, Urin und Soja-Nahrung nach [251]. Ein Verfahren zur Bestimmung von zahlreichen Phyto- und Mykoestrogenen in Wasser mit LC-MS/MS haben Ternes *et al.* erst 2000 vorgestellt [249]; nach Extraktion über RP-C18-Festphasen wurden u.a. Zearalenon, Zearalenol, Genistein und Daidzein identifiziert und quantifiziert.

Sterole wie β -Sitosterol und Cholesterol wurden von Mudge *et al.* mit GC-MS nach Silylierung in zahlreichen Sedimentproben bestimmt [252]. In ihrer bereits mehrfach zitierten Untersuchung [89] haben Stumpf *et al.* neben natürlichen und synthetischen Estrogenen auch β -Sitosterol in 20 Kläranlagenabläufen und mehreren Fließgewässern nach Extraktion über RP-C18- oder Lichrolut-EN-Material und Silylierung über GC-MS nachgewiesen [89]. Weitere Arbeiten beschreiben die GC-MS-Analyse von Abwasser- [168] und Sedimentproben [253] auf β -Sitosterol (nach Silylierung). Quemener *et al.* [168] haben natürlich nicht vorkommendes Cholestan als internen Standard eingesetzt, Fattore *et al.* [253] bei der Analyse von Sedimentproben einen speziellen deuterierten Standard (d_4 - 5β -Cholestanol).

Zöllner *et al.* [254] haben das Resorcyllsäurelacton Zearalenon in pflanzlichen Materialien wie Gerste und Mais mit LC-MS/MS quantifiziert und dabei natürlich nicht vorkommendes Zearalanon als internen Standard eingesetzt. Sie erhielten mit zwei verschiedenen Extraktionsverfahren, der Anreicherung auf RP-C18- und Immunoaffinitätssäulen, vergleichbare Ergebnisse. Zur Bestimmung von Zearalenon im unteren $\mu\text{g} / \text{kg}$ -Bereich wurde bislang meist die RP-HPLC mit Fluoreszenz-Detektion verwendet; daneben ist aber auch UV-Detektion mit DAD möglich [255]. Ternes *et al.* analysierten wässrige Proben mit LC-MS/MS auf Zearalenon, Zearalenol und zahlreiche

Phytoestrogene nach Anreicherung an handelsüblichen RP-C18-Phasen [249]. Daneben finden sich in der Literatur aber auch GC-MS-Methoden zur Analyse auf Mykoestrogene [242].

2.2.5 Verfahren zur Bestimmung von Phthalaten

Da Phthalate als Weichmacher heutzutage ubiquitär verbreitet sind, stellt die nachträgliche Kontamination von Proben ein großes Problem bei der Analyse dar. Besonders Di-(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP), Dibutylphthalat (DBP) und Dimethylpropylphthalat (DMPP) sind in zum Teil extrem hohem Anteil in vielen Plastikprodukten enthalten. So geben Brüll *et al.* [256] u.a. folgende Kontaminationsquellen an: Fußböden (nach Reinigung), Luft, Ablagerungen auf Glasgeräten, Septen von Gaschromatographen sowie zur Aufarbeitung der Proben eingesetzte Chemikalien. Auf Chemikalien- oder Probennahmegefäße mit Kunststoffverschlüssen ist prinzipiell zu verzichten, da die meisten Kunststoffmaterialien Phthalate als Weichmacher enthalten.

Nach einer speziellen Anreicherung an RP-C18-Material haben Brüll *et al.* zahlreiche Phthalate mit GC-MS in verschiedenen aquatischen Matrices wie dem Abwasser von Kläranlagenzu- und abläufen quantifiziert und dabei sowohl mit deuterierten Analogen zur Ermittlung der Wiederfindung als auch mit externer Kalibrierung zur Quantifizierung der Phthalate gearbeitet [256]. In einer anderen Untersuchung wurden mit Festphasenmikroextraktion und GC-MS Phthalate in Fluss- und Hafenwasserproben nachgewiesen [169]. Über on-line-Kopplung einer RP-HPLC an GC-MS haben Hyötyläinen *et al.* u.a. DBP und DEHP in Oberflächen- und Trinkwasser bestimmt [170].

2.2.6 Multianalyt-Verfahren

Im Vergleich zu den für bestimmte Substanzgruppen oder gar einzelne Substanzen entwickelten Analyseverfahren sind nur wenige echte Multianalyt-Verfahren beschrieben. Ternes *et al.* [249] haben eine Methode zur simultanen Bestimmung zahlreicher Phyto- und Mykoestrogene entwickelt, u.a. von so unterschiedlichen Substanzen wie Genistein und Zearalenon. Auch Wegener *et al.* [87] setzten ihr GC-MS-Verfahren zur simultanen Detektion von Estrogenen, Androgenen, Gestagenen und Phytoestrogenen ein. Mit einer von Mol *et al.* entwickelten GC-MS-Methode wurden 17β -Estradiol und 17α -Ethinyloestradiol gemeinsam mit 4-Nonylphenol und Bisphenol A nach Silylierung in Oberflächenwasserproben detektiert [257]. Die gemeinsame Bestimmung verschie-

dener phenolischer Verbindungen ist gleichfalls beschrieben [164,226]. Holtey-Weber *et al.* entwickelten ein Verfahren, dessen Schwerpunkt in der on-line Silylierung von endokrin wirksamen Substanzen mit nachfolgender GC-MS/MS-Analyse lag; dabei wurden natürliche, pharmazeutisch genutzte synthetische Estrogene und Androgene sowie Bisphenol A und 4-Nonylphenol gemeinsam bestimmt [258]. Allerdings war das primäre Ziel dieser Verfahrensentwicklung die on-line Silylierung und nicht die Anwendung auf matrixbelastete Proben.

2.3 Entwicklung und Optimierung des eingesetzten GC-MS-Analyseverfahrens

Die Vorgabe für die Entwicklung des Analyseverfahrens bestand in der Bestimmung aller für das Screening ausgewählten Verbindungen über eine gemeinsame Analyse-methode (Multianalyt-Verfahren). Das Verfahren war so zu optimieren, dass eine Identifizierung und Quantifizierung sämtlicher Analyten in wässrigen, unterschiedlich matrixbelasteten Proben im umweltrelevanten Konzentrationsbereich durchgeführt werden kann. Da die ausgewählten estrogenartig wirksamen Verbindungen bereits sehr unterschiedliche Stoffgruppen mit verschiedenen physikalischen und chemischen Eigenschaften abdecken, war zu prüfen, ob das Verfahren auch für die Bestimmung weiterer organischer Spurenstoffe mit estrogenen Wirkung anwendbar ist (s. Kapitel 2.6.5). Gemeinsames Kriterium für die über dieses Verfahren zu bestimmenden Verbindungen sollte lediglich die estrogenen Wirkung und das Vorkommen in der aquatischen Umwelt sein.

Ein gemeinsames Analyseverfahren für die simultane Bestimmung unterschiedlichster organischer Spurenstoffe birgt natürlich das Risiko, dass zugunsten der gemeinsamen Analyse der Analyten Verfahrensparameter wie Wiederfindungsraten, Kalibriergeraden und Blindwerte sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen einzelner Substanzen als eher sekundär angesehen werden. Damit die ermittelten Konzentrationen aber nicht nur den Charakter von Orientierungswerten besitzen, war besonders auf die sichere und eindeutige Identifizierung und vor allem die Quantifizierung der Verbindungen zu achten.

Im Rahmen des Projektes „Eintrag, Verbleib und Verhalten von Sexualhormonen im Abwasser und Klärschlamm“ wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits ein Analyseverfahren zur Quantifizierung von Steroidhormonen im Abwasser etabliert [90]. Dieses

Verfahren wurde für die Bestimmung von Estrogenen optimiert und desweiteren so modifiziert, dass es auch für die Analyse der übrigen ausgewählten Verbindungen anwendbar ist (Abb. 23) [181].

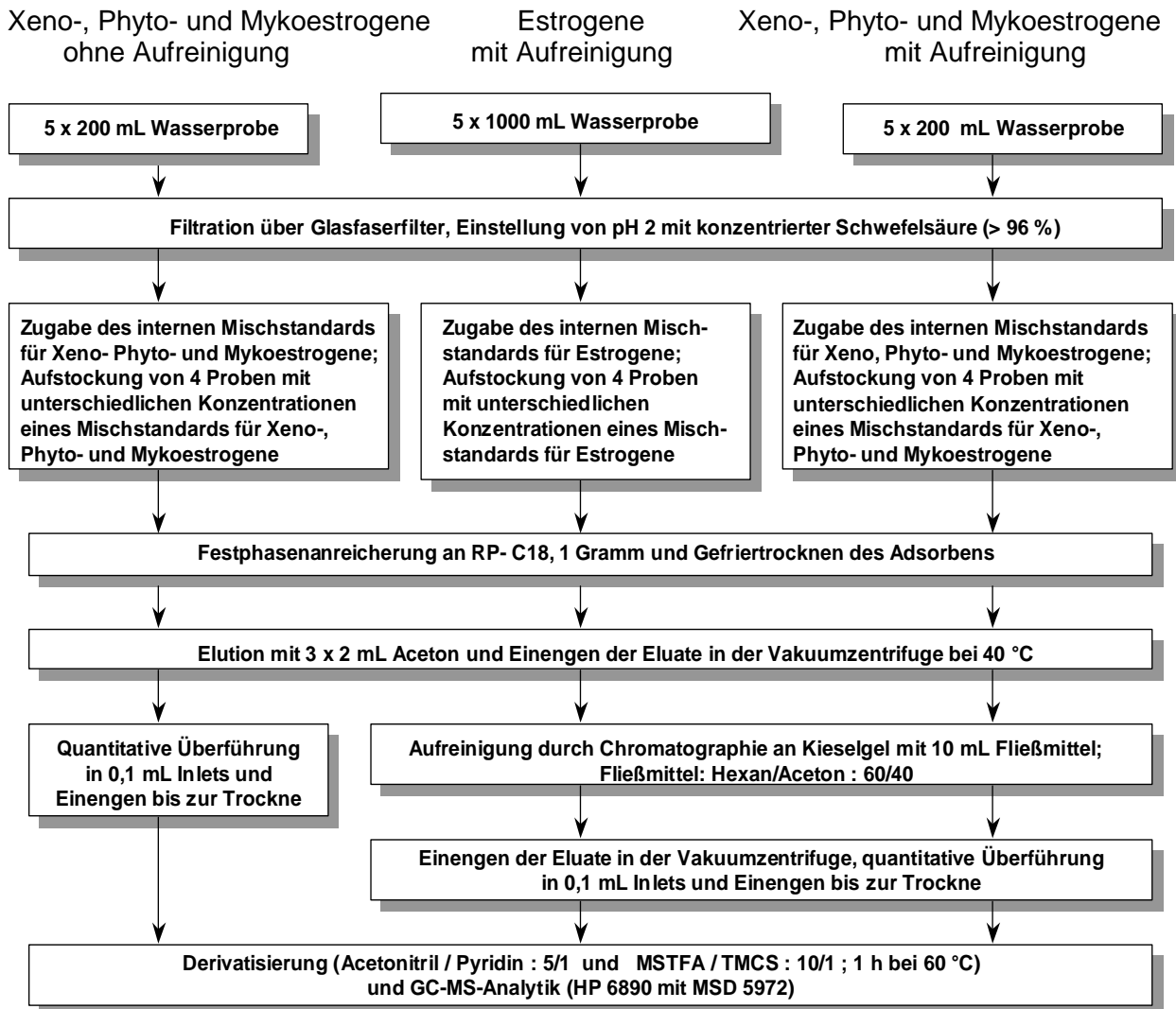


Abbildung 23: Analysenschema zur Bestimmung von Estrogenen und Verbindungen mit estrogenen Wirkung im Abwasser von Kläranlagenabläufen.

2.3.1 Material und Methoden

Im Folgenden sind nur die Chemikalien und Geräte aufgeführt, die in dem hier entwickelten und beschriebenen Verfahren eingesetzt wurden. Die für den biologischen Wirkungstest (kurze Beschreibung s. Kapitel 2.4) benötigten Materialien sind den entsprechenden Veröffentlichungen von W. Körner *et al.* zu entnehmen [41,74, 259,260].

Chemikalien	Reinheit/Hinweise	Bezugsquelle
Benzyl-n-butylphthalat	98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
d ₄ -Benzyl-n-butylphthalat	98+ %, (ring-d ₄ , 98 %)	Promochem, Wesel
Bisphenol A [2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propan]	97 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bisphenol A-d ₁₆	98 Atom %	Sigma-Aldrich, Steinheim
4-Bromphenylelessigsäure	98 %	Fluka, Deisenhofen
5 α -Cholestan	98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Di-n-butylphthalat	99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
d ₄ -Di-n-butylphthalat	98+ %, (ring-d ₄ , 98 %)	Promochem, Wesel
α -Endosulfan	99,3 %	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
α -Endosulfan-d ₄	97 %	Promochem, Wesel
17 β -Estradiol	98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
d ₂ -Estradiol	98 Atom %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Estron	99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
17 α -Ethinylestradiol	98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Flavon	99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Genistein	synthetisch, 98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Irgacor NPA	techn. Isomerenmischung von 4-Nonylphenoxyessigsäure, > 99 %	Ciba Spezialitätenchemie, Lampertheim
Mestranol	keine Angaben	Sigma-Aldrich, Steinheim
N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid	99 %	Fluka, Deisenhofen
4-Nonylphenol	techn. Isomerenmischung, > 90 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
4-n-Nonylphenol	99,5 %	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
4-Nonylphenoxyessigsäure	Techn. Isomerenmischung, 90 %	Labor Jennifer Field, Oregon, USA
4-n-Oktylphenol	99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
4- <i>tert</i> -Oktylphenol	> 90 %	Fluka, Deisenhofen
β -Sitosterol	synthetisch, 95 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Synperonic NP 5	Mischung aus isomeren 4-Nonylphenoxyethoxylaten mit einer mittleren Kettenlänge von 5 Ethoxylateinheiten	ICI Surfactants, England
d ₅ -Tetradehydroestradiol	> 90 %	[90]
2,4,6-Tribromphenol	99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trimethylchlorsilan	99+ %, redestilliert	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zearalanon	keine Angaben	Sigma-Aldrich, Steinheim
α -Zearalenol	97 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zearalenon	keine Angaben	Sigma-Aldrich, Steinheim

Verbrauchsmaterialien	Spezifikationen	Hersteller
Aluminium Bördelkappe	farblos lackiert 5,6 mm Loch, PTFE rot / Silicon weiß / PTFE rot	Agilent Technologies, Waldbronn
Chromabond SiOH	1 g Festphasencartouche	Macherey & Nagel, Düren
Dichtung, goldbeschichtet	0,8 mm Öffnung für HP-Liner	Agilent Technologies, Waldbronn
Einsatz (100 µl) für Standardhals-Fläschchen	konisch, Polymerfeder, 5 x 28 mm	Alltech, Unterhaching
Glasfaserfilter	GF 6	Schleicher & Schuell
Graphit-Dichtung	1/16“, 0,45 mm ID (HP)	Agilent Technologies, Waldbronn
Graphit-Vespel-Dichtung	1/16“, 0,4 mm ID (HP)	Agilent Technologies, Waldbronn
Kapillarsäule	BPX 5 30 m, 0,25 µm Filmdicke; 0,22 mm ID	SGE, Weiterstadt
Liner (SSL)	Borosilikat, HP, 78,5 x 6,3 ; 4 mm ID, Taper, deaktiviert, Quarzwolle	Agilent Technologies, Waldbronn
Mega Bond Elut RP-C18	1 g Festphasencartouche	Varian, Darmstadt
Rollrandflasche	1,5 ml braun, weite Öffnung	Agilent Technologies, Waldbronn
Septen	Hochtemperatur (rot), 11 mm HTS 400	J & W Scientific Products, Köln
Spritze 10 µl gasdicht	F-Kanüle, AD 0,63 mm, Spitzenform (pst) cone	SGE, Weiterstadt
Viton O-Ring	für HP-Liner	Agilent Technologies, Waldbronn

Lösungsmittel	Reinheit	Bezugsquelle
Aceton	Lichrosolv [®]	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Seccosolv [®]	Merck, Darmstadt
Ethylacetat	99,8 %	Aldrich, Steinheim
n-Hexan	Suprasolv [®]	Merck, Darmstadt
Methanol	HPLC Gradient Grade > 99,8 % (GC)	Mallinckrodt-Baker B. V., Va Deventer, Niederlande
Pyridin	pro analysi > 99,5 % (GC)	Merck, Darmstadt
Reinstwasser	<i>Nanopure-ultrapure water system</i>	Barnstead, USA

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Absaugeeinheit	Vac Elut 20	Varian, Darmstadt
Analysenwaage	Research RC 210 P	Sartorius AG, Göttingen
Gaschromatograph	6890	Agilent Technologies, Waldbronn
Massenspektrometer	MSD 5972A	Agilent Technologies, Waldbronn
Gefriertrocknungsanlage (Drehschieberpumpe)	alpha 2-4 (RZ 2)	Martin Christ, Osterode am Harz (Vacuubrand, Wertheim)
Rotationsvakuumkonzentrator (Membran-Vakuum-Pumpe)	alpha (Vacuubrand)	Martin Christ, Osterode am Harz (Vacuubrand, Wertheim)
Vakuumpumpe	Heto SUE 300 Q	Laborfachhandel Bender & Hohbein, Ulm

2.3.2 Experimentelle Durchführung

Die Beprobungen wurden von August 1998 bis Mai 1999, die Wiederholungsbeprobungen von Oktober bis Dezember 1999 durchgeführt. Es wurden nur Tage mit geringem Regenwetterabfluss, aber keine reinen Trockenwettertage ausgewählt, um eine möglichst repräsentative und vergleichbare Belastung der Kläranlagenabläufe zu sichern. Alle Proben wurden als 24h-Mischproben gesammelt und bei + 5 °C dunkel in Glasflaschen gelagert. Die Aufarbeitung erfolgte innerhalb von zwei Wochen nach Probennahme.

Zur Analyse auf Phyto-, Myko- und Xenoestrogene reichten aufgrund der hinreichend hohen Konzentrationen im Abwasser von Kläranlagenabläufen Probenmengen von 200 mL pro Aufstockung aus. Die Bestimmung der Estrogene erforderte wegen der um einen Faktor 5-5000 geringeren Konzentrationen 1000 mL Probenvolumen. Jede Probe wurde zur Abtrennung der Schwebstoffe über einen Glasfaserfilter filtriert und in 16 Aliquots aufgeteilt (6 x 1000 mL, 10 x 200 mL), die mit konz. H₂SO₄ (> 96 %) auf pH 2 eingestellt wurden.

Zugabe der Mischstandards

Ein 1000 mL Aliquot wurde ohne Zusätze für den biologischen Wirkungstest aufgearbeitet. Die übrigen 15 Teilproben wurden nach der pH-Einstellung mit je 50 µL der entsprechenden internen Mischstandards entweder für Estrogene oder für Phyto-, Myko- und Xenoestrogene versetzt. Für die Standardaddition wurden ebenfalls 50 µL der entsprechenden Mischstandard-Lösungen für Estrogene bzw. für Phyto-, Myko- und Xenoestrogene zugesetzt (in je vier verschiedenen Konzentrationen). Alle Standards lagen als methanolische Lösungen der entsprechenden Verbindungen vor,

lediglich 5- α -Cholestan und 4-*tert*-Oktylphenol waren in Ethylacetat gelöst (Abb. 24, Tab. 2, 3a und 3b).

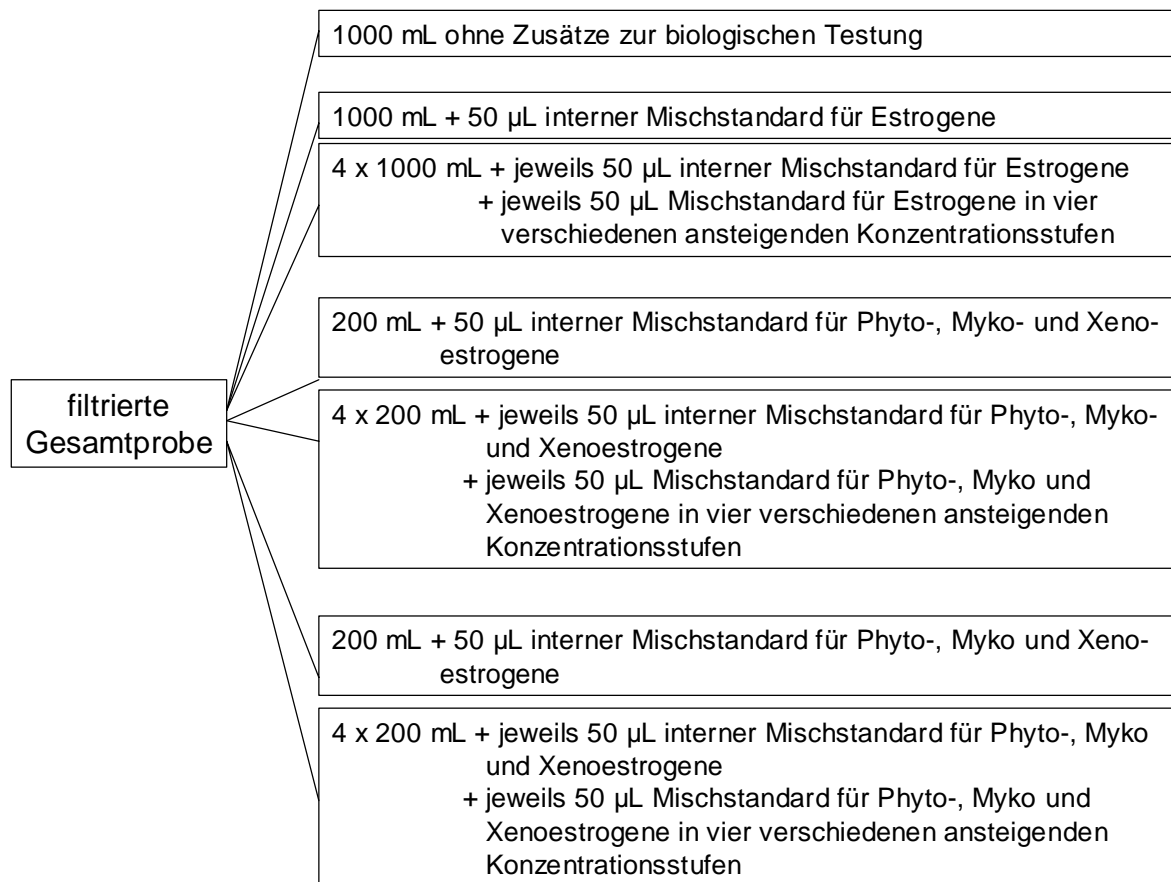


Abbildung 24: Schema für die Aufteilung einer Abwasserprobe zur biologischen Testung und zur GC-MS-Analyse nach Zugabe der internen Standards und Aufstocklösungen zur Standardaddition.

Extraktion, Trocknung und Elution

Zur Anreicherung der Proben dienten RP-C18-Festphasenextraktionssäulen (Mega Bond Elut, 1 g), die mit Hexan (6 mL), Aceton (6 mL) und bidestilliertem Wasser (12 mL) konditioniert wurden. Nach Anreicherung der wässrigen Proben wurden die Extraktionssäulen mindestens 12 Stunden lyophilisiert und mit Aceton (6 mL) eluiert. Durch Verwendung eines dipolar aprotischen Elutionsmittels sollte der Anteil an Matrixbestandteilen im Eluat deutlich geringer ausfallen als mit einem polar protischen Elutionsmittel wie Methanol, ohne dass signifikante Verluste bei den Analyten auftreten, die bei Verwendung eines unpolaren Elutionsmittels unumgänglich gewesen wären.

Tabelle 2: Konzentrationen der eingesetzten Komponenten in den internen Mischstandards für Estrogene bzw. für Phyto-, Myko- und Xenoestrogene in mg / L.

Komponenten	Konzentrationen bei den Erstbeprobungen	Konzentrationen bei den Wiederholungsbeprobungen
d ₂ -Estradiol	0,625	2,06
d ₅ -Tetradehydroestradiol	1,00	1,00
5- α -Cholestan	3,26	4,00
Flavon	0,787	4,99
Benzyl-n-butylphthalat-d ₄	2,11	2,92
Di-n-butylphthalat-d ₄	— ^a	24,3
Bisphenol A-d ₁₆	5,15	10,0
α -Endosulfan-d ₄	6,00	— ^a
4-n-Nonylphenol	3,92	3,99
4-Bromphenylelessigsäure	44,8	61,0
2,4,6-Tribromphenol	3,92	21,0
4-n-Oktylphenol	— ^a	5,23
Zearalanon	— ^a	4,00

^a Verbindung wurde bei den Erstbeprobungen bzw. bei den Wiederholungsbeprobungen nicht als interner Standard zugesetzt.

Tabelle 3a: Konzentrationen der eingesetzten Analyten in den einzelnen Aufstocklösungen des Mischstandards für Estrogene in mg / L ^a.

Analyten	erste Verdünnungs- stufe	zweite Verdünnungs- stufe	dritte Verdünnungs- stufe	vierte Verdünnungs- stufe
17 β -Estradiol	0,827 (0,841)	0,414 (0,421)	0,207 (0,210)	0,103 (0,105)
Estron	0,883 (1,01)	0,442 (0,505)	0,221 (0,253)	0,110 (0,126)
Mestranol	0,833 (0,955)	0,417 (0,478)	0,208 (0,239)	0,104 (0,119)
17 α -Ethinylestradiol	0,886 (0,856)	0,443 (0,428)	0,222 (0,214)	0,111 (0,107)

^a In Klammern sind die Konzentrationen der Analyten angegeben, wie sie im zugesetzten Mischstandard bei den Wiederholungsbeprobungen enthalten waren.

Tabelle 3b: Konzentrationen der eingesetzten Analyten in den einzelnen Aufstocklösungen des Mischstandards für Phyto-, Myko- und Xenoestrogene in mg / L ^a.

Analyten	erste Verdünnungs- stufe	zweite Verdünnungs- stufe	dritte Verdünnungs- stufe	vierte Verdünnungs- stufe
β-Sitosterol	18,2 (21,4)	9,10 (10,7)	4,55 (5,35)	2,28 (2,68)
Genistein	2,5 (2,99)	1,25 (1,5)	0,625 (0,749)	0,313 (0,374)
Di-n-butylphthalat	50,4 (40,3)	25,2 (20,2)	12,6 (10,1)	6,30 (5,04)
Benzyl-n-butyl- phthalat	9,73 (10,1)	4,86 (5,03)	2,43 (2,52)	1,22 (1,26)
Bisphenol A	5,26 (5,01)	2,63 (2,51)	1,32 (1,25)	0,658 (0,626)
α-Endosulfan	21,4 (— ^b)	10,7 (— ^b)	5,35 (— ^b)	2,68 (— ^b)
4-Nonylphenol ^c	70,9 (61,0)	35,5 (30,5)	17,7 (15,3)	8,86 (7,63)
4-Nonylphenoxy- essigsäure ^c	74,3 (72,0)	37,1 (36,0)	18,6 (18,0)	9,29 (9,00)
4-Nonylphenoldi- ethoxylat ^c	126 (102)	63,1 (50,5)	31,6 (25,3)	15,8 (12,6)
4- <i>tert</i> -Oktylphenol	— ^b (3,93)	— ^b (1,96)	— ^b (0,982)	— ^b (0,491)
α-Zearalenol	— ^b (2,98)	— ^b (1,49)	— ^b (0,746)	— ^b (0,373)
Zearalenon	— ^b (3,03)	— ^b (1,52)	— ^b (0,758)	— ^b (0,379)

^a In Klammern sind die Konzentrationen der Analyten angegeben, wie sie im zugesetzten Mischstandard bei den Wiederholungsbeprobungen enthalten waren.

^b Analyten waren bei den bei den Erstbeprobungen bzw. bei den Wiederholungsbeprobungen nicht in dem Mischstandard zur Standardaddition enthalten.

^c Isomerengemisch.

Aufreinigung, Derivatisierung und GC-MS-Messung

Die Aufreinigung (*Clean-up*) war zur Bestimmung einiger Phyto-, Myko- und Xenoestrogene ebenso wie bei sämtlichen Estrogenen unumgänglich. Bei der Probenvorbereitung von einzelnen stärker polaren Verbindungen wie 4-Nonylphenoxyessigsäure wurde kein *Clean-up* durchgeführt, da sie sich von den Kieselgelsäulen (SiOH, 1g) nicht mehr eluieren ließen oder Kontaminationsprobleme auftraten (s. Kapitel 2.6.2); in diesem Fall wurden die Proben ohne Aufreinigung analysiert. Aufgrund der relativ hohen Konzentrationen waren diese Substanzen im Abwasser der Kläranlagenabläufe dennoch problemlos quantifizierbar. Die übrigen Verbindungen wurden mit 10 mL Hexan/Aceton (60:40) nahezu quantitativ bei zugleich minimaler Matrixbelastung von der Aufreinigungssäule eluiert.

Die zur Trockne eingeeengten Extrakte wurden zur Derivatisierung mit einer Mischung aus Acetonitril (25 μL), Pyridin (5 μL), *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA, 18 μL) und Trimethylchlorsilan (TMCS, 2 μL) 1h bei 60 °C inkubiert. Die unaufgereinigten Extrakte wurden ebenfalls zur Trockne eingeeengt und mit der doppelten Menge der Derivatisierungsmischung umgesetzt (Abb. 25).

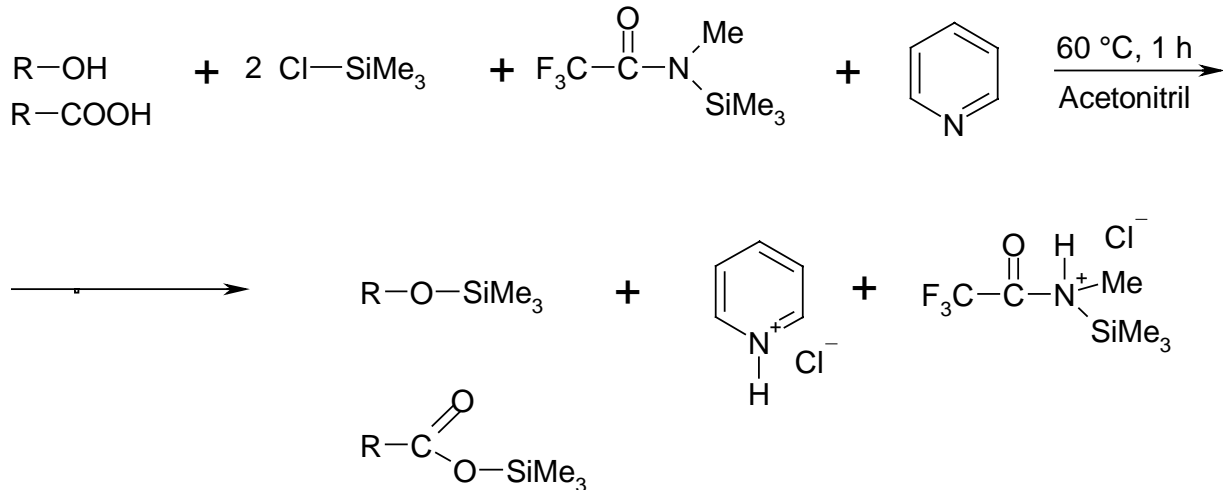


Abbildung 25: Reaktionsgleichung für die Derivatisierung der aufgearbeiteten Abwasserextrakte zur GC-MS-Analyse.

Da die Mehrzahl der untersuchten Verbindungen freie Hydroxylgruppen trägt, die durch Trimethylsilylierung geschützt werden müssen, und bei den beiden Phthalaten und α -Endosulfan die Nachweisempfindlichkeit durch den Derivatisierungsschritt nicht beeinträchtigt wird, wurden die Extrakte stets als Ganzes derivatisiert. Die chemische Stabilität der derivatisierten Extrakte (keine nennenswerte Hydrolyse der Silylether bzw. -ester) bei 4 °C wurde im Falle der Estrogene zu ≥ 36 h, sonst zu ≥ 48 h bestimmt. Dadurch waren automatisierte Messungen mit dem gekühlten Probenwechsler auch für größere Probenreihen möglich.

Die analytischen Messungen wurden an einem GC-MSD-Gerät der Firma Agilent Technologies (6890/5972 A) im SIM-Modus durchgeführt (Tab. 4); die einzelnen Verbindungen wurden jeweils über Retentionszeit, Basispeak und bis zu drei Qualifierionen identifiziert und quantifiziert (s. Kapitel 2.6.1).

Tabelle 4: Geräteparameter und gaschromatographische Analysebedingungen.

Injektionsvolumen	2 μ L, splitlos
Injektortemperatur:	280 °C
Säule	SGE BPX 5; 30 m; 0,25 μ m Filmdicke; 0,22 mm Innendurchmesser
Trägergas	1,0 mL / min (He, konstanter Fluss)
Temperaturprogramm	120 °C (2 min), 10 °C/min (190 °C, 0 min), 5 °C/min (330 °C, 5 min)
Detektion	Quadrupol-MS, Quellentemperatur 280 °C
Ionisation	Elektronenstoß-Ionisierung (EI), 70 eV

2.4 Biologische Analytik ^[#]

2.4.1 Beschreibung des Testsystems (E-Screen-Assay)

Zur quantitativen biologischen Bestimmung der estrogenen Aktivität von Einzelsubstanzen und Abwasserproben dient das estrogenabhängige Wachstum von estrogenrezeptor(ER)-positiven menschlichen Brustkrebszellen im Vergleich zu Kontrollen mit und ohne 17 β -Estradiol. Diese Wirkung in der Zellkultur entspricht dem Primäreffekt eines Estrogens im weiblichen Organismus (Mensch, Säugetier). Für einen solchen Proliferationstest wird die Verwendung der MCF-7-Brustkrebszelllinie wegen ihrer reproduzierbaren und stabilen Estrogenabhängigkeit empfohlen [97]. Soto *et al.* [95-97] haben diesen als „E-Screen“ bezeichneten *in vitro*-Test erstmals erfolgreich auf verschiedene Chemikalien angewandt, deren estrogene Wirkung am lebenden Tier bereits bekannt war.

Das Protokoll für den von W. Körner entwickelten E-Screen-Assay mit Abwasserproben ist in Abb. 26 schematisch dargestellt. Statt einer direkten Zellzählung wird dabei zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes am Ende der Inkubationsperiode die empfindliche Sulforhodamin B (SRB)-Färbung eingesetzt; für diese ist über einen weiten Bereich direkte Proportionalität zwischen Extinktion und Zellzahl gesichert [31,261]. Die Nachweisgrenze für das natürliche Substrat 17 β -Estradiol liegt in diesem Biotest bei etwa 10^{-12} mol / L (0,27 ng / L) nominaler Konzentration im Zellkulturmedium. Die Serumkonzentrationen von 17 β -Estradiol bei der erwachsenen Frau liegen je nach Zyklusphase bei 20-200 ng / L, d.h. zwei bis drei Größenordnungen über der Nachweisgrenze des E-Screen-Assays.

[#] Zusammengefasst in Anlehnung an die Habilitationsschrift von W. Körner, Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen [260].



Abbildung 26: Schema für die Durchführung des modifizierten E-Screen-Assays mit MCF-7-Zellen. Experimentalmedium: phenolrotfreies DME-Medium mit 5 % CD-FCS. CD-FCS ist fetales Kälberserum, welches nach Stanley *et al.* [262] mit dextranüberzogener Aktivkohle gestrippt wurde, um alle Steroidhormone einschließlich 17β-Estradiol zu entfernen.

2.4.2 Quantitative Auswertung

Einzelsubstanzen

Nach sechs Tagen wird der Test abgebrochen und die Zellzahl relativ zu der in einer hormonfreien Kontrolle bestimmt. Das Verhältnis der Zellzahl bei der Probe mit der jeweils höchsten Konzentration an 17β-Estradiol bzw. der Testsubstanz gegenüber der Negativkontrolle wird als *Proliferationseffekt (PE)* bezeichnet.

$$PE = \text{Zellzahl max. (Substanz)} / \text{Zellzahl (Negativkontrolle)}$$

Die estrogenen Aktivität einer Testsubstanz ist dann durch zwei Größen charakterisiert:

- Mit dem *relativen Proliferationseffekt (RPE)* wird die maximale durch 17β-Estradiol induzierbare mit der maximalen durch die Testsubstanz induzierbaren Proliferation in Beziehung gesetzt.

$$RPE = [PE_{\text{Testsubstanz}} - 1 / PE_{17\beta\text{-Estradiol}} - 1] * 100 \%$$

So werden vollständige Agonisten (RPE = 80-100 %) von partiellen (RPE = 25-80 %) und schwachen Agonisten (RPE = 10-25 %) unterschieden. Ein RPE < 10 % gilt als nicht signifikant [57].

- Der *Estradiol-Äquivalenzfaktor (EEF)* gibt die estrogenen Potenz einer Testsubstanz relativ zu 17 β -Estradiol an.

$$EEF = EC_{50} (17\beta\text{-Estradiol}) / EC_{50} (\text{Testsubstanz})$$

Der EEF ist als Quotient aus den jeweils halbmaximal wirksamen Konzentrationen (*effective concentration 50 %*, EC_{50}) von 17 β -Estradiol und der Testsubstanz definiert und somit für 17 β -Estradiol definitionsgemäß 1. Diese Berechnung der relativen estrogenen Potenz entspricht dem Konzept der Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) bei Dioxinen und dioxinähnlich wirkenden Verbindungen.

Aquatische Proben

Für die Untersuchung flüssiger Proben mit einem *in vitro*-Biotest auf bestimmte organische Stoffe, müssen diese ebenso wie bei den meisten Verfahren der chemischen Spurenanalytik zunächst aus der wässrigen Matrix extrahiert werden. Zur Extraktion von un- bis semipolaren Substanzen sind organische Lösungsmittel notwendig. Aufgrund der Zytotoxizität dieser Solventien können die Extrakte aber nicht direkt in die Zellkultur gegeben werden. Bei Kulturen von Säugerzellen beeinträchtigen Lösungsmittel in Konzentrationen bis 0,1 % im Kulturmedium im allgemeinen das Zellwachstums noch nicht.

Nach Aufarbeitung und Aufreinigung werden die Extrakte anders als für die GC-MS-Analysen nicht zur Trockne, sondern nur auf etwa 1 mL eingeeengt, um den Verlust von Substanzen durch irreversible Sorption auszuschließen. Anschließend wird Dimethylsulfoxid (DMSO, 50 μ L) zugesetzt und das niedrigsiedende Lösungsmittelgemisch (Hexan/Aceton) im Stickstoffstrom abgeblasen. Das hochsiedende DMSO weist einerseits gutes Lösungsvermögen für lipophile Substanzen auf, ist aber auch mit dem wässrigen Kulturmedium gut mischbar und so hervorragend als Lösungsvermittler geeignet.

Aufgrund von Untersuchungen mit definierten Gemischen [41] und den Ergebnissen von Soto *et al.* [95] kann man davon ausgehen, dass sich die estrogenen Wirkungen der einzelnen Stoffe in einer Probe in guter Näherung additiv verhalten. Aus den EC_{50} -Werten für die Probe und die Positivkontrolle mit 17 β -Estradiol lässt sich dann die 17 β -Estradiol-Äquivalentkonzentration (EEQ) für den Gesamtgehalt an estrogenartig wirksamen Substanzen in einem Extrakt direkt berechnen.

Bei Extrakten von *flüssigen* Proben entspricht der EC_{50} -Wert dem Verdünnungsvolumen, das sich theoretisch ergäbe, wenn der gesamte Extrakt mit Experimentalmedium so weit verdünnt wird, dass der Proliferationseffekt nur noch 50 % des ursprünglichen Wertes erreicht. Durch Division des Verdünnungsvolumens durch das ursprüngliche Volumen der Probe erhält man den EC_{50} -Wert als dimensionslosen Verdünnungsfaktor. Das Produkt aus diesem Verdünnungsfaktor und der EC_{50} für die Positivkontrolle ergibt dann die 17β -Estradiol-Äquivalente (EEQ) in der Probe in mol / L bzw. ng / L.

$$EEQ = EC_{50} (17\beta\text{-Estradiol}) * EC_{50} (Probe) \quad [\text{mol / L bzw. ng / L}]$$

Abb. 27 veranschaulicht dies beispielhaft anhand der mittleren Konzentrations-Wirkungs-Kurve ($n = 3$) für den Extrakt von 1 L Ablaufprobe einer Kläranlage aus dem Großraum Frankfurt/Main, die im Rahmen der Entwicklung des E-Screen-Assays beprobt wurde, im Vergleich zur Positivkontrolle 17β -Estradiol. In Tab. 5 sind alle wichtigen Daten zur quantitativen Ermittlung der estrogenen Aktivität in dieser Probe zusammengefasst. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Abwasserprobe und für 17β -Estradiol (E2) verlaufen vergleichbar steil. Diese Ablaufprobe zeigt im E-Screen-Assay also die maximale estrogenen Wirksamkeit ($RPE = 101 \pm 15 \%$); es liegt ein vollständiger Agonist vor.

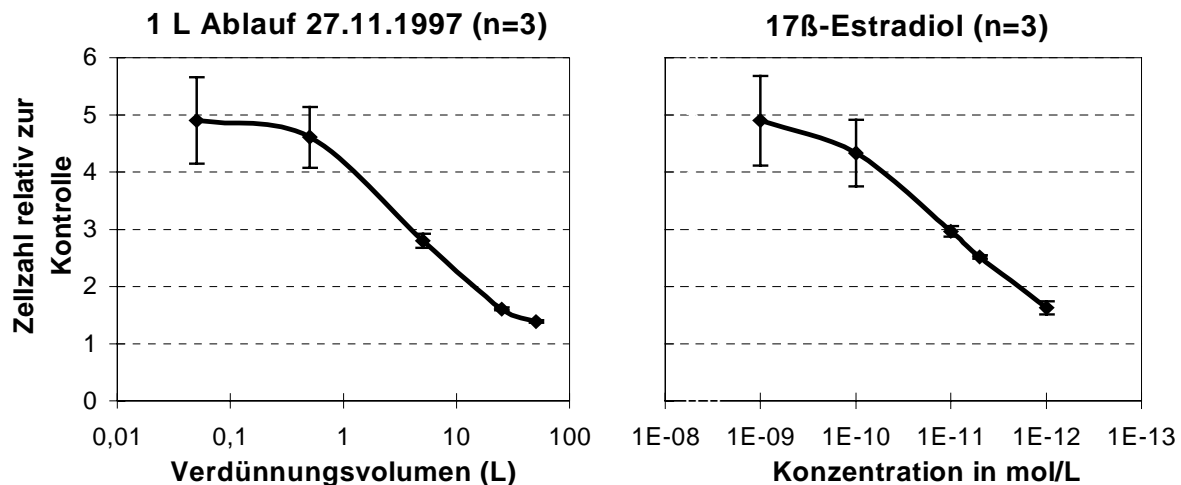


Abbildung 27: Konzentrations-Proliferations-Kurven des Festphasenextraktes (1 g RP-C18) von 1 L Kläranlagenablauf (aus dem Großraum Frankfurt/Main) und der zugehörigen Positivkontrolle 17β -Estradiol im E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen. Die Diagramme stellen Mittelwerte (\pm Standardabweichung) von drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$) im Vierfachansatz dar.

Tabelle 5: Quantitative Ermittlung der estrogenen Aktivität im Extrakt des Abwassers eines Kläranlagenablaufes (s. Abb. 27) aus den Daten von drei einzelnen E-Screen-Assays durch Angabe des Mittelwerts (MW) mit Standardabweichung (SD).

1 L Ablauf, KA Frankfurt/Main, 27.11.1997 SPE an 1 g RP-C18

Assay	PE	PE	RPE [%]	EC50 [mol/L u. L/L*]		E2-Äquivalente (EEQ)	
	(Ablauf)	(E2)		E2	Ablauf	[mol/L]	[ng/L]
SRB 4.2.98	5,340	5,776	90,9	9,35E-12	5,21	4,87E-11	13,3
SRB 12.2.98	4,031	4,269	92,7	5,88E-12	9,21	5,42E-11	14,8
SRB 25.2.98	5,332	4,656	118,5	6,87E-12	5,08	3,49E-11	9,5
MW	4,901	4,900	100,7	7,37E-12	6,50	4,59E-11	12,5
SD	0,753	0,783	15,4	1,79E-12	2,35	9,9E-12	2,7

* Verdünnungsfaktor

Bestimmungsgrenzen

Bei Zusatz von 50 µL DMSO zum Extrakt einer aquatischen Probe muss anschließend mit steroidfreiem Kulturmedium (Experimentalmedium) auf mindestens 50 mL, d.h. auf 1:1000 verdünnt werden, damit die DMSO-Endkonzentration im Zellkulturmedium nicht über 0,1 % liegt. Für die Extraktion von 1 L einer wässrigen Probe ergibt sich somit ein Anreicherungsfaktor von 20. Wenn man als Nachweisgrenze für eine Einzelsubstanz 10^{-12} mol / L EEQ (1 pmol / L) ansetzt, liegt die Nachweisgrenze des E-Screen-Assays bei 0,05 pmol / L EEQ bzw. 0,014 ng / L EEQ. Bei einigen der getesteten Kläranlagenabläufe zeigten sich bei der höchsten Extraktkonzentration im E-Screen-Assay zytotoxische Effekte. Bei einer fünf- oder zehnfach höheren Verdünnung war aber bereits keine Zelltoxizität mehr erkennbar. Als Bestimmungsgrenze können somit 0,25-0,5 pmol / L EEQ bzw. 0,07-0,14 ng / L EEQ angegeben werden.

2.5 Auswahl der beprobten Kläranlagen

Zur Beprobung wurden 18 Kläranlagen in Baden-Württemberg ausgewählt (Tab. 6). Bei allen Anlagen wurde das Abwasser des Kläranlagenablaufs sowohl mit GC-MS als auch mit dem E-Screen-Assay untersucht. Die Auswahl wurde anhand folgender Parameter getroffen:

- unterschiedliche technische Ausstattung
- geographische Gesichtspunkte
- Art der Einleitung
- Kapazität der Kläranlage bezüglich Einwohnerwerten (EW)

Tabelle 6: Zusammenstellung der untersuchten Kläranlagenabläufe [263].

Kläranlagen- abläufe	Proben- nahme	Fluss- gebiete	Ausbau (EW)	technische Aus- stattungen ^a	KN ^b	Zz ^c (% kommunal / % industriell)
1 Ditzingen	27.08.98	Neckar	120 000	B,N,D,P	M	50 / 50
2 Ludwigsburg- Eglosheim	27.08.98	Neckar	18 400	B,N,D,P	M	80 / 20
3 Ludwigsburg- Poppenweiler	27.08.98	Neckar	31 000	B,P	M	70 / 30
4 Stuttgart- Mühlhausen	26.08.98	Neckar	1 000 000	B,N,D,P	M	85 / 15
5 Stuttgart- Möhringen	27.08.98	Neckar	149 500	B,N,D,P	M	80 / 20
6 Stuttgart-Büsnau	02.11.98	Neckar	9 660	B,N,D,P,Ms	M	100 / 0
7 Hechingen ^d	10.11.98	Neckar	57000	B,N,D,P,E, F ^e	SO	50 / 50
8 Albstadt- Ebingen ^d	10.11.98	Donau	150 000	B,N,D,P,E,F	SO	40 / 60
9 Sindelfingen ^d	17.11.98	Neckar	226 000	T,N,P	M	50 / 50
10 Donaueschingen	20.11.98	Donau	148 000	B,N,D,P	SW	65 / 35
11 Blaubeuren	22.12.98	Donau	11 000	B,N,D,P	SO	90 / 10
12 Ulm/Neu-Ulm	22.12.98	Donau	350 000	B,N,D,P	SO	60 / 40
13 Pforzheim	25.01.99	Neckar	250 000	B,T,N,P	NW	50 / 50
14 Lahr	08.02.99	Rhein	115 000	B,T,N,P	SW	60 / 40
15 Waiblingen	04.03.99	Neckar	70 000	B,N,D,P	NO	60 / 40
16 Leutkirch	03.05.99	Donau	127 500	B,N,P	SO	30 / 70
17 Firmenklär- anlage 1	25.01.99	Neckar	67 000	B,N,D,P	M	0 / 100
18 Firmenklär- anlage 2	26.01.99	Bodensee	100 000	B,T,N	SO	15 / 85

^a B Belebung, T Tropfkörper, N Nitrifikation, D Denitrifikation, E Entfärbung, F Aktivkohlefiltration, Ms Mikrosieb, P Phosphateliminierung.

^b Kläranlagennachbarschaften (KN): SW Südwest, NW Nordwest, SO Südost, NO Nordost, M Mitte.

^c Zulaufzusammensetzungen (Zz).

^d Diese Kläranlagen wurden zwischen Oktober und Dezember 1999 erneut beprobt.

^e Diese Kläranlage war erst bei der Wiederholungsbeprobung mit einer Aktivkohlefiltration ausgerüstet.

2.6 Ergebnisse der GC-MS-Analyse

2.6.1 Identifizierung und Quantifizierung der Screening-Komponenten

Interner Standard

Jede der zu analysierenden Verbindungen wurde über einen substanzspezifischen internen Standard, der der Probe nach der Glasfaserfiltration, aber vor der weiteren Aufarbeitung zugesetzt wurde, identifiziert und quantifiziert (Tab. 7); so lassen sich variierende Verluste bei der Aufarbeitung ebenso wie die unvermeidlichen Empfindlichkeitsschwankungen bei der GC-MS-Messung kompensieren. Ein interner Standard muss folgenden Bedingungen genügen:

- möglichst ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften wie der Analyt (z.B. bei Anreicherung und Chromatographie)
- leichte Verfügbarkeit
- kein natürliches Vorkommen in den Proben

Diese Bedingungen erfüllen in idealer Weise stabilisotopen-markierte Analoga. Sie konnten für die vorliegenden Untersuchungen jedoch nur ausnahmsweise als interne Standards eingesetzt werden, da sie entweder gar nicht oder nur zu unverhältnismäßig hohen Preisen im Handel erhältlich sind. Zur Quantifizierung der synthetischen Estrogene diente ein von Kempter *et al.* [90] synthetisierter interner Standard, d₅-Tetrahydroestradiol. Die nicht isotopenmarkierten internen Standards wurden aufgrund einer Literaturrecherche ausgewählt und sind auf ihre Eignung in zahlreichen Untersuchungen geprüft (Tab. 7).

Stephanou *et al.* [154] haben bereits 1982 2,4,6-Tribromphenol als internen Standard zur Quantifizierung von 4-Nonylphenoldiethoxylat verwandt. 1998 haben Ternes *et al.* [264] zwar nachgewiesen, dass Abwasser 2,4,6-Tribromphenol im unteren ng / L-Bereich enthalten kann, doch liegen die Konzentration an 2,4,6-Tribromphenol, die wir den Abwasserproben als internen Standard zugesetzt haben im unteren µg / L-Bereich und somit um den Faktor 100-1000 höher (s. auch Tab. 2). Zudem ergaben Voruntersuchungen für alle verwendeten internen Standards, auch für 2,4,6-Tribromphenol, Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze in den von uns analysierten Abwasserproben. Zur Sicherheit sollte aber künftig statt 2,4,6-Tribromphenol das gleichfalls kommerziell verfügbare 4-n-Nonylphenolmonoethoxylat (Promochem, Wesel) als interner Standard verwendet werden.

In Tab. 7 sind alle für das Screening ausgewählten Analyten mit den jeweils zugehörigen internen Standards zusammengestellt. Für die nicht isotopenmarkierten internen Standards sind Literaturstellen zum entsprechenden analytischen Einsatz angegeben. Für 4-n-Oktylphenol als internen Standard zur Quantifizierung von technischem 4-*tert*-Oktylphenol gibt es keine Referenz. Mit 4-n-Nonylphenol als internem Standard zur Quantifizierung von technischem 4-Nonylphenol [195] ist der analoge Einsatz von 4-n-Oktylphenol aber hinreichend abgesichert.

Tabelle 7: Komponenten für das Screening-Protokoll und die jeweils zur Quantifizierung verwendeten internen Standards.

Analyten	zugehörige interne Standards
17 β -Estradiol, Estron	d ₂ -Estradiol
17 α -Ethinylestradiol, Mestranol	d ₅ -Tetradehydroestradiol
β -Sitosterol	5 α -Cholestan [168,265]
Genistein	Flavon [250,266]
Zearalenon, α -Zearalenol	Zearalanon [254]
4-Nonylphenol ^a	4-n-Nonylphenol [195]
4-Nonylphenoxyessigsäure ^a	4-Bromphenylessigsäure [116]
4-Nonylphenoldiethoxylat ^a	2,4,6-Tribromphenol [154,164,267]
Bisphenol A	Bisphenol A-d ₁₆
Benzyl-n-butylphthalat	d ₄ -Benzyl-n-butylphthalat
Di-n-butylphthalat	d ₄ -Di-n-butylphthalat ^b
α -Endosulfan	α -Endosulfan-d ₄
4- <i>tert</i> -Oktylphenol	4-n-Oktylphenol

^a Isomerengemisch.

^b Dieser interne Standard wurde erst bei den Wiederholungsbeprobungen verwandt; zuvor wurde die Quantifizierung mit d₄-Benzyl-n-butylphthalat als internem Standard durchgeführt.

Identifizierung und Quantifizierung über das Standardadditions-Verfahren

Für jede der drei zu analysierenden Gruppen (Xeno-/ Phyto-/ Mykoestrogene *ohne* bzw. *mit* Aufreinigung; natürliche/synthetische Estrogene *mit* Aufreinigung) werden 5 Proben angereichert. Für jeden Kläranlagenablauf werden also einschließlich der Probe für den E-Screen-Assay insgesamt 16 Proben aufgearbeitet und vermessen. Die je fünf Proben für die Analyse auf die genannten Gruppen werden durch Filtration über Glasfaserfilter von Fest- und Schwebstoffen befreit und vor jeder weiteren Aufarbeitung mit einer methanolischen Lösung der jeweiligen internen Standards versetzt. Vier der fünf Proben werden dann mit vier verschiedenen konzentrierten methanolischen Lösungen der ent-

sprechenden authentischen Analyten aufgestockt, die fünfte Probe stellt die Null-Referenz dar. Die Konzentrationen der Analyten in den zugegebenen Lösungen verdoppeln sich von Aufstockung zu Aufstockung (1fach, 2fach, 4fach und 8fach).

Durch die Aufstockung mit authentischem Material ist zum einen die Zuordnung eines bestimmten GC- bzw. GC-MS-Signals zum jeweiligen Analyten eindeutig abgesichert, zum anderen erlaubt das Verfahren der Standardaddition aber auch eine weitgehend matrixunabhängige Quantifizierung, da die Konzentration jedes Analyten in jeder Probe durch eine matrixspezifische Eichfunktion bestimmt wird (s. Abb. 28-31). Der zweite Vorteil des Standardadditions-Verfahrens in Kombination mit substanzspezifischen internen Standards liegt darin, dass das GC-MS nicht kalibriert werden muss; aufgrund der inhärenten Empfindlichkeitsschwankungen, insbesondere in der Ionenausbeute, wäre sonst vor und nach jeder Messung ein Kalibrierungslauf erforderlich, oder es müsste direkt vor der Messung zu jeder Probe ein weiterer interner Standard als GC-MS-Referenz zugesetzt werden.

Die Peakflächen für die jeweiligen Analyten aus den GC-MS-Massenchromatogrammen werden gegen die bei den vier Aufstockungen zugegebene Menge des Analyten aufgetragen, die Peakfläche für den Analyten in der unaufgestockten Probe entsprechend für $x = 0$ als Ordinatenabschnitt, sofern das Signal-zu-Rauschverhältnis für diesen Peak $> 6:1$ ist (Bestimmungsgrenze, s. Kapitel 2.6.2). Der Schnittpunkt der Korrelationsgeraden mit der Abszisse gibt dann (betragsmäßig) den Analysenwert in ng / L an (Abb. 28-31) [268]. Das Bestimmtheitsmaß R^2 für die lineare Regressionsgerade zeigt zum einen, ob die Analysenwerte trotz der Normierung auf die entsprechenden internen Standards durch gerätetechnische Empfindlichkeitsschwankungen beeinflusst werden (eventuell sogar systematisch). Andererseits könnten innerhalb einer Aufstockungsreihe bei einzelnen Proben im Laufe der Aufarbeitung unsystematische Verluste eines Analyten aufgetreten sein, die sich naturgemäß nicht über den zugehörigen internen Standard korrigieren lassen. Ergebnisse mit $R^2 < 0,990$ werden als nicht abgesichert gewertet. Das Standardadditions-Verfahren stellt bei der Quantifizierung somit eine „interne Qualitätskontrolle“ für jeden Analysenwert dar.

Damit entfällt auch eine getrennte Bestimmung bzw. Angabe der Wiederfindungsrate, die ohnehin nur in synthetischer Matrix oder bidestilliertem Wasser sinnvoll gewesen wäre, da die meisten Analyten in den Abwässern der Kläranlagenabläufe vorhanden sind. So wies eine sehr gering belastete Abwasserprobe [269] aus dem Kläranlagen-

ablauf Wittensee/Schleswig-Holstein trotzdem eindeutig nachweisbare Konzentrationen für einige Analyten auf.

Die Abb. 28-31 zeigen exemplarisch Identifizierung und Quantifizierung für je einen Vertreter der in Tab. 1 vorgestellten Stoffgruppen. Dabei sind die Massenchromatogramme für den Analyten und den zugehörigen internen Standard (jeweils als vollständig trimethylsilylierte Derivate) dargestellt; eingefügt ist die durch die Standardaddition bestimmte Regressionsgerade.

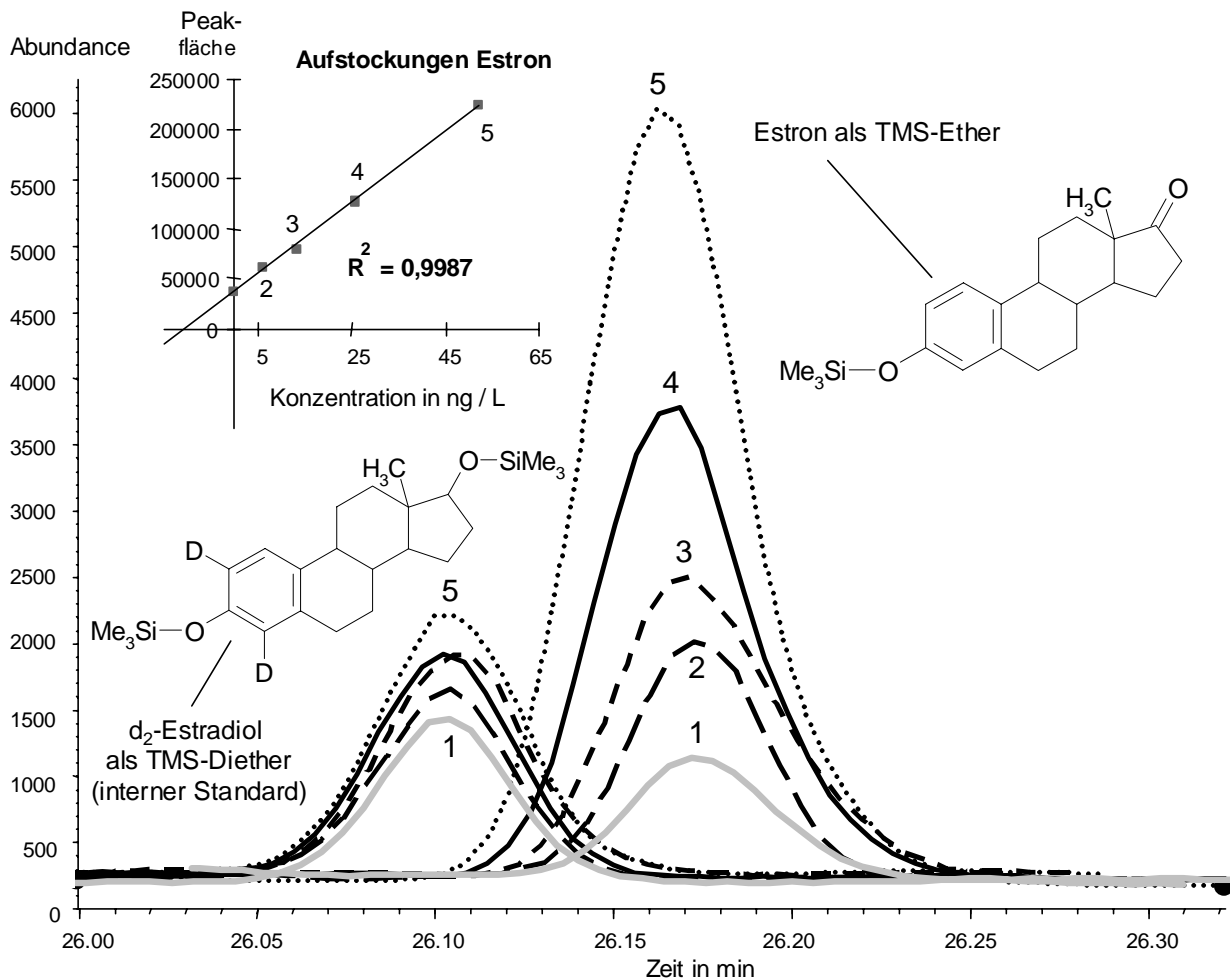


Abbildung 28: Massenchromatogramme der Abwasserprobe (1) und der aufgestockten Proben (2-5) des Kläranlagenablaufs Lahr (08.02.1999) auf den Molekül-Ionenspuren für Estron (m/z 342,6) und den zugehörigen internen Standard d_2 -Estradiol (m/z 418,8) nach Derivatisierung zu den entsprechenden Trimethylsilyl(TMS)-Ethern. Das Konzentrations-Peakfläche-Diagramm nach Normierung auf den internen Standard ist oben links eingefügt.

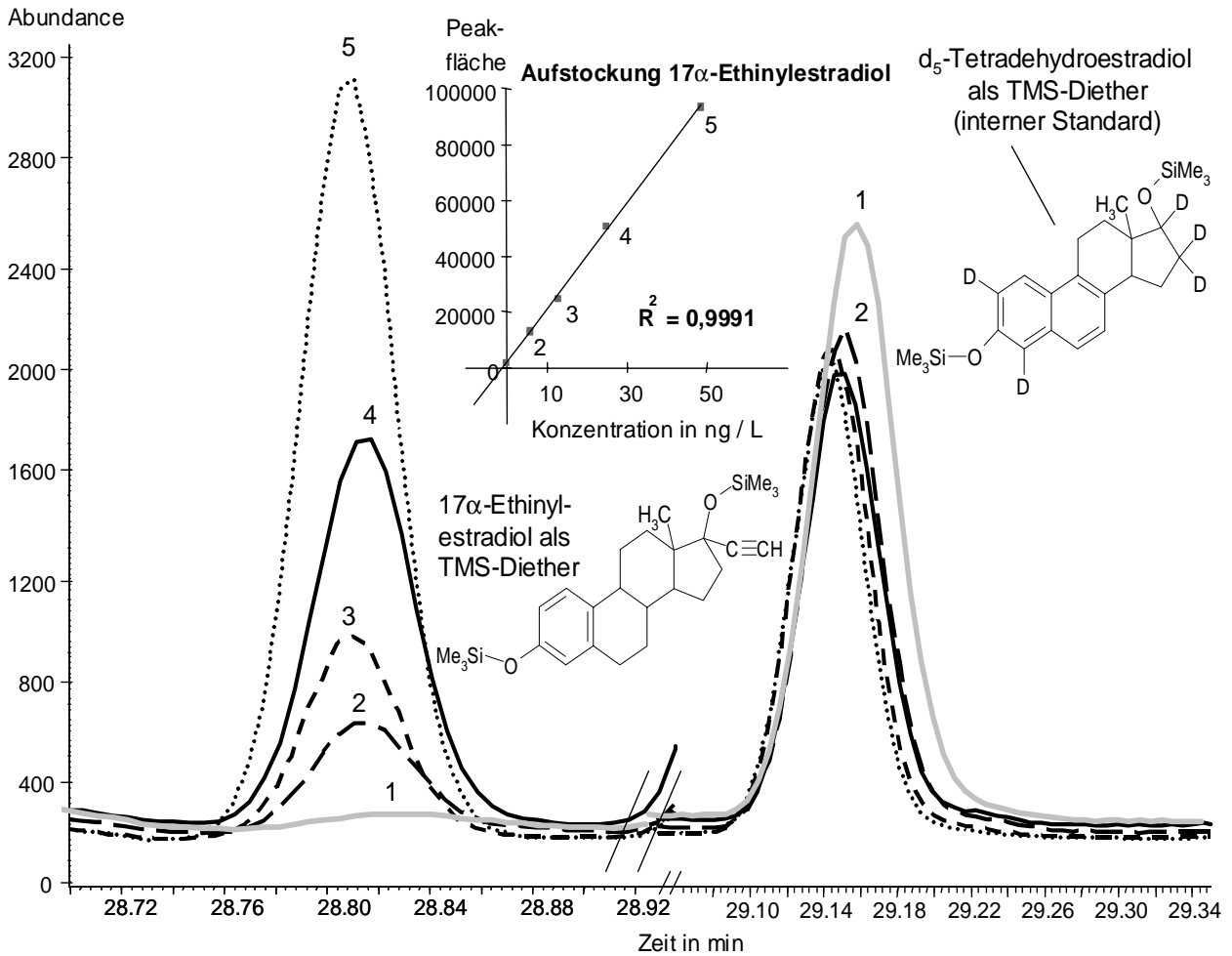


Abbildung 29: Massenchromatogramme der Abwasserprobe (1) und der aufgestockten Proben (2-5) des Kläranlagenablaufs Leutkirch (03.05.1999) auf den charakteristischen Fragment- bzw. Molekül-Ionenspuren für 17 α -Ethinylestradiol (m/z 425,7) und den zugehörigen internen Standard d₅-Tetradhydroestradiol (m/z 417,7) nach Derivatisierung zu den entsprechenden Trimethylsilyl(TMS)-Ethern. Das Konzentrations-Peakfläche-Diagramm nach Normierung auf den internen Standard ist oben eingefügt.

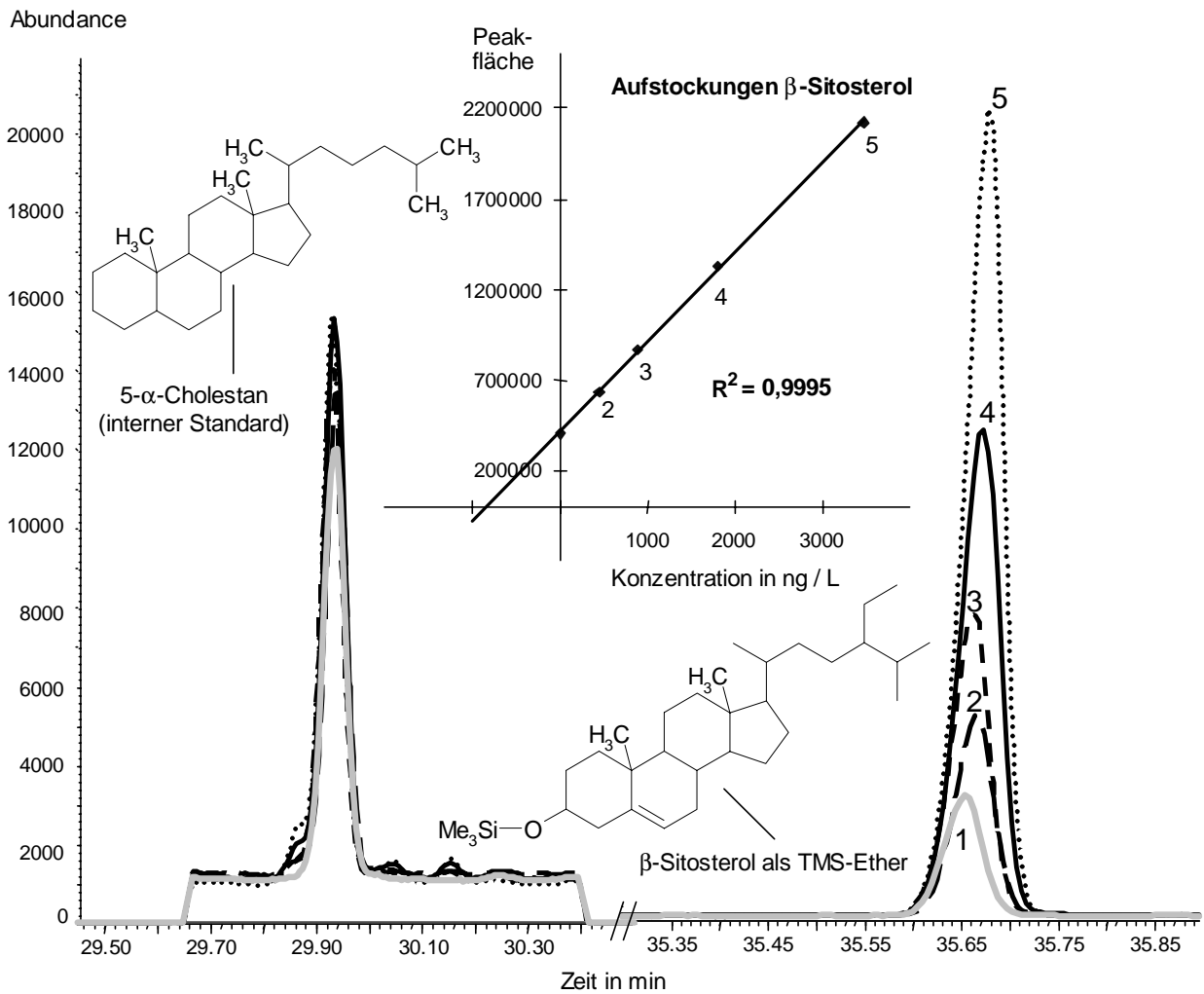


Abbildung 30: Massenchromatogramme der Abwasserprobe (1) und der aufgestockten Proben (2-5) des Kläranlagenablaufs Stuttgart-Möhringen (27.08.1998) auf den charakteristischen Fragment-Ionenspuren für β -Sitosterol (m/z 396,7; nach Derivatisierung zu dem entsprechenden Trimethylsilyl(TMS)-Ether) und den zugehörigen internen Standard 5 α -Cholestan (m/z 217,4). Das Konzentrations-Peakfläche-Diagramm nach Normierung auf den internen Standard ist oben eingefügt.

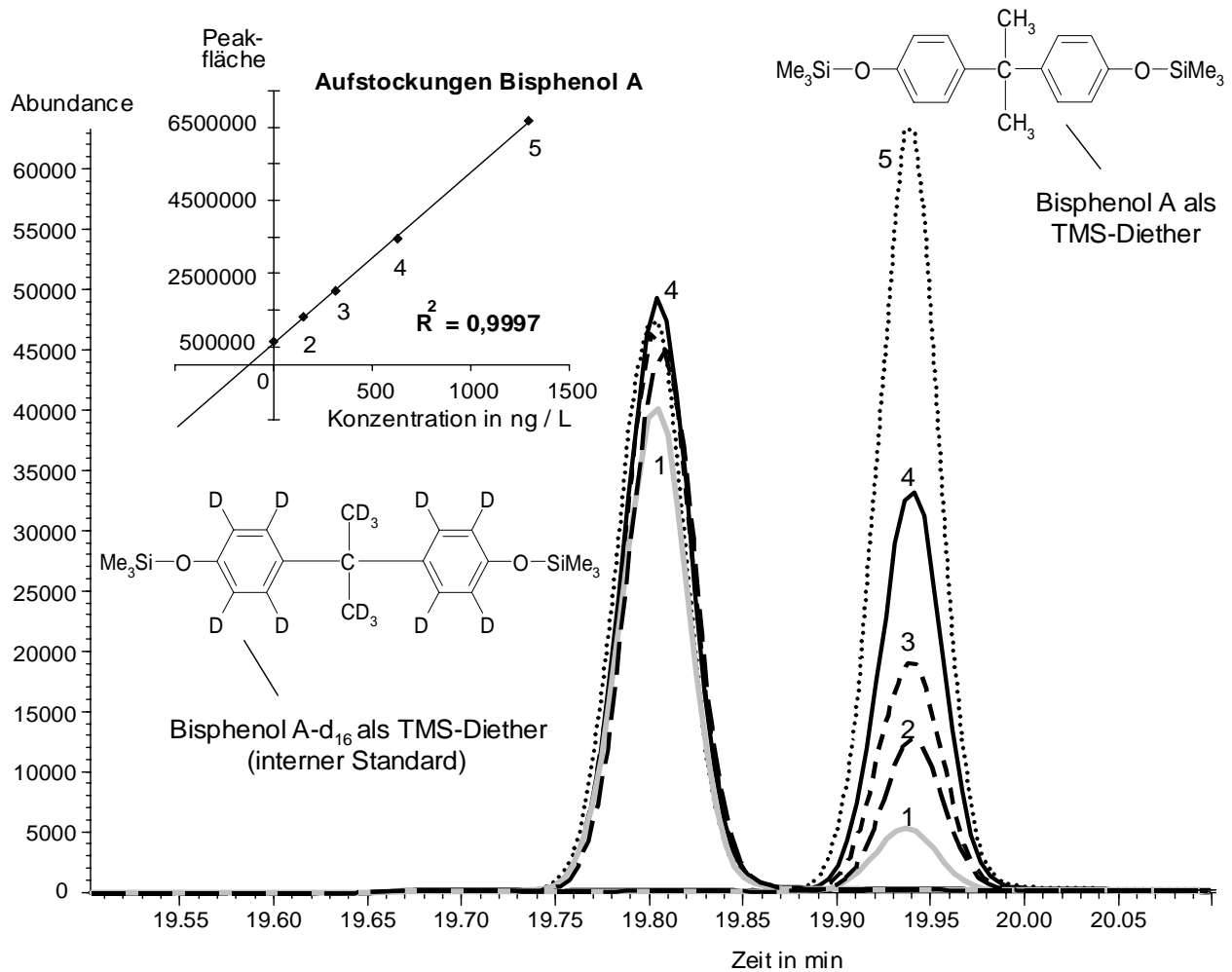


Abbildung 31: Massenchromatogramme der Abwasserprobe (1) und der aufgestockten Proben (2-5) des Kläranlagenablaufs Ditzingen (27.08.1998) auf den charakteristischen Fragment-Ionenspuren für Bisphenol A (m/z 357,7) und den zugehörigen internen Standard Bisphenol A-d₁₆ (m/z 368,7), nach Derivatisierung zu den entsprechenden Trimethylsilyl(TMS)-Ethern. Das Konzentrations-Peakfläche-Diagramm nach Normierung auf den internen Standard ist oben links eingefügt.

GC-MS-Analyse mit Detektion im SIM-Modus

Bei der Detektion im SIM werden die zu bestimmenden Verbindungen über das Moleküllion oder über ein charakteristisches Fragmention identifiziert und quantifiziert, die bei der Ionisierung mit hinreichender Intensität gebildet werden und eine möglichst hohe Masse besitzen sollen. Nur so ist gesichert, dass der entsprechende Massenbereich weitgehend frei von Untergrund-/Matrixsignalen ist. Als sogenannte Qualifier-Ionen dienen weitere Fragmentionen oder teilweise auch die Moleküllionen selbst.

In der Umweltanalytik werden die GC-MS-Systeme auf Empfindlichkeit und nicht wie sonst in der Massenspektrometrie üblich auf Auflösung getrimmt. Damit erscheinen die M, M +1,...-Peaks nur als ein nicht aufgelöstes Signal. In Tab. 8 sind daher als Mol.-

Massen die chemischen Mol.-Massen angeben, d.h. die Lage des Schwerpunkts des Molekül- bzw. Fragmentionenclusters der einzelnen Isotopomeren.

Tabelle 8: Molekül- und Fragmentionen (m/z) zur Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Analyten und der zugehörigen internen Standards.

Analyten bzw. interne Standards	Mol.-Massen / Mol.-Massen der TMS-Ether-Derivate	Molekül-Ionen bzw. charakteristische Fragment-Ionen	Qualifizier-Ionen
17 β -Estradiol	272,4 / 416,7	416,7	285,4
Estron	270,4 / 342,6	342,6	257,3 / 218,3
Mestranol	310,4 / 382,6	367,5	382,6
17 α -Ethinylestradiol	296,4 / 440,8	425,7	440,8 / 426,7
β -Sitosterol	414,7 / 486,9	396,7	486,9
Genistein	270,2 / 486,7	471,7	472,7 / 473,7
Zearalenon	318,4 / 462,8	462,8	151,2
α -Zearalenol	320,4 / 536,9	491,8	197,2
4-Nonylphenol ^a	220,4 / 292,6	249,5	193,4 / 235,5
4-Nonylphenoxyessigsäure ^a	278,4 / 350,6	279,5	251,5 / 321,5
4-Nonylphenoldiethoxylat ^a	308,3 / 380,5	295,3	135,2
Bisphenol A	228,3 / 372,7	357,7	372,7
Di-n-butylphthalat	278,4 / — ^b	149,1	104,1
Benzyl-n-butylphthalat	312,4 / — ^b	149,1	104,1
α -Endosulfan	406,9 / — ^b	338,8	340,8
4- <i>tert</i> -Oktylphenol	206,3 / 278,5	207,4	208,4 / 191,3
d ₂ -Estradiol	274,4 / 418,8	418,8	— ^c
d ₅ -Tetradehydroestradiol	273,4 / 417,7	417,7	416,7
5 α -Cholestan	372,7 / — ^b	217,4	372,7
Flavon	222,2 / — ^b	222,2	221,2
Zearalanon	320,4 / 464,8	449,7	464,8 / 307,3
4-n-Nonylphenol	220,4 / 292,6	179,0	292,6
4-Bromphenylessigsäure	215,0 / 287,2	272,2	270,2 / 242 / 244
2,4,6-Tribromphenol	330,8 / 403,0	387,9	385,9 / 401 / 403
Bisphenol A-d ₁₆	244,4 / 386,7	368,7	386,7
d ₄ -Benzyl-n-butylphthalat	316,4 / — ^b	153,1	108,1
d ₄ -Di-n-butylphthalat	282,4 / — ^b	153,1	108,1
α -Endosulfan-d ₄	410,9 / — ^b	342,8	340,8
4-n-Oktylphenol	206,3 / 278,9	179,0	263,8 / 278,9

^a Isomerengemisch; ^b bei der Derivatisierung wird kein Trimethylsilylether (TMS-Ether) gebildet;

^c es wurden keine Qualifizier-Ionen ausgewählt.

2.6.2 Quantitative Ergebnisse aus der GC-MS-Analyse

Nachweis und Bestimmungsgrenzen

Als Nachweisgrenze (NG) wird in der vorliegenden Arbeit ein Signal-zu-Rauschverhältnis (S/N-Verhältnis) von 3:1, als Bestimmungsgrenze (BG) ein S/N-Verhältnis von 6:1 im Massenchromatogramm der unaufgestockten Probe angesetzt. Da die Matrixbelastung der Abwasserproben und damit das Grundrauschen sehr stark variierte, unterscheiden sich NG und BG für die Proben der einzelnen Kläranlagenabläufe in den Absolutwerten in ng teilweise sehr stark. In Tab. 9 sind nur die jeweils niedrigsten NG und BG aufgeführt.

Tabelle 9: Niedrigste Nachweis(NG)- und Bestimmungs(BG)-Grenzen, die bei der Analyse der Abwasserproben aus Kläranlagen(KA)-Abläufen erreicht wurden.

Analyten	beprobte KA-Abläufe	NG in ng / L	BG in ng / L
17 β -Estradiol	KA Hechingen (2. Beprobung)	0,1	0,2
Estron	KA Leutkirch	0,05	0,1
Mestranol	KA Ulm	0,5	1,0
17 α -Ethinylestradiol	KA Waiblingen	0,15	0,3
β -Sitosterol	Firmenkläranlage 1	0,4	0,8
Genistein	KA Donaueschingen	0,7	1,4
Zearalenon	KA Hechingen (2.Beprobung)	10	20
α -Zearalenol	---	n.n. ^a	n.n. ^a
4-Nonylphenol ^b	Firmenkläranlage 1	25	50
4-Nonylphenoxyessigsäure ^b	KA Albstadt-Ebingen	30	60
4-Nonylphenoldiethoxylat ^b	KA Donaueschingen	20	40
Bisphenol A	Firmenkläranlage 2	0,3	0,6
Di-n-butylphthalat	KA Ludwigsburg-Eglosheim	5	10
Benzyl-n-butylphthalat	KA Ludwigsburg-Poppenweiler	15	30
α -Endosulfan	KA Lahr	100	200
4- <i>tert</i> -Oktylphenol	KA Albstadt-Ebingen (2. Beprobung)	0,5	1,0

^a diese Verbindung wurde in keinem Abwasser eines KA-Ablaufs nachgewiesen; ^b Isomerengemisch.

Für die natürlichen und synthetischen Estrogene wurden zusätzlich NG und BG nach DIN 32 645 [270] mit einem Vertrauensband von 99 % berechnet, die in Tab. 10 angegeben sind. Bei den übrigen Verbindungen war dies nicht erforderlich, da die bestimmten Konzentrationen die in Tab. 9 angegebenen unteren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen um ein Vielfaches übertrafen.

Tabelle 10: Nachweis(NG)- und Bestimmungsgrenzen(BG) für die Quantifizierung synthetischer und natürlicher Estrogene im Abwasser des Kläranlagenablaufs der Lehr- und Forschungskläranlage Stuttgart-Büsnau, berechnet nach DIN 32 645 [270] mit einem 99 %igen Vertrauensband. ^a

Analyten	NG in ng / L	BG in ng / L
17 β -Estradiol	0,4 (\pm 0,3)	1,2 (\pm 0,3)
Estron	0,7 (\pm 0,5)	1,8 (\pm 0,3)
Mestranol	0,6 (\pm 0,5)	1,6 (\pm 0,5)
17 α -Ethinylestradiol	0,4 (\pm 0,4)	1,2 (\pm 0,4)

^a In Klammern sind die Ergebnisse des 99 %igen Vertrauensintervalls angegeben

Blindwerte

Im Laufe des hier beschriebenen Untersuchungsprogramms wurden für sämtliche Analyten mehrfach Blindwertbestimmungen in bidestilliertem Wasser durchgeführt. Dazu wurden 1000 mL-Proben wie zur Analyse auf natürliche und synthetische Estrogene aufgearbeitet; die Massenchromatogramme zeigten keinerlei Signale auf den Massenspuren (s. Tab. 8) der Estrogene. Von den übrigen hormonell wirkenden Verbindungen ergaben sich in den nach Aufreinigung analysierten 200 mL-Proben für Bisphenol A, β -Sitosterol, 4-Nonylphenol und Benzyl-n-butylphthalat nur geringe Blindwerte. In den nicht aufgereinigten Extrakten ergaben sich für β -Sitosterol und 4-Nonylphenol keine Blindwerte, für Bisphenol A und Benzyl-n-butylphthalat lagen die Blindwerte im Bereich der Bestimmungsgrenze.

Für Di-n-butylphthalat (DBP) dagegen ergab sich ein hoher Blindwert in aufgereinigten wie in nicht aufgereinigten Extrakten. DBP ist als Weichmacher in den Kunststoffmaterialien, mit denen das Abwasser im Laufe der Aufarbeitung in Kontakt kommt, in großer Menge enthalten und daher in allen analysierten Wasserproben in signifikanten Konzentrationen nachweisbar. Da es auch aus zahlreichen kunststoffhaltigen Laborgeräten austritt, ist bereits die Laborluft kontaminiert und damit auch die Festphasenextraktions- und Aufreinigungssäulen, die zur Aufarbeitung der Proben verwendet werden. Weil DBP im E-Screen-Assay aber die geringste estrogene Wirkung aller getesteten Verbindungen zeigt (s. Kapitel 2.7.1) erschien eine Anpassung des Verfahrens zur genauen Bestimmung von DBP nicht als sinnvoll. Die Konzentrationen an DBP waren bei mehrfach durchgeführten Blindwertbestimmungen innerhalb eines gewissen Toleranzbereichs reproduzierbar; entsprechend wurden die Konzentrationen an DBP in sämtlichen Abwasserproben um diesen „mittleren Blindwert“ korrigiert. Die Analysenwerte für DBP sind daher bestenfalls als größenmäßige Orientierungswerte anzusehen.

Konzentrationen im Abwasser der untersuchten Kläranlagenabläufe

Insgesamt wurden Abwässer aus 18 Kläranlagenabläufen untersucht, drei Kläranlagenabläufe wurden ein Jahr nach der Erstbeprobung erneut beprobt. Die Ergebnisse der GC-MS-Analysen sind in den Tab. 11a-11c zusammengestellt und außer für die Wiederholungsbeprobungen in den Abb. 32-34 zusätzlich graphisch dargestellt.

Tabelle 11a: Im Abwasser von Kläranlagenabläufen bestimmte Konzentrationen an natürlichen und synthetischen Estrogenen und an Genistein (**ng / L**); die Messunsicherheit entspricht für alle Werte 20 % des Analysenwertes (95 % Vertrauensband) ^a.

KA-Abläufe ^b	Probenahme	Natürliche Estrogene Estron	17 β -Estradiol	Synthetische Estrogene EE2 ^c	Estrogene Mestranol	Genistein
1	27.08.98	17	4,2	< BG	n.a. ^d	21
2	27.08.98	< BG	< NG	< BG	< NG	3,2
3	27.08.98	< NG	< BG	< BG	n.a. ^d	2,8
4	26.08.98	3,2	2,6	0,9	n.a. ^d	< NG
5	27.08.98	3,1	6,4	4,1	< NG	6,4
6	02.11.98	7,5	1,6	2,7	< NG	18
7	10.11.98	22	15	n.a. ^d	n.a. ^d	8,7
8	10.11.98	< BG	< BG	< BG	< NG	n.a. ^d
9	17.11.98	18	5,4	12	n.a. ^d	38
10	20.11.98	3,5	4,4	< NG	n.a. ^d	2,7
11	22.12.98	4,3	2,9	2,4	< BG	< NG
12	22.12.98	5,1	< NG	2,0	1,0	n.a. ^d
13	25.01.99	0,8	1,1	2,3	< BG	< NG
14	08.02.99	10	0,8	2,0	2,7	< NG
15	04.03.99	1,4	1,7	0,4	< BG	n.a. ^d
16	03.05.99	0,2	< BG	0,9	< BG	< BG
17	25.01.99	< NG	< NG	< NG	1,8	< NG
18	26.01.99	< NG	7,1	n.a. ^d	< NG	< NG
9b	19.10.99	27	1,8	4,2	2,3	8,7
8b	09.11.99	1,4	0,7	< NG	< NG	< NG
7b	21.12.99	0,8	0,3	< NG	< BG	n.a. ^d

^a NG Nachweisgrenze; BG Bestimmungsgrenze; ein Signal/Rausch(S/N)-Verhältnis < 3:1 ist mit < NG, ein S/N-Verhältnis zwischen 3:1 und 6:1 mit < BG angegeben.

^b Numerierung der Kläranlagen(KA)-Abläufe gemäß Tabelle 6; mit 7b, 8b und 9b sind die Wiederholungsbeprobungen der Kläranlagenabläufe 7, 8 und 9 bezeichnet.

^c 17 α -Ethinylestradiol; ^d Messung nicht auswertbar ($R^2 < 0,99$).

Tabelle 11b: Im Abwasser von Kläranlagenabläufen bestimmte Konzentrationen der Alkylphenolpolyethoxylat-Abbauprodukte 4-Nonylphenol, 4-Nonylphenoxyessigsäure, 4-Nonylphenoldiethoxylat und 4-*tert*-Oktylphenol sowie der Phthalate Benzyl-*n*-butylphthalat und Di-*n*-butylphthalat ($\mu\text{g} / \text{L}$); die Messunsicherheit entspricht für alle Werte 20 % des Analysenwertes (95 % Vertrauensband) ^a.

KA- Abläufe ^b	4-Nonyl- phenol ^c	4-Nonyl- phenoxy- essigsäure ^c	4-Nonyl- phenoldi- ethoxylat ^c	4- <i>tert</i> - Oktylphenol	Benzyl- <i>n</i> -butyl- phthalat	Di- <i>n</i> -butyl- phthalat
1	0,96	2,5	< NG	— ^d	0,28	0,59
2	0,36	0,59	< NG	— ^d	0,12	0,39
3	0,60	0,42	< NG	— ^d	0,062	1,0
4	0,33	1,7	< NG	— ^d	0,12	0,53
5	0,75	2,0	< NG	— ^d	0,11	0,82
6	0,86	5,5	0,65	— ^d	0,45	0,26
7	0,57	1,7	0,27	— ^d	0,13	0,31
8	0,49	0,65	0,39	— ^d	0,063	0,85
9	2,3	5,8	3,5	— ^d	0,40	0,37
10	0,56	2,0	0,19	— ^d	0,080	0,74
11	0,74	2,0	< NG	— ^d	n.a. ^e	0,21
12	0,96	5,4	2,0	— ^d	0,41	0,65
13	0,42	2,9	3,6	— ^d	0,12	< NG
14	0,80	4,7	n.a. ^e	— ^d	< NG	< NG
15	0,43	4,8	0,22	— ^d	< NG	0,091
16	0,19	0,76	1,7	— ^d	0,36	0,95
17	0,25	3,2	5,5	— ^d	< NG	< NG
18	0,45	n.a. ^e	0,38	— ^d	< NG	0,58
9b	1,2	5,5	4,3	0,13	0,66	0,57
8b	0,077	< BG	0,38	0,002	0,24	1,1
7b	0,30	< NG	< BG	0,05	n.a. ^e	1,6

^a NG Nachweisgrenze; BG Bestimmungsgrenze; ein Signal/Rausch(S/N)-Verhältnis < 3:1 ist mit < NG, ein S/N-Verhältnis zwischen 3:1 und 6:1 mit < BG angegeben.

^b Numerierung der Kläranlagen(KA)-Abläufe gemäß Tabelle 6; mit 7b, 8b und 9b sind die Wiederholungsbeprobungen der Kläranlagenabläufe 7, 8 und 9 bezeichnet.

^c Isomerengemisch; ^d Substanz wurde nicht analysiert; ^e Messung nicht auswertbar ($R^2 < 0,99$).

Tabelle 11c: Im Abwasser von Kläranlagenabläufen bestimmte Konzentrationen der Xenoestrogene Bisphenol A und α -Endosulfan, des Phytoestrogens β -Sitosterol und der Mykoestrogene α -Zearalenol und Zearalenon ($\mu\text{g} / \text{L}$); die Messunsicherheit entspricht für alle Werte 20 % des Analysenwertes (95 % Vertrauensband) ^a.

KA- Abläufe ^b	Bisphenol A	α -Endosulfan	β -Sitosterol	Mykoestrogene	
				α -Zearalenol	Zearalenon
1	0,13	< NG	0,63	— ^c	— ^c
2	0,041	< NG	0,68	— ^c	— ^c
3	0,039	< NG	0,25	— ^c	— ^c
4	0,10	< NG	0,58	— ^c	— ^c
5	0,081	< NG	0,84	— ^c	— ^c
6	0,052	< NG	n.a. ^d	— ^c	— ^c
7	0,077	< BG	0,68	— ^c	— ^c
8	0,032	< NG	0,038	— ^c	— ^c
9	1,0	n.a. ^d	1,8	— ^c	— ^c
10	0,11	< NG	0,88	— ^c	— ^c
11	0,14	< NG	0,78	— ^c	— ^c
12	0,083	< NG	0,79	— ^c	— ^c
13	0,19	< BG	0,94	— ^c	— ^c
14	0,64	0,22	2,8	— ^c	— ^c
15	0,11	< BG	0,45	— ^c	— ^c
16	0,017	< NG	0,30	— ^c	— ^c
17	0,021	< NG	0,003	— ^c	— ^c
18	0,003	n.a. ^d	0,60	— ^c	— ^c
9b	0,50	— ^c	1,5	< NG	< NG
8b	0,006	— ^c	0,19	< NG	< NG
7b	0,20	— ^c	0,14	< NG	0,036

^a NG Nachweisgrenze; BG Bestimmungsgrenze; ein Signal/Rausch(S/N)-Verhältnis < 3:1 ist mit < NG, ein S/N-Verhältnis zwischen 3:1 und 6:1 mit < BG angegeben.

^b Numerierung der Kläranlagen(KA)-Abläufe gemäß Tabelle 6; mit 7b, 8b und 9b sind die Wiederholungsbeprobungen der Kläranlagenabläufe 7, 8 und 9 bezeichnet.

^c Substanz wurde nicht analysiert; ^d Messung nicht auswertbar ($R^2 < 0,99$).

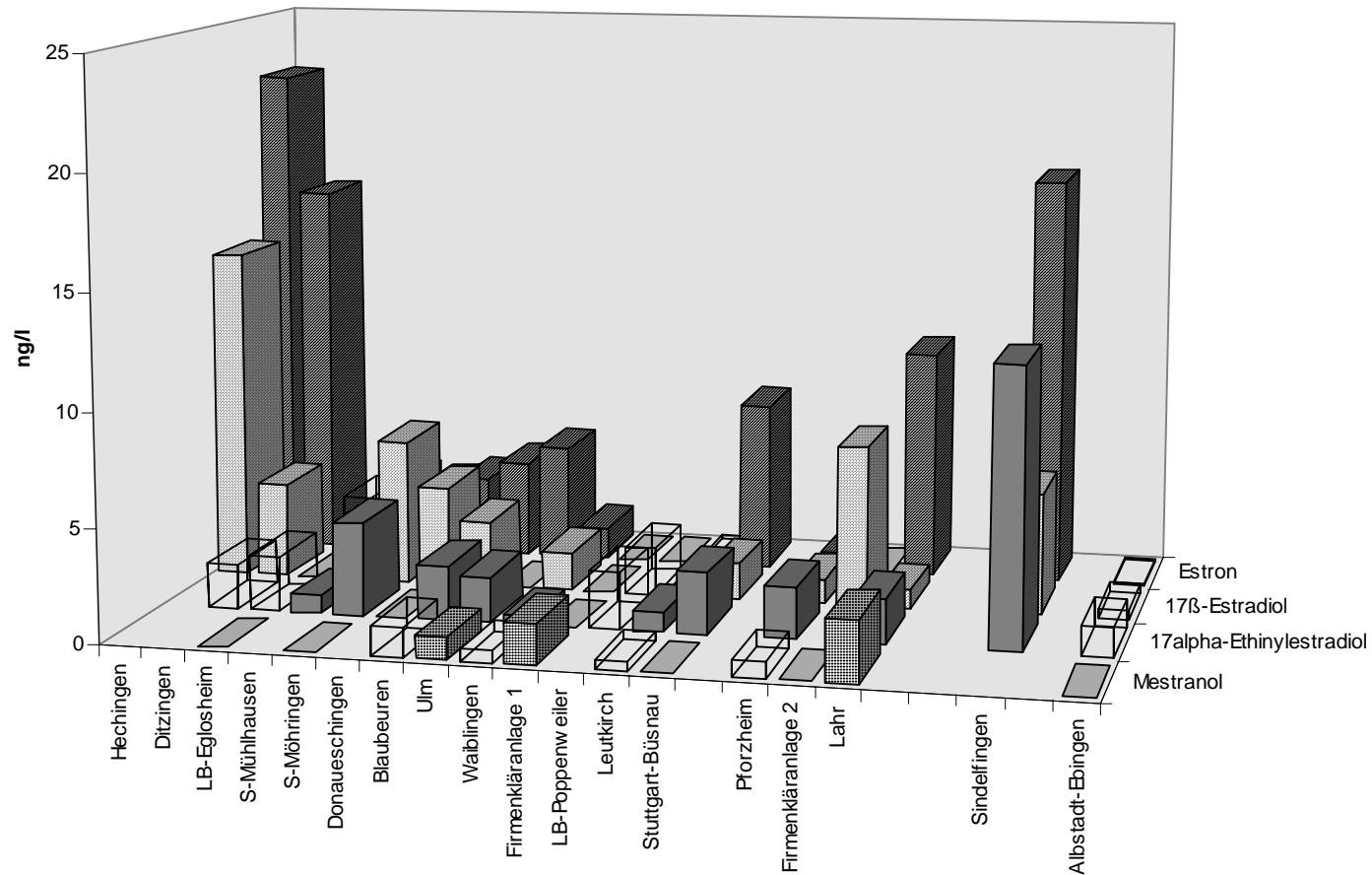


Abbildung 32: Konzentrationen an Estrogenen differenziert nach der technischen Ausstattung der Kläranlagen:
 Kläranlagen, die mit dem Reinigungsverfahren **Belebung** arbeiten: Hechingen, Ditzingen, ..., Leutkirch, Stuttgart-Büsnau;
 Kläranlagen mit kombiniertem **Tropfkörper- und Belebungsverfahren**: Pforzheim, Firmenkläranlage 2, Lahr;
 reine **Tropfkörperanlage**: Sindelfingen; **Belebungsanlage** mit zusätzlicher **Entfärbung und Filtration**: Albstadt-Ebingen.
 Die unausgefüllten Säulen stellen Konzentrationen dar, die über der Nachweisgrenze, aber unter der Bestimmungsgrenze lagen.

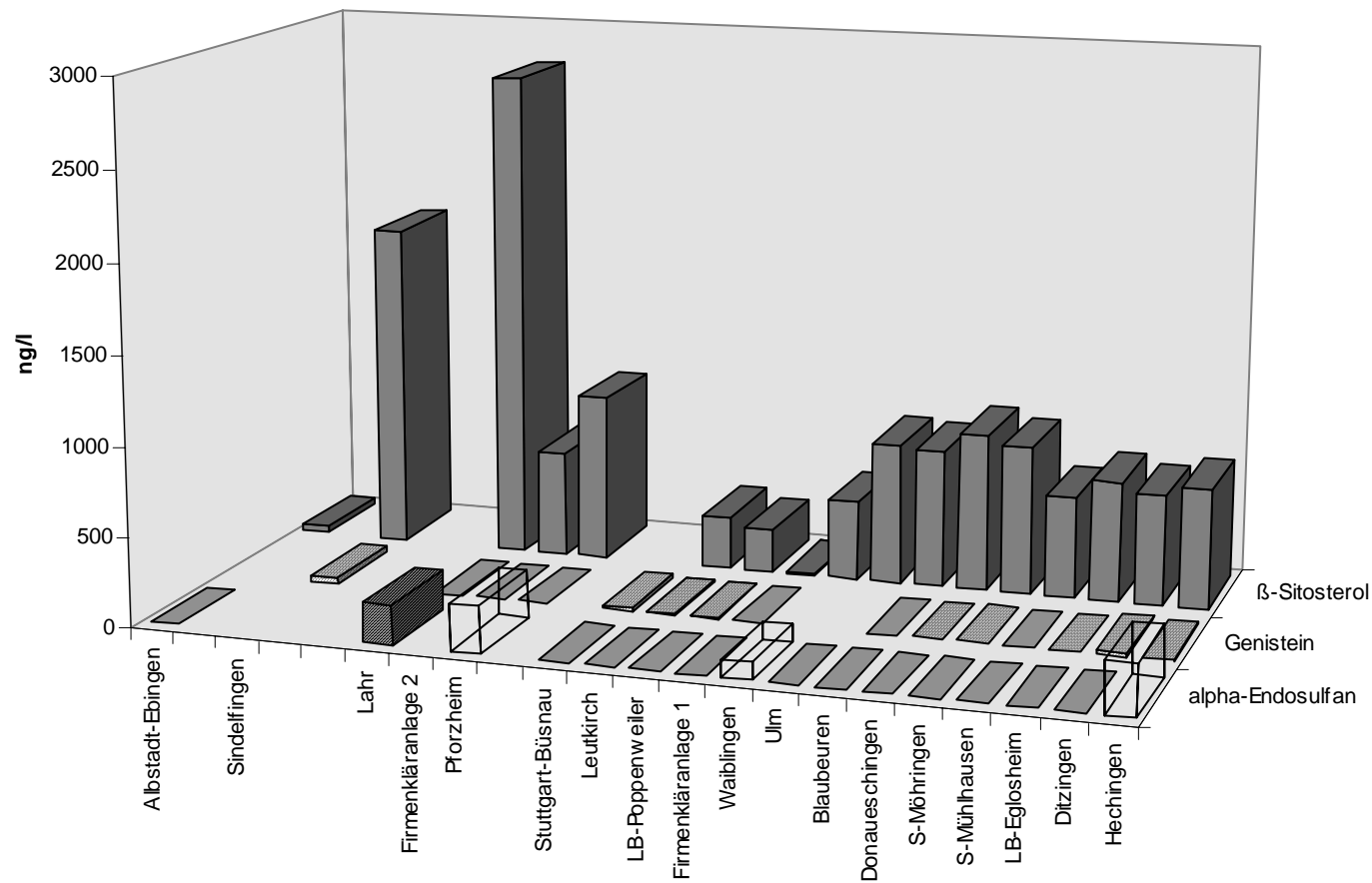


Abbildung 33: Konzentrationen an Phytoestrogenen und α -Endosulfan differenziert nach der technischen Ausstattung der Kläranlagen: Kläranlagen, die mit dem Reinigungsverfahren **Belebung** arbeiten: Hechingen, Ditzingen, ..., Leutkirch, Stuttgart-Büsnau; Kläranlagen mit kombiniertem **Tropfkörper und Belebungsverfahren**: Pforzheim, Firmenkläranlage 2, Lahr; reine **Tropfkörperanlage**: Sindelfingen; **Belebungsanlage** mit zusätzlicher **Entfärbung und Filtration**: Albstadt-Ebingen. Die unausgefüllten Säulen stellen Konzentrationen dar, die über der Nachweisgrenze, aber unter der Bestimmungsgrenze lagen.

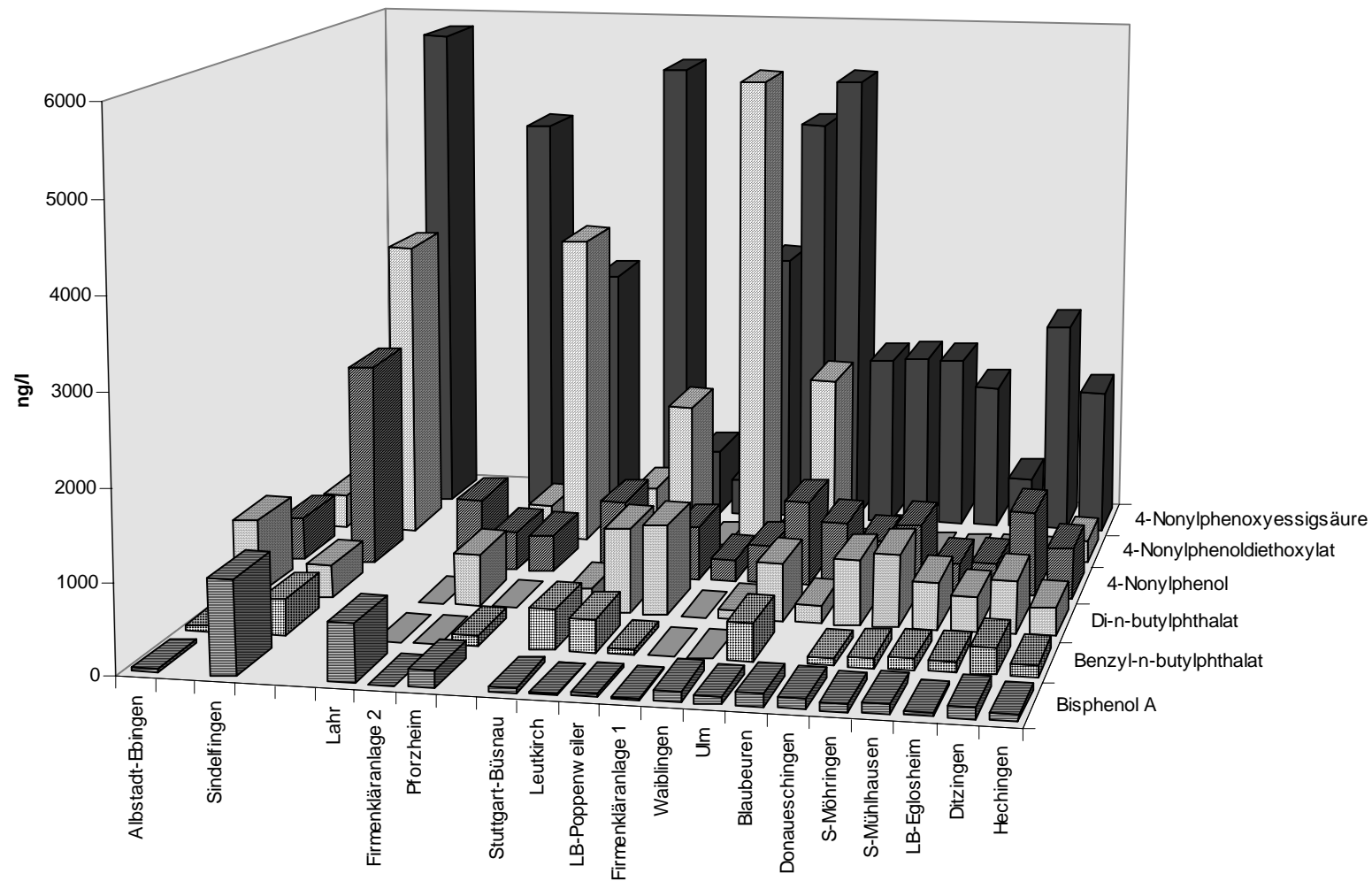


Abbildung 34: Konzentrationen an Xenoestrogenen differenziert nach der technischen Ausstattung der Kläranlagen:
 Kläranlagen, die mit dem Reinigungsverfahren **Belebung** arbeiten: Hechingen, Ditzingen, ..., Leutkirch, Stuttgart-Büsnau;
 Kläranlagen mit kombiniertem **Tropfkörper und Belebungsverfahren**: Pforzheim, Firmenkläranlage 2, Lahr;
 reine **Tropfkörperanlage**: Sindelfingen; **Belebungsanlage** mit zusätzlicher **Entfärbung und Filtration**: Albstadt-Ebingen.

2.6.3 Diskussion der Ergebnisse aus der GC-MS-Analyse

Die mit GC-MS ermittelten Konzentrationen der estrogen wirkenden Verbindungen werden im Hinblick auf folgende Parameter diskutiert:

- geographische Lage der Kläranlage,
- Art der Einleitung (Anteil an kommunalem und industriellem Abwasser),
- Kapazität der Kläranlagen in Einwohnerwerten (EW),
- Einfluss der technischen Ausstattung (Abb. 32 bis Abb. 34).

Die für Estrogene und estrogenartig wirksame Verbindungen im Abwasser der Kläranlagenabläufe bestimmten Konzentrationen lassen keine Korrelation mit der geographischen Lage der Kläranlage, der Zusammensetzung des Kläranlagenzulaufs oder der Kapazität der Kläranlage erkennen. Selbst die beiden Firmenkläranlagen, die ausschließlich bzw. nahezu ausschließlich mit industriell belastetem Abwasser beschickt werden, zeigen keine signifikant anderen Ablaufwerte.

Eine Unterteilung in eher städtisch bzw. eher ländlich belastete Kläranlagen ist nicht sinnvoll, da keiner der untersuchten kommunalen Kläranlagenabläufe einen überwiegend städtischen bzw. ländlichen Abwasseranteil aufweist. Auch in Baden-Württemberg gibt es in schwächer besiedelten Regionen Kläranlagen, die ihr Abwasser fast ausschließlich aus der ländlichen Umgebung beziehen, doch handelt es sich hierbei zumeist um sehr kleine Anlagen mit $EW < 10\ 000$, teilweise sogar $< 1\ 000$. Diese kleinen Kläranlagen weisen zudem oft eine andere technische Ausstattung auf und besitzen im allgemeinen keine Probennahmeeinrichtungen, sodass keine 24h-Mischproben möglich sind.

Hinsichtlich der Ablaufkonzentrationen hormonell aktiver Verbindungen in Abhängigkeit von der Kläranlagenausstattung lassen sich die hier untersuchten Anlagen in vier Gruppen einteilen: Kläranlagen mit Belebungsverfahren, mit Tropfkörper, mit Belebungsverfahren und Tropfkörper sowie mit Belebungsverfahren und umfangreicher weitergehender Abwasserreinigung (Abb. 32-34). Dabei ist eine klare Abhängigkeit von Umfang und Art der technischen Ausstattung erkennbar. Sindelfingen (KA 9), die als einzige Kläranlage nur über einen Tropfkörper (ohne zusätzliche Belebungsstufe), eine Nitrifikation und eine Phosphateliminierung verfügt, weist deutlich erhöhte Ablaufkonzentrationen bei den Estrogenen wie bei den übrigen estrogenartig wirksamen Ver-

bindungen auf. Demgegenüber besitzt die Kläranlage Albstadt-Ebingen (KA 8) neben den üblichen Reinigungsverfahren (Belebung, Nitrifikation, Denitrifikation, Phosphateliminierung) eine zusätzliche Entfärbungsstufe (durch Sedimentation nach Zusatz von Pulveraktivkohle und Flockungshilfsmitteln) und eine Abwasserfiltration (Aktivkohlefiltration) zur Entfernung von nicht sedimentierter Aktivkohle und Schwebepartikeln. Diese Kläranlage zeigt für alle in das Screening einbezogenen Verbindungen (außer Di-n-butylphthalat, s. Kapitel 2.6.2) deutlich niedrigere Ablaufwerte. Anlagen, die über eine Belebung oder über eine Belebung in Verbindung mit einem Tropfkörper verfügen, weisen weder bei den Estrogenen noch bei den estrogenartig wirksamen Verbindungen auffällige Unterschiede auf. Insofern erscheint es als durchaus möglich, dass durch das Belebungsverfahren Estrogene und estrogenartig wirksame Stoffe besser abgetrennt werden als durch eine reine Tropfkörperanlage. Außerdem führen zumindest bei den in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen weitergehende Reinigungsschritte in der Tat zu niedrigeren Ablaufkonzentrationen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind in Abb. 35 die substanzspezifischen Medianwerte der Ablaufproben aus Kläranlagen mit Belebungsverfahren (n = 13) den Einzelwerten der reinen Tropfkörperanlage und der Belebungsanlage mit weitergehender Abwasserreinigung gegenübergestellt. Dabei wird der oben erwähnte Zusammenhang zwischen Ablaufkonzentrationen und technischer Ausstattung besonders auffällig.

Werte unterhalb der Nachweisgrenze wurden bei der Berechnung der Medianwerte als 0-Werte eingerechnet, Werte, die unter der Bestimmungsgrenze lagen oder nicht auswertbar waren ($R^2 < 0,99$), wurden in die Berechnung nicht aufgenommen. Die kombinierten Anlagen mit Tropfkörper- und Belebungsstufe sind in der Darstellung nicht aufgeführt; bei den drei Anlagen mit dieser Ausstattung hätten sich Medianwerte nur für 17 β -Estradiol, β -Sitosterol, 4-Nonylphenol und Bisphenol A berechnen lassen, die sich jedoch nur geringfügig von den Medianwerten für die reinen Belebungsanlagen unterscheiden (Tab. 11a-11c). Auf die Darstellung der Medianwerte von Mestranol, α -Endosulfan (beide Verbindungen waren nur selten nachweis- bzw. bestimmbar) und Di-n-butylphthalat (Blindwerte) wurde gänzlich verzichtet.

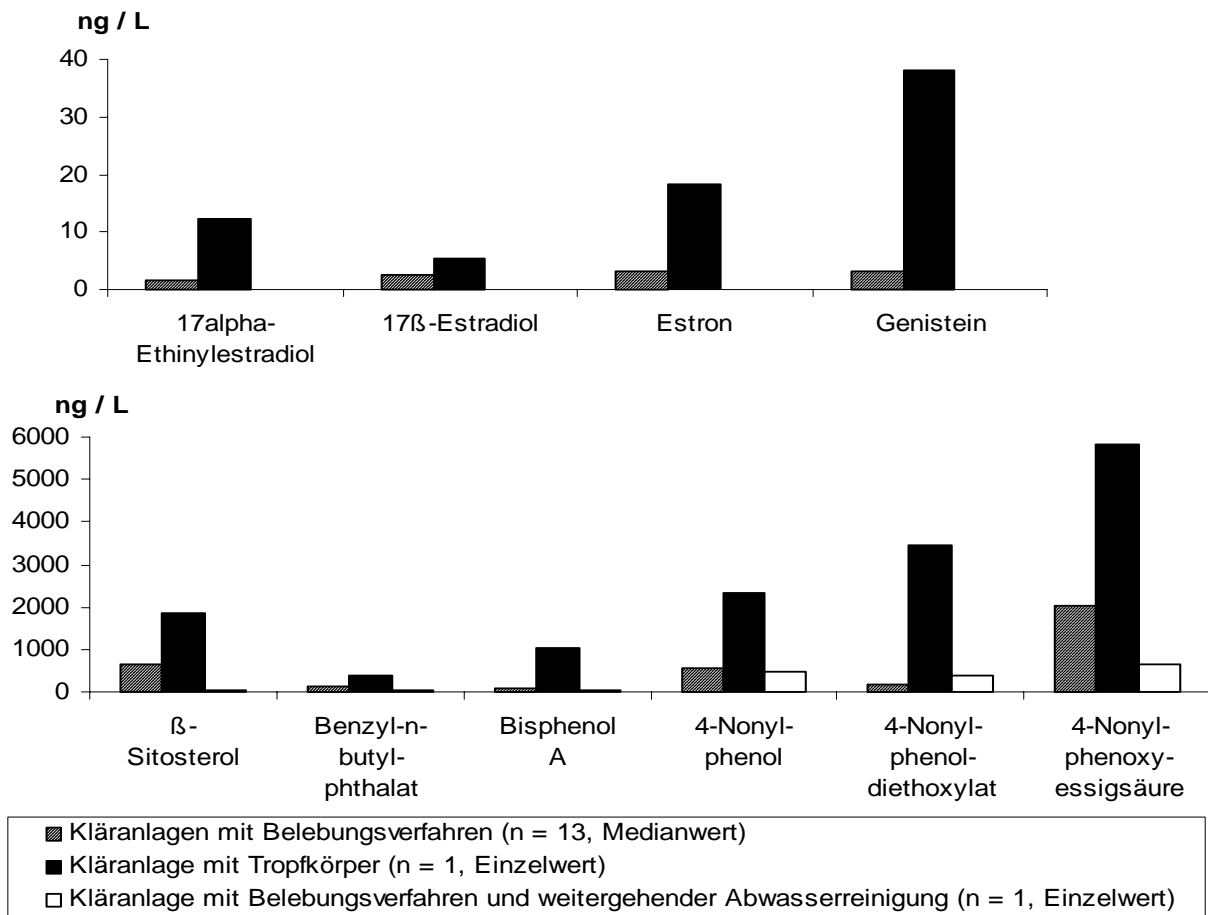


Abbildung 35: Konzentrationen an Estrogenen und estrogenartig wirksamen Verbindungen im Abwasser von Kläranlagenabläufen in Abhängigkeit von der Kläranlagenausstattung (**Medianwerte und Einzelwerte**).

2.6.4 Weitergehende Untersuchungen einzelner Kläranlagen

Um die Hypothese zu überprüfen, ob die Konzentrationen hormonell aktiver Verbindungen in Abläufen von Kläranlagen in einem direkten Zusammenhang mit Art und Zahl der eingesetzten Reinigungsstufen stehen, wurden drei Kläranlagen erneut beprobt.

Die Kläranlage Sindelfingen (KA 9) war zum Zeitpunkt der ersten Beprobung im Herbst 1998 mit einem Tropfkörper, einer Nitrifikation und einer Phosphateliminierung ausgerüstet; sie wies bei dieser Beprobung deutlich erhöhte Ablaufkonzentrationen an hormonell aktiven Verbindungen auf. Vor der zweiten Beprobung im Herbst 1999 war diese Kläranlage mit einer zusätzlichen nachgeschalteten Denitrifikation ausgerüstet worden. Die Konzentrationen estrogen wirkender Verbindungen zeigten aber keinen signifikanten Unterschied zur ersten Beprobung; die Ablaufwerte waren immer noch

sehr hoch im Vergleich zu den übrigen untersuchten Kläranlagen (Abb. 36, Tab. 11a-11c). Das Tropfkörperverfahren scheint für die Elimination der untersuchten hormonell wirkenden Verbindungen also weniger effektiv zu sein. Vor einer endgültigen Beurteilung müssen aber weitere Tropfkörperanlagen untersucht und zumindest für eine davon eine vollständige Bilanzierung durchgeführt werden, vor allem um sicherzustellen, dass die erhöhten Ablaufwerte nicht die Folge von hohen Zulaufkonzentrationen sind.

Eine weitere Zusatzbeprobung wurde im Herbst 1999 an der Kläranlage Albstadt-Ebingen (KA 8) bei unveränderter Ausstattung durchgeführt (Belebungsverfahren, Nitrifikation, Denitrifikation, Phosphatelimination, Entfärbung und Aktivkohlefiltration). Wie bei der ersten Beprobung lagen die Konzentrationen estrogen wirkender Verbindungen deutlich unter den Ablaufwerten für die anderen Anlagen (Abb. 36, Tab. 11a-11c). Der etwas höhere Gehalt an Di-n-butylphthalat bei beiden Beprobungen ist vermutlich auf oben genannte Gründe zurückzuführen (s. Kapitel 2.6.2). α -Endosulfan wurde bei der zweiten Beprobung nicht bestimmt, da diese Verbindung auch sonst im Abwasser der Kläranlagenabläufe kaum nachgewiesen werden konnte (bei einer allerdings relativ hohen Bestimmungsgrenze von 200 ng / L).

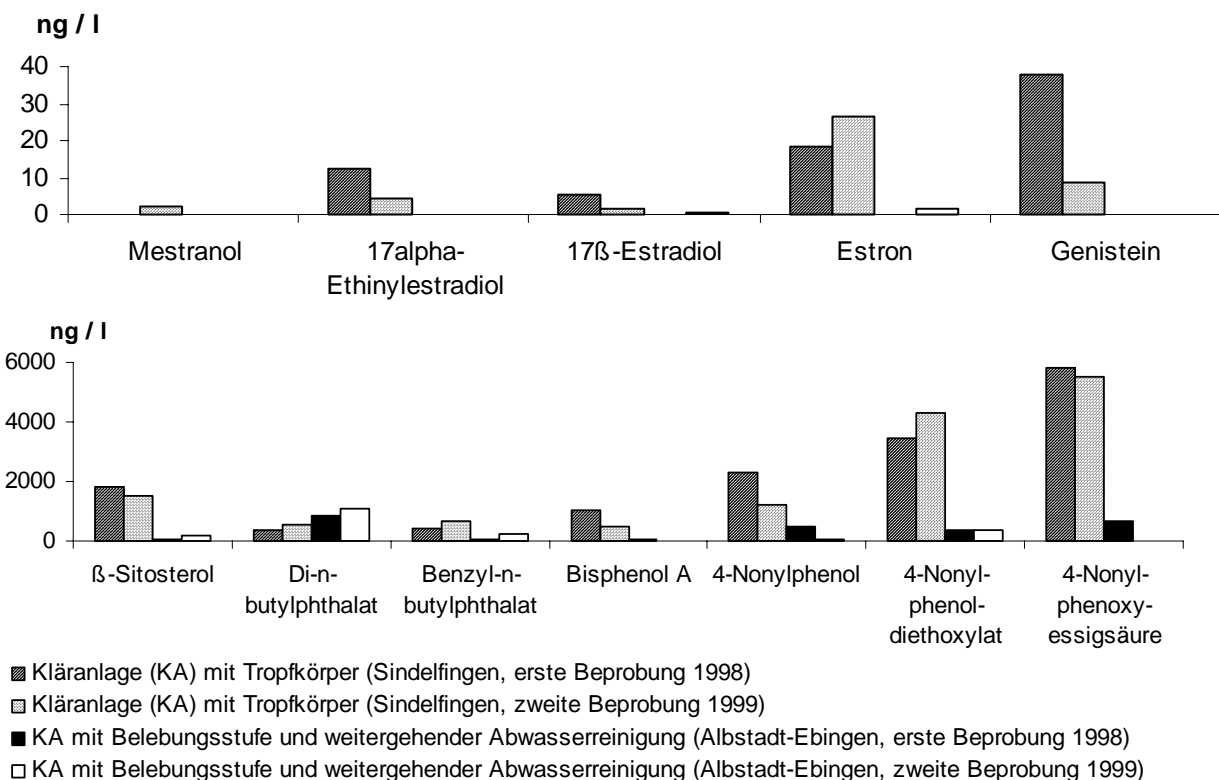


Abbildung 36: Konzentrationen estrogen wirkender Verbindungen im Abwasser der Kläranlagenabläufe einer Tropfkörperanlage und einer Anlage mit Belebungsstufe und weitergehender Abwasserreinigung bei jeweils zwei Beprobungen.

Beide Wiederholungsbeprobungen bestätigen somit die Ergebnisse der ersten Beprobung. Die technische Ausstattung einer Kläranlage scheint daher tatsächlich einen entscheidenden Faktor bei der Elimination der estrogenartig wirksamen Verbindungen darzustellen.

Um detailliertere Aussagen über die Reinigungsleistung der weitergehenden Abwasserreinigung (Entfärbungs-/Filtrationsstufe) zu erhalten, wurde die Kläranlage Hechingen (KA 7) erneut beprobt, da sie vor der zweiten Beprobung 1999 mit einer zusätzlichen Aktivkohlefiltration im Anschluss an die bereits vorhandene Entfärbung ausgestattet worden war. Die Entfärbung des Abwasser erfolgt durch Zusatz von Pulveraktivkohle und Flockungshilfsmitteln mit anschließender Sedimentation; bei der Aktivkohlefiltration wird das Abwasser noch durch einen zusätzlicher Filter gereinigt, der die nach Sedimentation noch im Abwasser befindlichen Schwebstoffe und Aktivkohlereste abtrennt, bevor es in den Vorfluter gelangt.

Die Ablaufkonzentrationen im Abwasser der Kläranlage Hechingen (KA 7) lagen bei der ersten Beprobung im oberen Bereich der Konzentrationen für Anlagen mit Belebungsverfahren. Bei der zweiten Beprobung im November 1999 ergaben sich deutlich geringere Konzentrationen (Abb. 37, Tab. 11a-11c). Außer Di-n-butylphthalat und Bisphenol A lagen die Werte für nahezu alle untersuchten Verbindungen deutlich unter den Vorjahreswerten, teilweise sogar unter der Nachweisgrenze. Der hohe Di-n-butylphthalat-Wert könnte auf die bereits genannten Gründe zurückzuführen sein; es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die erhöhten Di-n-butylphthalat- und Bisphenol A-Werte durch die Aktivkohle selbst hervorgerufen werden (Kontamination). Mestranol und 17α -Ethinylestradiol sind in Abb. 37 nicht dargestellt, da bei der ersten Beprobung (1998) für beide Verbindungen keine Ergebnisse erhalten wurden ($R^2 < 0,99$). Bei der Wiederholungsbeprobung ergab die Auswertung für beide Verbindungen Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze.

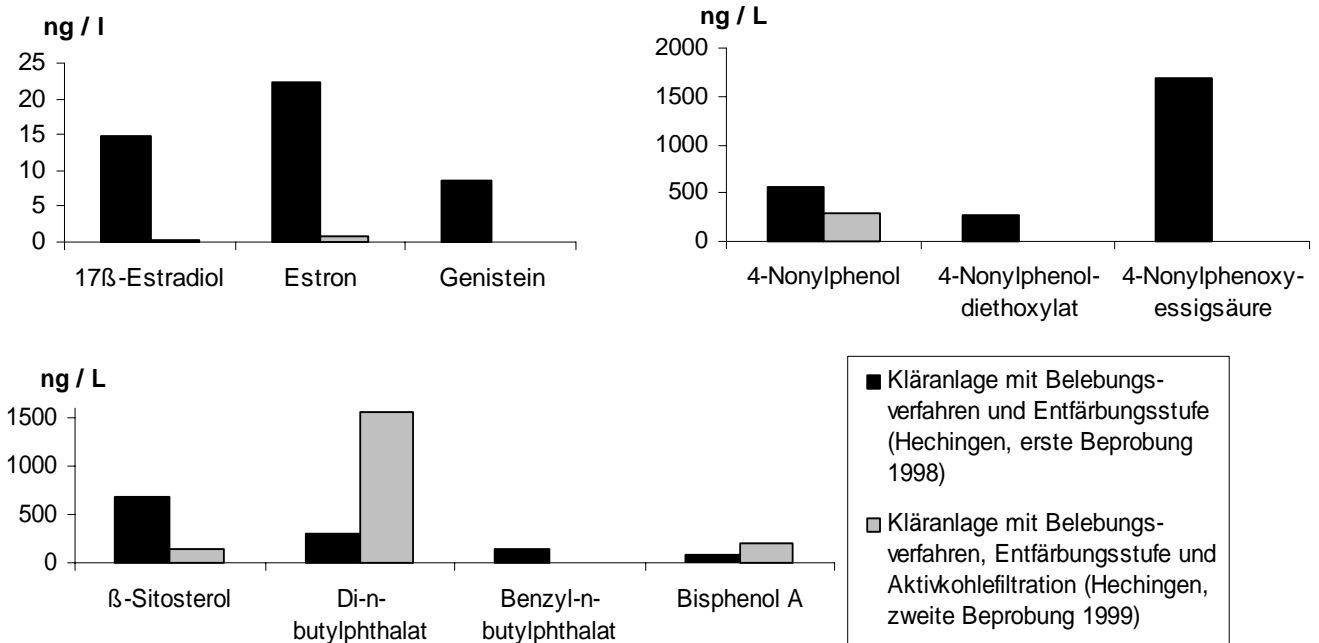


Abbildung 37: Konzentrationen estrogen wirkender Verbindungen im Abwasser des Kläranlagenablaufs der Kläranlage Hechingen vor und nach Einbau einer Aktivkohlefiltration zur weitergehenden Abwasserreinigung.

2.6.5 Bestimmung zusätzlicher Verbindungen bei den Wiederholungsbehebungen

Im Verlauf des Screening-Programms hatte sich gezeigt, dass das Pflanzenschutzmittel α -Endosulfan, das in Deutschland seit mehreren Jahren nicht mehr ausgebracht wird, in kaum einer Kläranlagenablaufprobe zu finden war, trotz der nachgewiesenen Persistenz dieser Verbindung. Über die in Baden-Württemberg untersuchten Kläranlagenabläufe findet somit kein signifikanter Eintrag in die Oberflächengewässer statt, es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich α -Endosulfan in Sedimenten oder auch in Schlammproben nachweisen ließe. Ein Eintrag in die Gewässer über Oberflächenabfluss aus intensiv landwirtschaftlich genutzten Regionen, hervorgerufen durch nicht erlaubte andauernde Ausbringung oder noch im Boden befindliche Reserven von α -Endosulfan, ist gleichfalls prinzipiell möglich.

Auch das Phytoestrogen Genistein ist wegen seiner meist geringen bis nicht nachweisbaren Umweltkonzentrationen für ein Screening auf Umweltestrogene in Kläranlagenabläufen nicht relevant. Genistein besitzt eine um vier Größenordnungen geringere estrogene Potenz als 17β -Estradiol (s. Kapitel 2.7.1) und gelangt zudem nur in sehr geringen Konzentrationen über das Abwasser von Kläranlagenabläufen in die Oberflä-

chengewässer. Auch hier ist jedoch der aus landwirtschaftlicher Nutzung (z.B. Sojaanbau) durch Oberflächenabfluss verursachte Eintrag von Genistein in die Gewässer zu beachten.

Das erst im Laufe der Untersuchung in die Screening-Analyse mit einbezogene 4-*tert*-Oktylphenol, ein Abbauprodukt der APnEO, wurde bei allen drei nochmals beprobten Kläranlagenabläufen gefunden. Diese Verbindung zeigte im E-Screen-Assay eine vergleichbar starke estrogene Wirkung wie 4-Nonylphenol (s. Kapitel 2.7.1) und sollte in jedem Fall bestimmt werden, auch wenn der Gehalt in den untersuchten Abwässern aus Kläranlagenabläufen wesentlich geringer war als der von 4-Nonylphenol. Bei zukünftigen Untersuchungen sollten weitere Abbauprodukte der APnEO in die Quantifizierung einbezogen werden, da die bislang ausgewählten Eliminationsprodukte nur einen Teil der möglichen Metaboliten darstellen.

Demgegenüber ist der Eintrag der beiden Mykoestrogene Zearalenon und α -Zearalenol in die Oberflächengewässer über Kläranlagen äußerst gering. In den drei auf diese Verbindungen untersuchten Kläranlagenabläufen wurde Zearalenon nur einmal, α -Zearalenol überhaupt nicht nachgewiesen. Beide Verbindungen sollten in zukünftigen Untersuchungen dennoch miterfasst werden, da die Analyse von lediglich drei Abwässern aus Kläranlagenabläufen auf diese beiden Substanzen noch keine Wertung zulässt.

2.6.6 Übertragung des Analyseverfahrens auf eine Flusswasserprobe

Um die Eignung des für das Abwasser von Kläranlagenabläufen entwickelten Analyseverfahrens auch für Oberflächenwasserproben zu testen, wurde in Zusammenarbeit mit der Universität Konstanz (AG Umwelttoxikologie Prof. Dietrich) am 30.09.1999 die Schussen bei Ravensburg beprobt. Da es sich hierbei um eine nicht qualifizierte Stichprobe handelt, ist die Aussagekraft der Ergebnisse (Tab. 12) allerdings begrenzt. Das Flusswasser der Schussen besteht vor allem in Trockenperioden zu > 50 % aus Kläranlagenablauf (vornehmlich Abwasser der Stadt Ravensburg).

Erwartungsgemäß ließen sich die meisten Verbindungen problemlos bestimmen, da die Matrixbelastung in Oberflächenwasser sicherlich geringer ist als in Kläranlagenabläufen. Auch bei dieser Probe wurden bereits 4-*tert*-Oktylphenol, Zearalenon und α -Zearalenol analysiert, auf die Analyse von α -Endosulfan wurde hingegen verzichtet. Für Genistein und 4-Nonylphenoldiethoxylat war der Korrelationskoeffizient < 0,990, sodass keine gesicherten Analysenwerte erhalten werden konnten .

Tabelle 12: Konzentrationen estrogenartig wirksamer Verbindungen in einer nicht qualifizierten Stichprobe aus der Schussen bei Ravensburg (30.09.1999); die Messunsicherheit entspricht für alle Werte 20 % des Analysenwertes (95 % Vertrauensband) ^a.

Substanzgruppen	Analyten	Konz. in ng / L
Natürliche Estrogene	17 β -Estradiol	0,6
	Estron	1,6
Synthetische Estrogene	17 α -Ethinylestradiol	< BG
	Mestranol	< NG
Phytoestrogene	β -Sitosterol	1600
	Genistein	n.a. ^b
Mykoestrogene	α -Zearalenol	< NG
	Zearalenon	< NG
Xenoestrogene	4-Nonylphenol ^c	9,0
	4-Nonylphenoxyessigsäure ^c	600
	4-Nonylphenoldiethoxylat ^c	n.a. ^b
	Bisphenol A	38
	Di-n-butylphthalat	250
	Benzyl-n-butylphthalat	260
	4- <i>tert</i> -Oktylphenol	8,5

^a NG Nachweisgrenze; BG Bestimmungsgrenze; ein Signal/Rausch(S/N)-Verhältnis < 3:1 ist mit < NG, ein S/N-Verhältnis zwischen 3:1 und 6:1 mit < BG angegeben.

^b Messung nicht auswertbar ($R^2 < 0,99$); ^c Isomerengemisch.

Auffällig bei dieser Analyse ist der sehr niedrige Wert für 4-Nonylphenol im Vergleich zu dem für 4-Nonylphenoxyessigsäure; deren Konzentration ist vergleichbar mit den Ablaufwerten von Kläranlagen. Da NPnEO in Oberflächengewässern überwiegend *aerob* abgebaut werden, 4-Nonylphenol aber vor allem beim *anaeroben* Abbau entsteht (s. Kapitel 4), ist dieser Befund plausibel. Zudem wird 4-Nonylphenol wegen seiner hohen Lipophilie größtenteils an das Sediment gebunden sein, während sich 4-Nonylphenoxyessigsäure allein schon wegen der wesentlich besseren Wasserlöslichkeit eher in der wässrigen Phase befinden wird. Die für ein Oberflächengewässer verhältnismäßig hohe Konzentration an 4-Nonylphenoxyessigsäure hängt, wie oben angemerkt, wahrscheinlich mit dem großen Abwasseranteil der Schussen zusammen.

Der recht hohe Wert für β -Sitosterol von mehr als 1,5 $\mu\text{g} / \text{L}$ kann zum einen von einer Papierfabrik im Einzugsgebiet der Schussen herrühren, wo β -Sitosterol aus dem benö-

tigten Holz bzw. Recyclingmaterial freigesetzt wird [64]; andererseits ist β -Sitosterol auch ein Bestandteil von Hopfen, der im Einzugsgebiet der Schussen angebaut wird.

Die Konzentrationen an natürlichen und synthetischen Estrogenen (Estron, 17β -Estradiol) liegen für die Schussen geringfügig höher als die von Ternes *et al.* [91] sonst in deutschen Flüssen gefundenen Werte, aber immer noch in der gleichen Größenordnung. Die Konzentrationen aller übrigen estrogenartig wirksamen Verbindungen lagen, sofern bestimmbar, in dem für Proben eines schwach belasteten oder verdünnten Kläranlagenablaufs typischen Bereich.

2.6.7 Übertragung des Analyseverfahrens auf eine Abwasserprobe aus einem Regenüberlaufbecken

Neben Kläranlagenabläufen stellen Regenüberlaufbecken eine direkte Eintragsquelle für estrogenartig wirksame Substanzen in Oberflächengewässer dar [271]. Diese in analytischer Hinsicht sehr anspruchsvolle Matrix entspricht eher dem Abwasser eines Kläranlagenzulaufs als dem eines Kläranlagenablaufs. Um die Eignung des Analyseverfahrens auch für diese schwierigere Matrix zu testen, wurde während eines Regenereignisses eine Mischprobe eines Regenüberlaufbeckens bei Herrenberg genommen und analog den Abwässern aus Kläranlagenabläufen aufgearbeitet und analysiert. Die in Tab. 13a,b zusammengestellten Ergebnisse zeigen deutlich, dass Messung und Auswertung der GC-MS-Daten problemlos möglich waren.

Tabelle 13a: Konzentrationen an natürlichen und synthetischen Estrogenen sowie Mykoestrogenen in der Mischprobe eines Regenüberlaufbeckens bei Herrenberg (Mai 2000); die Messunsicherheit entspricht für alle Werte 20 % des Analysenwertes (95 % Vertrauensband).

Substanzgruppen	Analyten	Konz. in ng / L
Natürliche Estrogene	17β -Estradiol	2,7
	Estron	8,9
Synthetische Estrogene	17α -Ethinylestradiol	19
	Mestranol	1,1
Mykoestrogene	α -Zearalenol	13
	Zearalenon	5,0

Tabelle 13b: Konzentrationen an Phyto- und Xenoestrogenen in der Mischprobe eines Regenüberlaufbeckens bei Herrenberg (Mai 2000); die Messunsicherheit entspricht für alle Werte 20 % des Analysenwertes (95 % Vertrauensband) ^a.

Substanzgruppen	Analyten	Konz. in µg / L
Phytoestrogene	β-Sitosterol	n.a. ^b
	Genistein	0,069
Xenoestrogene	4-Nonylphenol ^c	1,0
	4-Nonylphenoxyessigsäure ^c	< NG
	4-Nonylphenoldiethoxylat ^c	n.a. ^b
	Bisphenol A	0,40
	Di-n-butylphthalat	1,2
	Benzyl-n-butylphthalat	0,35
	4- <i>tert</i> -Oktylphenol	0,048

^a NG Nachweisgrenze; ein Signal/Rausch(S/N)-Verhältnis < 3:1 ist mit < NG angegeben.

^b Messung nicht auswertbar ($R^2 < 0,99$); ^c Isomerengemisch.

Insbesondere der mit 19 ng / L sehr hohe Wert für 17α-Ethinylestradiol liegt deutlich über den Befunden für alle bisher untersuchten Kläranlagenablaufproben. Da 17α-Ethinylestradiol möglicherweise zu einem Teil durch Sorption an belebtem Schlamm und weniger durch biologischen Abbau eliminiert wird [272,273], macht es Sinn, dass diese Verbindung in einem Kläranlagenzulauf und damit auch in einem Regenüberlaufbecken in deutlich höheren Konzentrationen vorliegt als im Abwasser des Kläranlagenablaufs.

Wendet man die von Schweinfurt *et al.* [274] im Zusammenhang mit der Risikoabschätzung für neue Chemikalien in der EU entwickelte Formel (EU *Draft Guideline* III/5504/94) auf 17α-Ethinylestradiol an (s.u.), so erhält man ausgehend von einem jährlichen Verbrauch von 50 kg 17α-Ethinylestradiol in Deutschland (1996) einen $PEC_{\text{Ethinylestradiol}}$ („vorhergesagte Umweltkonzentration von 17α-Ethinylestradiol“) von 11,4 ng / L für Abwasser. Die hier gemessene Konzentration liegt in diesem Bereich. Bei der Abschätzung wurde die Verordnungsmenge von 17α-Ethinylestradiol zugrundegelegt. Nicht beachtet wurde z.B. das bei Metabolisierung von Mestranol durch Methyletherspaltung zusätzlich gebildete 17α-Ethinylestradiol. Da 17α-Ethinylestradiol nahezu ausschließlich als Glucuronsäure-Konjugat ausgeschieden wird, hängen die real auftretenden Konzentrationen an unkonjugiertem 17α-Ethinylestradiol auch stark davon ab, inwieweit dieses im Abwasser gespalten wird und in welchen Mengen 17α-Ethinylestradiol enthaltende Medikamente unsachgemäß direkt über das häusliche Ab-

wasser entsorgt werden. Zur Dokumentation des hohen Analysenwertes sind in Abb. 38 noch die SIM-Massenchromatogramme von 17α -Ethinylestradiol sowie des zugehörigen internen Standard d_5 -Tetradehydroestradiol und die Auswertung der Standardaddition dargestellt.

$$\text{PEC} = \frac{A \times (100 - R)}{365 \times P \times V \times 100} = \frac{50 \text{ kg} \times (100 - 0)}{365 \times 80 \times 10^6 \times 0,15 \text{ m}^3 \times 100} = 1,14 \times 10^{-8} \text{ kg} / \text{m}^3 = 11,4 \text{ ng} / \text{L}$$

A in kg / Jahr: Voraussichtliche höchste Produktionsmenge in einem EU-Staat
(hier geschätzter Verbrauch von 17α -Ethinylestradiol; ca. 50 kg / Jahr)

R in %: Schwundrate durch Verluste (hier 0, da es sich um eine Art Kläranlagenzulauf handelt)

P: Einwohnerzahl in dem betreffenden Staat (hier Deutschland; ca. 80 Millionen)

V in m³/Tag: Menge des Abwassers pro Tag und Person (ca. 0,15 m³/ Tag)

PEC: *predicted environmental concentration*

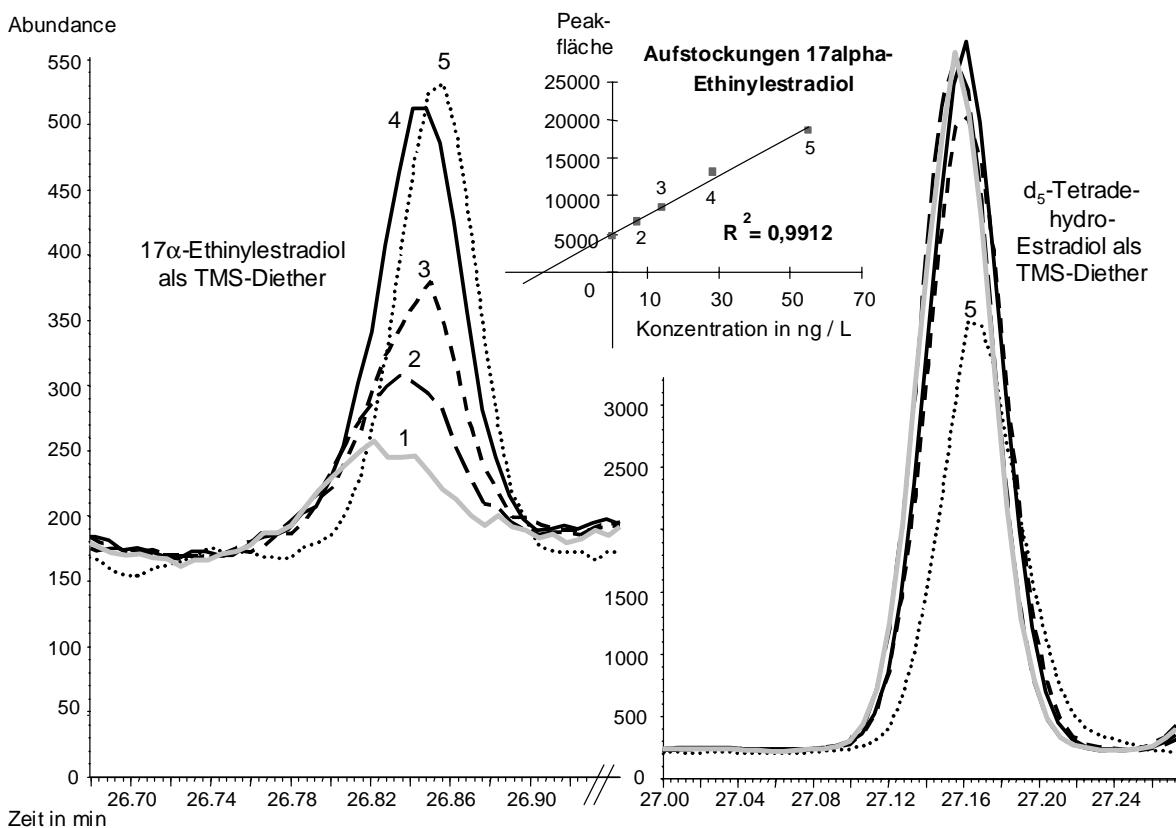


Abbildung 38: Massenchromatogramme der Abwasserprobe (1) und der aufgestockten Abwasserproben (2-5) eines Regenüberlaufbeckens bei Herrenberg vom 02.05.2000 auf den charakteristischen Fragment- bzw. Molekül-Ionenspuren für 17α -Ethinylestradiol (m/z 425,7) und den zugehörigen internen Standard d_5 -Tetradehydroestradiol (m/z 417,7) nach Derivatisierung zu den entsprechenden Trimethylsilyl(TMS)-Ethern. Das Konzentrations-Peakflächen-Diagramm nach Normierung auf den internen Standard ist oben eingefügt.

Die Konzentrationen der anderen steroidalen Estrogene 17 β -Estradiol, Estron und Mestranol liegen im gleichen Bereich, wie sie im Abwasser von Kläranlagenabläufen gefunden wurden. Wenn 17 β -Estradiolglucuronid über das Kanalnetz in das Regenüberlaufbecken gelangt, wird es bereits auf dem Weg dorthin zum Teil durch Glucuronidspaltung und Oxidation in Estron umgewandelt; der Hauptanteil des 17 β -Estradiols wird jedoch in glucuronidierter Form vorliegen und daher nicht detektiert. So wäre der relativ niedrige Analysenwert für 17 β -Estradiol zu erklären, der mit 2,7 ng / L eher in der Größenordnung eines Kläranlagenablaufs als in der eines Zulaufs liegt. Die für Mestranol bestimmte Konzentration ist erwartungsgemäß ebenfalls recht gering, da es bereits im Körper, im Kanal oder spätestens in der Kläranlage vor allem durch Spaltung der Methyletherfunktion zu 17 α -Ethinylestradiol abgebaut wird.

Für das Phytoestrogen Genistein, ergaben sich gut bestimmbare Konzentrationen, genauso wie für beiden Mykoestrogene Zearalenon und α -Zearalenol, die im Kläranlagenablauf und im Oberflächengewässer kaum nachweisbar waren. Dies ist als Indiz dafür zu werten, dass diese natürlichen und recht gut abbaubaren Verbindungen während der Abwasseraufbereitung in der Kläranlage weitgehend eliminiert werden.

Während die Werte für die beiden Phthalate und für Bisphenol A nicht auffällig waren (der Wert für Di-n-butylphthalat ist auch hier wegen der Schwierigkeiten bei der Analyse nur mit Vorbehalt zu sehen), zeigten sich bei den Derivaten der Alkylphenolpolyethoxylate deutliche Unterschiede zu den im Abwasser von Kläranlagenabläufen gefundenen Konzentrationen. In nahezu allen untersuchten Kläranlagenabläufen lagen die Konzentrationen an 4-Nonylphenoxyessigsäure (NP1EC) im oberen ng / L- bis unteren μ g / L-Bereich, die Konzentrationen an 4-Nonylphenol zumeist deutlich darunter. Demgegenüber ergibt sich hier ein umgekehrtes Bild. NP1EC war im Abwasser des Regenüberlaufbeckens nicht nachweisbar, 4-Nonylphenol dagegen in einer Konzentration von 1 μ g / L. Dieser Wert wird nur durch den für die Tropfkörperanlage übertroffen und steht in völligem Gegensatz zu dem Wert für die Oberflächenwasserprobe. Dieser Befund spricht dafür, dass, wie oben angemerkt (Kapitel 2.6.6), der größte Teil der NP1EC ebenso wie weitere *aerobe* Abbauprodukte erst im Laufe der Abwasseraufbereitung aus den 4-NPnEO entstehen. Die hohe Konzentration an 4-Nonylphenol spiegelt dabei sowohl den direkten Eintrag des zur Synthese der NPnEO verwendeten 4-Nonylphenols (s. Kapitel 4), als auch die *anaerobe* Metabolisierung der NPnEO im Abwasserkanal wieder.

2.7 Ergebnisse und Diskussion der biologischen Untersuchungen

2.7.1 Untersuchung von Einzelsubstanzen

Zur Ermittlung der estrogenen Wirkungsstärke einer Verbindung wurden mindestens drei unabhängige Tests durchgeführt (Tab. 14, Spalte 2) und für jeden E-Screen-Assay der relative Proliferationseffekt (RPE) berechnet; Mittelwert und Standardabweichung sind in Spalte 3 angegeben. Ein RPE < 10 % wurde nach [57] als nicht signifikant gewertet. Für jede proliferierend wirkende Substanz wurde nach Log-Probit-Transformation der mittleren Dosis-Wirkungskurve der EC_{50} -Wert (in mol / L) berechnet; er ist in Spalte 4 angegeben. Dazu wurde für jede eingesetzte Konzentration der jeweiligen Testverbindung der Mittelwert der relativen Zellzahlen aus den einzelnen E-Screen-Assays berechnet. Diese Mittelwerte ergeben zumeist eine auswertbare Dosis-Wirkungs-Kurve mit einer akzeptablen Korrelation. Für nicht proliferierend wirkende Verbindungen ist in dieser Spalte die höchste im E-Screen-Assay getestete Konzentration in Klammern angegeben. In der vorletzten Spalte sind die EC_{50} -Werte (in mol / L) für die jeweils zugehörige Positivkontrolle 17 β -Estradiol aufgeführt. In der letzten Spalte von Tab. 14 schließlich ist als Quotient der EC_{50} -Werte die relative estrogene Potenz (EEF) der Testsubstanz bezogen auf die Positivkontrolle 17 β -Estradiol (EEF = 1) angegeben.

Vom pflanzlichen Steroid β -Sitosterol wurde zwei Chargen mit 60 bzw. 96 % Reinheit getestet, die beide bis zu einer Konzentration von 2 μ M keine Wirkung auf die Proliferation von MCF-7-Zellen zeigten. Höhere Konzentrationen konnten nicht getestet werden, da β -Sitosterol in den für die Herstellung der Stammlösungen geeigneten semipolaren Lösungsmitteln Ethanol und DMSO relativ schlecht löslich ist. Durch Inkubation der MCF-7-Zellen mit β -Sitosterol und 10 pM 17 β -Estradiol konnte eine antiestrogene Wirkung von β -Sitosterol bis 1 μ M ausgeschlossen werden (s. Abb. 39). β -Sitosterol sollte nach den Ergebnissen in diesem Testsystem daher nicht mehr als Phytoestrogen bezeichnet werden.

Tabelle 14: Ergebnisse der Testung von Einzelsubstanzen im E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen.

Verbindungen	n ^a	RPE ^b (E2 = 100%)	EC ₅₀ ^c (mol / L)	EC ₅₀ (E2) ^d (mol / L)	EEF ^e (E2 = 1)
4- <i>tert</i> -Oktylphenol	3	97 (12)	9,7 x 10 ⁻⁸	7,3 x 10 ⁻¹²	7,6 x 10 ⁻⁵
4-Nonylphenol ^f	3	105 (10)	9,9 x 10 ⁻⁸	7,5 x 10 ⁻¹²	7,6 x 10 ⁻⁵
4-Nonylphenoxyessigsäure ^f	3	54 (7,7)	7,3 x 10 ⁻⁷	1,0 x 10 ⁻¹¹	1,4 x 10 ⁻⁵
Bisphenol A	3	97 (4,9)	1,5 x 10 ⁻⁷	7,7 x 10 ⁻¹²	5,3 x 10 ⁻⁵
Di-n-butyolphthalat	4	63 (11)	2,5 x 10 ⁻⁵	8,4 x 10 ⁻¹²	3,4 x 10 ⁻⁷
Benzyl-n-butyolphthalat	4	80 (9,4)	3,1 x 10 ⁻⁶	7,5 x 10 ⁻¹²	2,5 x 10 ⁻⁶
α-Endosulfan	3	70 (4,3)	2,0 x 10 ⁻⁷	9,8 x 10 ⁻¹³	4,8 x 10 ⁻⁶
Genistein	3	123 (18)	1,8 x 10 ⁻⁸	5,0 x 10 ⁻¹²	2,8 x 10 ⁻⁴
β-Sitosterol	3	(< 10)	(2 x 10 ⁻⁶)		-
Estron	7	112 (19)	6,7 x 10 ⁻¹¹	6,5 x 10 ⁻¹²	0,096
17α-Ethinylestradiol	8	105 (20)	5,2 x 10 ⁻¹²	4,7 x 10 ⁻¹²	0,91
Mestranol	6	100 (11)	2,0 x 10 ⁻¹⁰	2,6 x 10 ⁻¹²	0,013

^a Gesamtzahl der unabhängigen E-Screen-Einzelexperimente.

^b RPE relativer Proliferationseffekt; in Klammern ist die jeweilige Standardabweichung angegeben.

^c EC₅₀ halbmaximal wirksame Konzentration der Testsubstanz in den entsprechenden Assays.

^d EC₅₀ (E2) halbmaximal wirksame Konzentration von 17β-Estradiol in dem entsprechenden Assay.

^e EEF Estradiol-Äquivalenzfaktor; ^f Isomerengemisch.

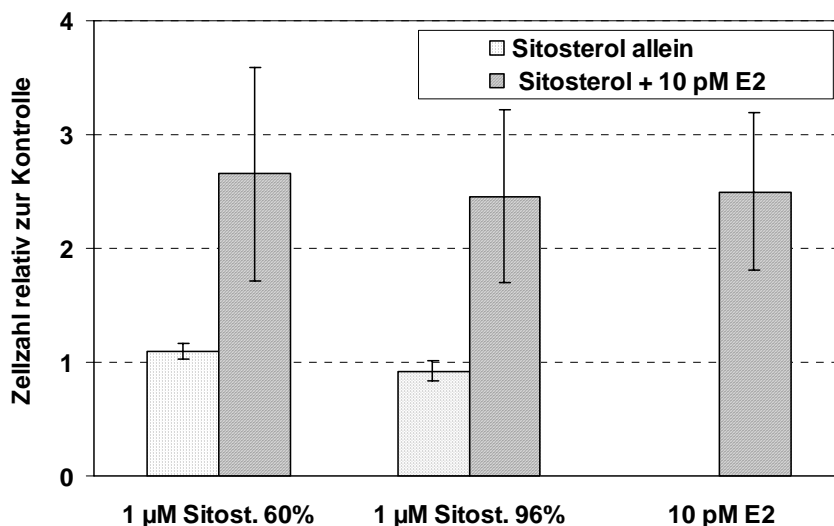


Abbildung 39: Untersuchung von β-Sitosterol auf antiestrogene Wirkung in MCF-7-Zellen durch Ko-Inkubation mit der etwa halbmaximal wirksamen 17β-Estradiol-Konzentration von 10 pM.

Andere Arbeitsgruppen konnten mit *in vitro*-Methoden, die auf dem Estrogenrezeptor des Menschen bzw. der Ratte beruhen, ebenfalls keine estrogenen Wirkung für β -Sitosterol nachweisen [47,275,276]. Ebenso wenig wurde estrogenen Aktivität bei zwei *in vivo*-Studien mit weiblichen Ratten beobachtet [47,277]. Nur Mellanen *et al.* [119] beschreiben einen estrogenabhängigen Proliferationseffekt (RPE = 71 %) von 1 μ M β -Sitosterol (> 91 % Reinheit) bei humanen T47D-Brustkrebszellen, konnten aber merkwürdigerweise bei der MCF-7-Zelllinie keine Wirkung feststellen.

Im Gegensatz dazu fanden Tremblay und van der Kraak [278] eine Bindung von β -Sitosterol an den isolierten Estrogenrezeptor der Regenbogenforelle und eine Induktion der estrogenabhängigen Vitellogeninsynthese in Hepatozyten der Forelle. In beiden *in vitro*-Systemen lag die estrogenen Potenz aber mehr als eine Größenordnung unter der von 4-Nonylphenol. Eine Induktion der Vitellogeninbildung durch im Wasser gelöstes β -Sitosterol wurde auch *in vivo* bei juvenilen Regenbogenforellen beobachtet [64,119,278]. Die offensichtlich speziesabhängige estrogenen Aktivität von β -Sitosterol beruht wahrscheinlich auf Unterschieden in der Aminosäuresequenz und folglich in der Struktur des Estrogenrezeptors von Säugern und Fischen.

Die Konzentrationen von β -Sitosterol in den Kläranlagenabläufen lagen zwar etwa so hoch wie die von 4-Nonylphenol, die estrogenen Potenz *in vitro*, basierend auf dem Estrogenrezeptor der Regenbogenforelle, ist aber um den Faktor 30 niedriger [278]. Daher wäre auch bei Verwendung eines entsprechenden biologischen Testsystems an Stelle des E-Screen nur ein geringer Beitrag von β -Sitosterol zum Gesamt-EEQ zu erwarten.

Da lediglich strukturell einheitliches 4-n-Nonylphenoldiethoxylat (4-n-NP2EO) als Standardverbindung kommerziell erhältlich war, konnte das umweltrelevante technische Isomerengemisch nicht im E-Screen getestet werden. Der einheitliche Standard 4-n-NP2EO zeigte bis 10 μ M keine Wirkung im E-Screen, sodass die Wirkung des technischen 4-n-NP2EO als schwächer eingestuft werden muss als die von technischem 4-Nonylphenol. 4-n-NP zeigt nämlich im Gegensatz zu 4-n-NP2EO im E-Screen einen estrogenen Effekt, der allerdings deutlich geringer ist als der von technischem 4-Nonylphenol [259]. Nach den von White *et al.* [54] durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen entspricht die estrogenen Potenz von 4-n-NP2EO etwa der von 4-Nonylphenoxyessigsäure (4-NP1EC).

2.7.2 Untersuchung von Kläranlagenabläufen

Für die biologischen Tests wurden die Abwasserproben der untersuchten Kläranlagen(KA)-Abläufe in gleicher Weise aufgearbeitet wie für die GC-MS-Analysen. Der extrahierte und über Kieselgel aufgereinigte Extrakt einer 1000 mL-Abwasserprobe wurde eingeeengt, mit ca. 1 mL Laufmittel (Hexan/Aceton, 60/40) in GC-Gläschen überführt und bis zur Lösung bzw. Verdünnung mit DMSO/Experimentalmedium bei + 4 °C gelagert. Sämtliche E-Screen-Tests wurden in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt; jede Probe wurde in mindestens drei unabhängigen Einzelexperimenten untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tab. 15 zusammengefasst. Alle Proben mit Ausnahme des Ablaufs einer Firmen-KA (KA 17) bewirkten verdünnungsabhängig eine deutliche Induktion der estrogenabhängigen Zellproliferation. Der Proliferationseffekt relativ zur Positivkontrolle 17 β -Estradiol (RPE) lag für die 16 Proben aus kommunalen KA zwischen 26 und 75 % (Median 48 %). Alle KA-Ablaufproben zeigen also partielle Estrogenrezeptor-Agonisten-Aktivität. Die 17 β -Estradiol-Äquivalentkonzentrationen (EEQ) der Abwasserproben aus KA-Abläufen lagen bei 14 der 16 untersuchten kommunalen KA in einem sehr engen Bereich von 0,9-3,5 ng / L (Median 1,6 ng / L, höchster EEQ-Wert knapp 8 ng / L). Dies lässt auf einen generellen kontinuierlichen Eintrag estrogen wirkender Verbindungen in Fließgewässer durch geklärte kommunale Abwässer schließen. Somit sind auch Substanzen, die normalerweise nicht als persistent angesehen werden, aufgrund ihres kontinuierlichen Eintrags in die Fließgewässer dennoch als „quasi-persistente“ Stoffe zu betrachten [279]. Nach diesen Befunden ist eine moderne Kläranlage im Routinebetrieb in der Lage, die estrogenartig wirksamen Substanzen im Abwasser so weit zu eliminieren, dass im Tagesmittel die 17 β -Estradiol-Äquivalentkonzentration im Ablauf deutlich unter 10 ng / L liegt.

Die Jahreszeit bei der Probenahme (Umgebungstemperatur) hat keinen erkennbaren Effekt auf die EEQ-Werte der Probe. Lässt man die KA 8 und 9 aufgrund ihrer Besonderheiten in der technischen Ausstattung außer acht, so wurden bei sechs KA (KA 1-5, 16) die Ablaufproben in der warmen Jahreszeit (August, Mai) und bei acht KA (KA 6,7, 10-15) in der kalten Jahreszeit (November bis März) genommen. Die Median-Werte der EEQ-Gehalte sind mit 2,2 und 2,1 ng / L für die beiden Probenserien als identisch anzusehen. Auch der Anteil gewerblicher Einleitungen am Abwasser hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die EEQ-Gehalte im Ablauf.

Tabelle 15: Ergebnisse der E-Screen-Assays von Ablaufproben aus 16 kommunalen und 2 firmeneigenen Kläranlagen in Baden-Württemberg. Angegeben sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen jeweils im Achtfachansatz durchgeführten Experimenten.

KA-Nr.	Kläranlagen(KA)-Abläufe	Proben-nahme	technische Ausstattungen ^a	RPE ^b (% E2)	EEQ ^c (ng / L)
1	Ditzingen	27.08.1998	B,N,D,P	45 (20)	3,2 (2,0)
2	Ludwigsburg-Eglosheim	27.08.1998	B,N,D,P	26 (5,9)	0,9 (0,04)
3	Ludwigsburg-Poppenweiler	27.08.1998	B,P	31 (12)	1,1 (0,65)
4	Stuttgart-Mühlhausen	26.08.1998	B,N,D,P	48 (11)	3,3 (1,5)
5	Stuttgart-Möhringen	27.08.1998	B,N,D,P	54 (5,3)	3,2 (1,3)
6	Stuttgart-Büsnau	02.11.1998	B,N,D,P,Ms	62 (20)	1,3 (0,94)
7	Hechingen	10.11.1998	B,N,D,P,E	63 (12)	1,2 (0,60)
8	Albstadt-Ebingen	10.11.1998	B,N,D,P,E,F	26 (10)	0,2 (0,05)
9	Sindelfingen	17.11.1998	T,N,P	67 (16)	7,8 (3,5)
10	Donaueschingen	20.11.1998	B,N,D,P	48 (17)	2,4 (1,5)
11	Blaubeuren	22.12.1998	B,N,D,P	66 (22)	1,4 (1,5)
12	Ulm	22.12.1998	B,N,D,P	46 (10)	3,3 (0,69)
13	Pforzheim	25.01.1999	B,T,N,P	40 (15)	1,2 (0,38)
14	Lahr	08.02.1999	B,T,N,P	69 (9,2)	1,8 (0,35)
15	Waiblingen	04.03.1999	B,N,D,P	30 (7,5)	2,7 (2,9)
16	Leutkirch	03.05.1999	B,N,P	74 (15)	1,1 (0,53)
Median (kommunale Kläranlagen)				48	1,6
17	Firmen-KA 1	25.01.1999	B,N,D,P	11 (6,8)	< BG ^d
18	Firmen-KA 2	26.01.1999	B,T,N	45 (7,1)	0,65 (0,10)

^a B Belebungs-Tropfkörper N Nitrifikation D Denitrifikation E Entfärbung F Aktivkohlefiltration Ms Mikrosieb P Phosphateliminierung;

^b RPE relativer Proliferationseffekt; in Klammern ist die jeweilige Standardabweichung angegeben.

^c EEQ 17 β -Estradiol-Äquivalentkonzentration; in Klammern ist die jeweilige Standardabweichung angegeben; ^d BG Bestimmungsgrenze.

Ein Zusammenhang zwischen Größe der KA (Kapazität) und EEQ-Gehalt im Ablauf ist nur bedingt erkennbar (Abb. 40). Sechs von sieben Ablaufproben mit EEQ-Werten < 1,5 ng / L stammen von KA mit einer Kapazität < 100 000 EW, während sechs der sieben Proben mit EEQ > 1,5 ng / L auf Anlagen mit einer Kapazität > 100 000 EW genommen wurden. Dieser Zusammenhang müsste mit einer größeren Zahl von Proben bzw. KA abgesichert werden. Die KA 8 und 9 wurden aufgrund ihrer besonderen technischen Ausstattung auch hierbei nicht berücksichtigt.

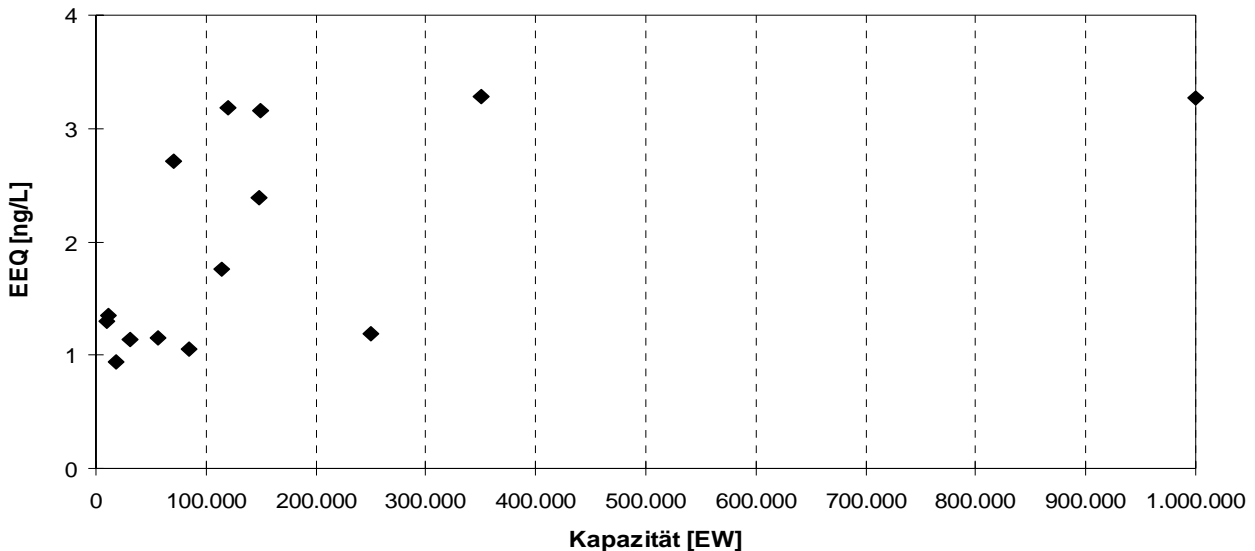


Abbildung 40: Korrelation zwischen der 17β -Estradiol-Äquivalentkonzentration (EEQ) im Ablauf kommunaler Kläranlagen mit Belebtschlammtechnik ($n = 14$) und der Kapazität der Anlagen in Einwohnerwerten (EW). Die Anlagen 8 und 9 sind wegen ihrer besonderen technischen Ausstattung nicht berücksichtigt.

2.7.3 Einfluss der Abwasserreinigungstechnik auf die estrogenen Aktivität in Kläranlagenabläufen

Auch bei der estrogenen Gesamtaktivität der Abwasserproben ist eine Einteilung der KA aufgrund ihrer technischen Ausstattung in die vier bereits in Kapitel 2.6.3 vorgestellten Gruppen sinnvoll. Dabei werden nur die 16 kommunalen Anlagen einbezogen, da zumindest das Abwasser eines der Firmenkäranlagenabläufe (KA 17) einen RPE-Wert $< 25\%$ aufweist und deshalb im Gegensatz zu allen anderen Abwasserproben nur als schwacher Agonist betrachtet werden kann.

In Abb. 41 sind die Mittelwerte der EEQ-Gehalte in den Ablaufproben der KA mit Belebungsverfahren ($n = 12$) und der KA mit kombiniertem Belebungs- und Tropfkörperverfahren ($n = 2$) den Einzelwerten der KA mit Tropfkörper und der KA mit Belebungsverfahren und weitergehender Abwasserreinigung gegenübergestellt. Dabei zeigt die einzige Anlage, die nur einen Tropfkörper als biologische Reinigungsstufe besitzt (KA 9), einen vierfach höheren EEQ-Gehalt im Ablauf als alle anderen Anlagen mit Belebungsverfahren. Eine auffallend niedrige estrogenen Aktivität wurde im Ablauf von KA 8 gefunden, deren Abwasser nach den Belebtschlammbecken eine zusätzliche Entfärbungsstufe (Adsorption an Aktivkohle und Sedimentation) und Aktivkohlefiltration durchläuft.

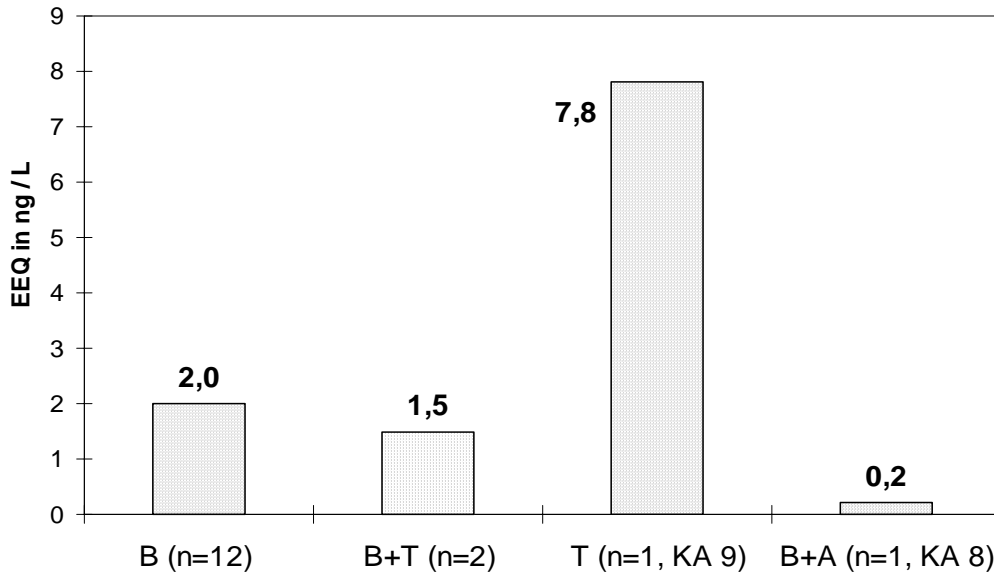


Abbildung 41: 17 β -Estradiol-Äquivalentkonzentrationen (Mittelwerte bzw. Einzelwerte) in Abläufen von kommunalen KA in Abhängigkeit von der technischen Ausstattung: B Belebtschlammprozess; T Tropfkörper; A weitergehende Abwasserreinigung (Entfärbung und Aktivkohlefiltration).

Um diese starken Abweichungen in den 17 β -Estradiol-Äquivalentkonzentrationen zwischen dem Ablauf einer KA mit Tropfkörper und einer mit weitergehender Abwasserreinigung zu überprüfen, wurden von den Anlagen 8 und 9 im November bzw. Oktober 1999 erneut 24h-Mischproben genommen und im E-Screen-Assay untersucht. Die gemessenen EEQ-Gehalte sind in Abb. 42 den Ergebnissen der ersten Proben gegenübergestellt. Wenngleich der EEQ-Gehalt in der zweiten Ablaufprobe der Tropfkörperanlage mit $3,0 \pm 0,5$ ng / L niedriger ist als für die erste Probe ($7,8 \pm 3,5$ ng / L), liegen beide Werte doch deutlich über dem Mittelwert der Abläufe der zwölf KA mit Belebtschlammprozess (2,0 ng / L). Die GC-MS-Analyse für die steroidalen Estrogene, insbesondere Estron und 17 α -Ethinylestradiol, sowie für einige Xenoestrogene ergab einen vergleichbaren Befund.

Obwohl der E-Screen-Assay mit einer Nachweisgrenze von 0,03 ng EEQ / L eine sehr empfindliche Analysenmethode darstellt, wurde in der zweiten Ablaufprobe von KA 8 keine estrogenen Aktivität nachgewiesen und so der auffallend niedrige EEQ-Gehalt von $0,21 \pm 0,05$ ng / L in der ersten Probe bestätigt. Auch bei der GC-MS-Analyse waren steroidale Estrogene nicht oder nur in geringen Konzentrationen nachweisbar, was die Ergebnisse der biologischen Analytik bekräftigt.

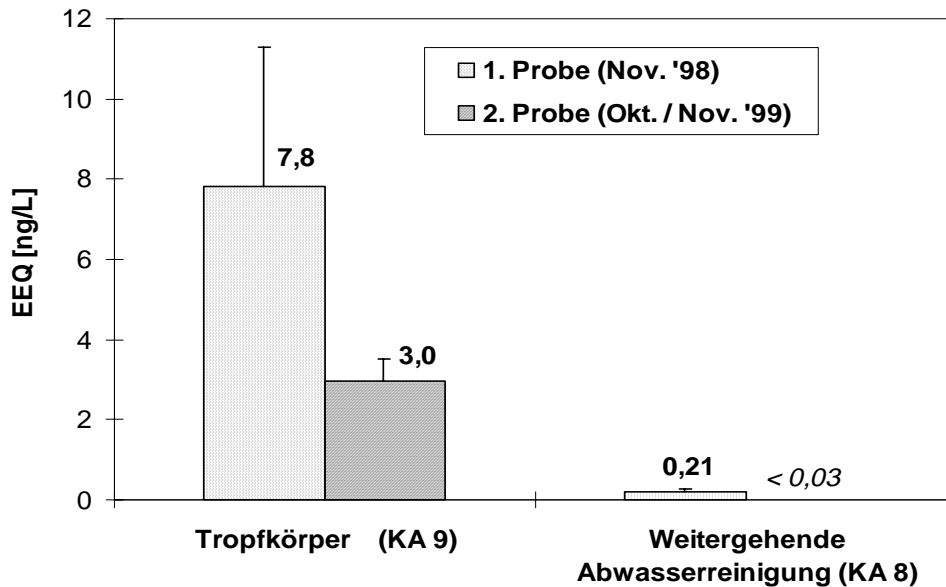


Abbildung 42: 17 β -Estradiol-Äquivalentkonzentrationen in den Abläufen der Kläranlage 9 (Tropfkörper) und 8 (weitergehende Abwasserreinigung) vom Nov. 1998 und Okt./Nov. 1999. Die Säulen stellen die Ergebnisse (Mittelwert \pm Standardabweichung) von jeweils 3 unabhängigen E-Screen-Experimenten dar.

Offensichtlich lassen sich durch eine weitergehende Abwasserreinigung estrogen wirkende Substanzen sehr effizient bis in den unteren oder mittleren ng / L-Bereich entfernen. Um zu klären, welchen Beitrag in der KA 8 der Entfärbungsprozess und die nachfolgende zusätzliche Abfiltration der Aktivkohle bei der weitergehenden Elimination von estrogen aktiven Stoffen liefern, wurde der Ablauf von KA 7 erneut beprobt. Dort erfolgte bei der ersten Beprobung 1998 nur eine Entfärbung des Abwassers. Nachdem 1999 in diese KA hinter der Entfärbungsstufe noch eine Aktivkohlefiltration eingebaut worden war, wurde nochmals eine 24h-Mischprobe vom Ablauf genommen und im E-Screen-Assay untersucht. Der EEQ-Gehalt in der ersten Probe (Nov. 1998) lag mit $1,2 \pm 0,6$ ng / L nur wenig niedriger als der Medianwert für alle zwölf Kläranlagen mit Belebtschlammtechnik (2,0 ng / L). In der zweiten Probe dagegen war keine estrogene Aktivität mehr feststellbar; der zusätzliche Aktivkohlefilter ist offensichtlich sehr effektiv in der Elimination von estrogenartig wirksamen Verbindungen, während der Entfärbungsprozess deren Konzentration kaum verringert. Anscheinend werden organische Spurenstoffe durch eine ausschließlich sorptive Bindung an die Aktivkohle, auch unter Zusatz von Flockungshilfsmitteln und Sedimentation, nicht sehr effektiv aus dem Abwasser entfernt. Nur bei einer Filtration des KA-Ablaufs, d.h. der mechanischen Entfernung von Schwebstoffen und Aktivkohlepartikeln aus der wässrigen Pha-

se, reduzieren sich die Konzentrationen der organischen Spurenstoffe deutlich. Möglicherweise werden nur oberflächlich an die Aktivkohle adsorbierte Verbindungen von dieser auch wieder desorbiert.

2.8 Vergleich der Ergebnisse von GC-MS- und biologischer Analytik

Für einen quantitativen Vergleich der Ergebnisse von E-Screen-Test und GC-MS-Analyse müssen sich die estrogenen Wirkungen der Einzelsubstanzen in einem Gemisch von estrogen aktiven Stoffen im E-Screen-Assay *additiv* verhalten. Dies ist in Anbetracht des allen diesen Substanzen gemeinsamen biologischen Wirkungsmechanismus (Aktivierung des Estrogenrezeptors) zu erwarten und wurde durch entsprechende Befunde von Soto *et al.* [97] auch eindeutig bestätigt.

In Abb. 43 sind die EEQ-Werte der biologischen und chemischen Analytik für die einzelnen KA-Abläufe einander zugeordnet. Die weißen Balken (E-Screen) geben das Ergebnis der biologischen Untersuchung als EEQ in mol / L an. Den EEQ-Wert für die GC-MS-Analyse erhält man, indem man die gemessenen molaren Konzentrationen der einzelnen Substanzen mit dem jeweiligen Estradiol-Äquivalenzfaktor (EEF, s. Tab. 14) multipliziert und die einzelnen EEQ-Werte zu einem Gesamt-EEQ aufsummiert. Tab. 16 zeigt dies beispielhaft für den Ablauf der KA Stuttgart-Mühlhausen (KA 4).

Nicht berücksichtigt wurden dabei Substanzen, die im E-Screen keine estrogen Wirkung gezeigt hatten (z.B. β -Sitosterol: EEF < 10 %) oder für die keine signifikante Konzentration nachweisbar war (z.B. α -Endosulfan in der Mehrzahl der untersuchten KA). Auch Verbindungen, deren analytische Daten in Einzelfällen *nicht auswertbar* waren, wurden in die Berechnung nicht mit einbezogen. Da 4-Nonylphenoldiethoxylat (4-NP2EO) als Standardverbindung bisher nicht zur Verfügung stand, konnte es im E-Screen-Assay nicht getestet und somit auch nicht in die Berechnung aufgenommen werden. Der dadurch entstehende Fehler ist aber als äußerst gering anzusehen, da der 17β -Estradiol-Äquivalenzfaktor von 4-NP2EO sicher kleiner ist als der von 4-Nonylphenoxyessigsäure (4-NP1EC) und die Konzentrationen an 4-NP2EO in den KA-Abläufen auch signifikant geringer waren als die 4-NP1EC-Konzentrationen.

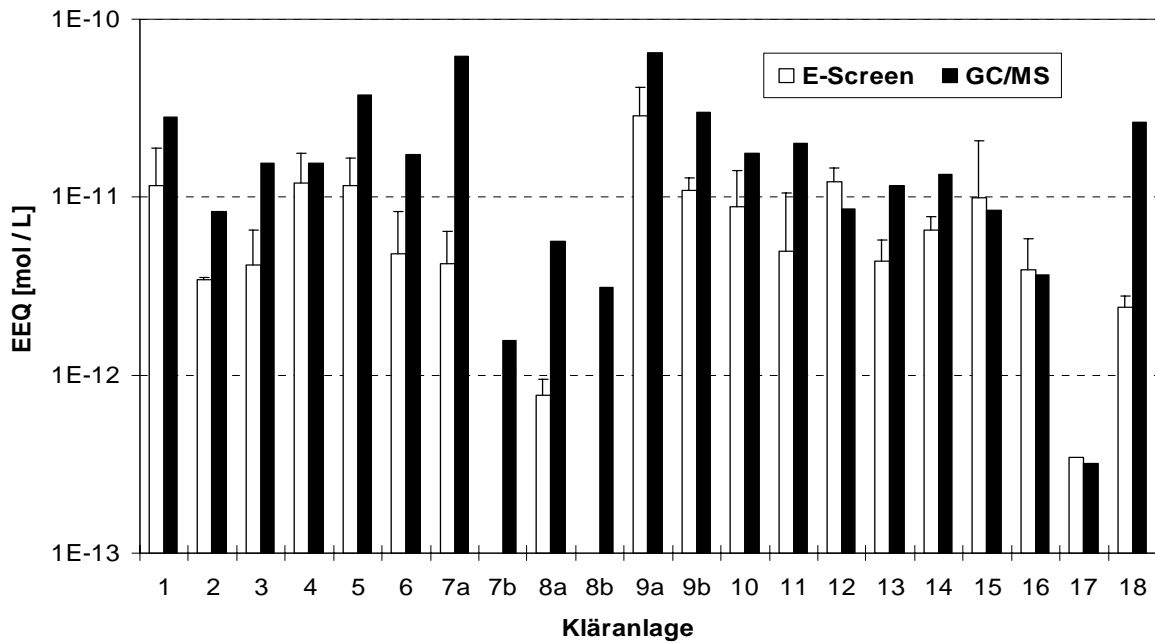


Abbildung 43: Vergleich der 17 β -Estradiol-Äquivalentkonzentrationen (EEQ) von E-Screen-Assay und chemischer Analytik in den Abläufen der untersuchten Kläranlagen.

Tabelle 16: Exemplarische Berechnung der EEQ-Werte am Beispiel des Kläranlagenablaufs Stuttgart-Mühlhausen.

Verbindungen	Molmassen in g / mol	Konz. in ng / L	Konz. in mol / L	EEF ^a	EEQ ^b in mol / L
Di-n-butylphthalat	278,4	530	$1,90 \times 10^{-9}$	$3,4 \times 10^{-7}$	$6,46 \times 10^{-16}$
Benzyl-n-butylphthalat	312,4	120	$3,84 \times 10^{-10}$	$2,5 \times 10^{-6}$	$9,6 \times 10^{-16}$
4-Nonylphenol ^c	220,4	330	$1,50 \times 10^{-9}$	$7,6 \times 10^{-5}$	$1,14 \times 10^{-13}$
4-Nonylphenoxyessigsäure ^c	278,4	1700	$6,11 \times 10^{-9}$	$1,4 \times 10^{-5}$	$8,55 \times 10^{-14}$
Bisphenol A	228,3	100	$4,38 \times 10^{-10}$	$5,3 \times 10^{-5}$	$2,32 \times 10^{-14}$
Genistein	270,4	< NG	—	$2,8 \times 10^{-4}$	—
α -Endosulfan	406,9	< NG	—	$4,8 \times 10^{-6}$	—
17 α -Ethinylestradiol	296,4	0,9	$3,03 \times 10^{-12}$	0,91	$2,76 \times 10^{-12}$
Mestranol	310,4	n.a. ^d	—	0,014	—
17 β -Estradiol	272,4	2,6	$9,54 \times 10^{-12}$	1	$9,54 \times 10^{-12}$
Estron	270,4	3,2	$1,18 \times 10^{-11}$	0,096	$1,14 \times 10^{-12}$
Summe Estrogene					$1,34 \times 10^{-11}$
Summe Gesamt					$1,37 \times 10^{-11}$
E-SCREEN					$1,20 \times 10^{-11}$
Standardabweichung					$5,58 \times 10^{-12}$
Summe Gesamt in % Akt. E-SCREEN					114

^a EEF Estradiol-Äquivalenzfaktor; ^b EEQ 17 β -Estradiol-Äquivalentkonzentration; ^c Isomerenmischung;

^d Messung nicht auswertbar ($R^2 < 0,99$).

2.8.1 Interpretation der Ergebnisse

Während bei den mit GC-MS bestimmten Konzentrationen die Unsicherheit in den Messwerten lediglich 20 % beträgt (s. Kapitel 2.6.2, Tab. 11a-11c), ist die Varianz bei den biologisch bestimmten EEQ-Werten und auch bei den über die 17β -Estradiol-Äquivalenzfaktoren (EEF) in Verbindung mit den gemessenen Konzentrationen berechneten EEQ-Werten wesentlich größer (siehe auch die angegebenen Standardabweichungen). Wie in Kapitel 1.3 erläutert, spielen bei einem biologischen System wie den verwendeten MCF-7-Zelllinien weitere Prozesse eine entscheidende Rolle: Zellmembrandiffusion des estrogen wirkenden Stoffes in das Zytoplasma der Zielzelle, Bindung an den Estrogenrezeptor, Dimerisierung des aktivierten Ligand-Rezeptor-Komplexes, Anbindung an spezifische DNA-Sequenzen sowie die dadurch ausgelöste Transkription verschiedener Gene. Daher ist die Übereinstimmung zwischen den direkt aus dem biologischen Test ermittelten EEQ-Werten und den über die EEF-Werte berechneten EEQ-Werten als zufriedenstellend anzusehen, solange sich die EEQ-Werte einer Probe maximal um den Faktor 2-3 unterscheiden. Wie Abb. 43 zeigt, ist diese Übereinstimmung bei den meisten untersuchten Abwasserproben aus KA-Abläufen gegeben; eine Korrelation zwischen biologisch und mit GC-MS bestimmten Werten ist also möglich.

Bei einigen Ablaufproben (7a,b, 8a,b, 18) lag der aus den gemessenen Konzentrationen berechnete EEQ-Wert um etwa eine Größenordnung höher als das Ergebnis der biologischen Analytik. In den Proben 7b, 8a und 8b waren die Konzentrationen der meisten Einzelsubstanzen ungewöhnlich niedrig und teilweise nahe oder unterhalb der Nachweisgrenze. Auch im E-Screen war nur für eine der drei Proben ein EEQ-Wert berechenbar. Es ist anzunehmen, dass die Ergebnisse sowohl der chemischen als auch der biologischen Methode nahe der Bestimmungsgrenze größere Ungenauigkeiten zeigen. Dass in allen drei nach der Aktivkohlefiltration genommenen Ablaufproben die 17β -Estradiol-Äquivalentkonzentrationen um den Faktor 5-10 niedriger lagen als bei Anlagen ohne weitergehende Abwasserreinigung, wurde aber mit beiden Methoden sicher erkannt. Die Ursache für die starke Abweichung der Resultate von biologischer und chemischer Analytik bei den Proben 7a und 18 ist unklar. Auffällig ist, dass der hohe EEQ-Wert für die GC-MS-Ergebnisse in beiden Fällen auf einem besonders hohen 17β -Estradiolgehalt beruht.

Zu den aus den gemessenen Einzelkonzentrationen berechneten Gesamt-EEQ-Werten der chemischen Analytik tragen natürliche und synthetische Estrogene mit Ausnahme einer Firmenkläranlage insgesamt zu 89-99 % bei (Median 97,5 %, Abb. 44); 17 β -Estradiol und das synthetische 17 α -Ethinylestradiol haben (sofern vorhanden) den mit Abstand größten Anteil am EEQ. Die Xenoestrogene tragen trotz der um bis zu 1000fach höheren Einzelkonzentrationen aufgrund ihrer um Größenordnungen schwächeren estrogenen Potenz nur mit maximal 10 % zum Gesamt-EEQ bei.

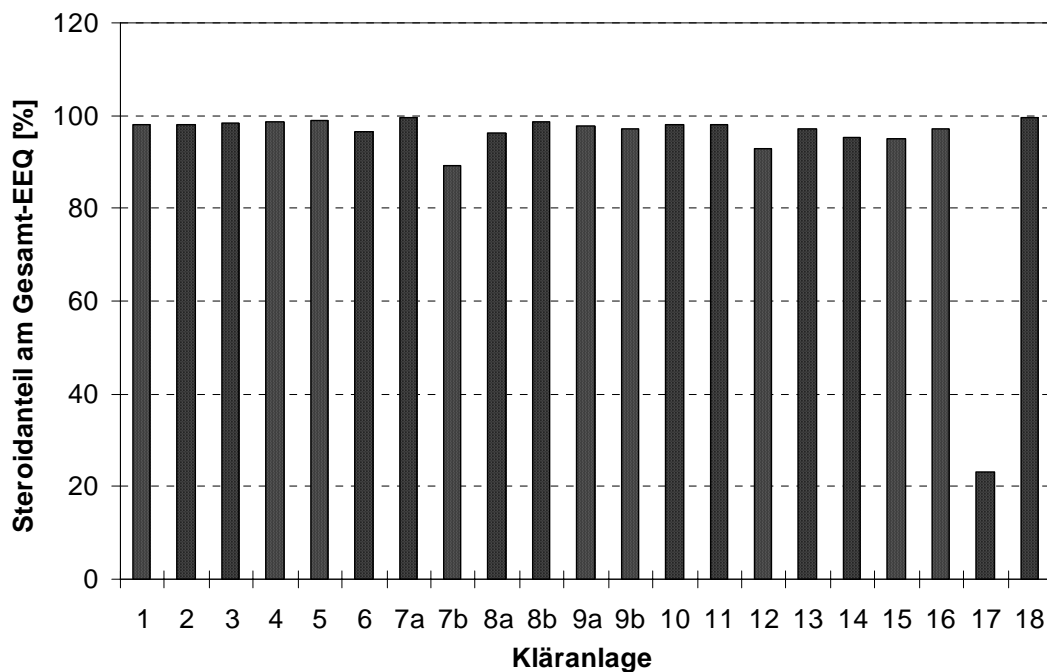


Abbildung 44: Beitrag der natürlichen und synthetischen Estrogene zur gesamten 17 β -Estradiol-Äquivalentkonzentration (EEQ), berechnet aus den gemessenen Konzentrationen der natürlichen und synthetischen Estrogene, sieben Xenoestrogenen und einem Phytoestrogen, in den Abläufen der untersuchten Kläranlagen.

Das in Anbetracht eines gemeinsamen Wirkungsmechanismus über den Estrogenrezeptor erwartete additive Verhalten der estrogenen Aktivität von Einzelsubstanzen in Stoffgemischen wurde für den E-Screen-Test von Soto *et al.* [97] sowie Kortenkamp und Payne [280] gesichert. Überadditive (synergistische) Wirkungen von Xenoestrogenen sind bisher nicht belegt worden. Entsprechende Befunde aus Untersuchungen zu synergistischen Wirkungen von binären Gemischen estrogen wirkender Organochlorinsektizide [Arnold *et al.*, 281] konnten weder von den Autoren selbst noch von anderen Arbeitsgruppen [282] reproduziert werden; die Veröffentlichung wurde daher zurückgezogen [283].

Die wichtigste Voraussetzung für einen quantitativen Vergleich der Ergebnisse von biologischem Test und chemischer Analytik ist somit erfüllt. Das Konzept der „17 β -Estradiol-Äquivalenzfaktoren“ (EEF) kann auf Umweltproben übertragen werden. In Analogie zu den Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) bei halogenierten Dioxinen und dioxinähnlich wirkenden Verbindungen (Ah-Rezeptor-Agonisten) lässt sich der Gesamtgehalt an estrogenartig wirksamen Stoffen in Form einer „17 β -Estradiol-Äquivalentkonzentration“ (EEQ) ausdrücken. Meistens beträgt der Unterschied zwischen den EEQ-Werten für eine Probe das 2- bis 4fache, für wenige Proben bis zu einer Größenordnung. Solche Abweichungen von bis zu einer Größenordnung und mehr zwischen den Ergebnissen von chemischer und biologischer Analytik sind bei aquatischen Umweltproben keine Seltenheit. So lagen beispielsweise die mit GC-MS gemessenen Konzentrationen der TCDD-Toxizitätsäquivalente (TEQ) von dioxinähnlich wirkenden Verbindungen in Sedimentproben 10 bis 100 mal höher als die mit einem Reporter-Gen-Assay ermittelten TEQ-Gehalte [284].

Der Vergleich von biologischer und chemischer Analytik zeigt, dass mit den über GC-MS quantifizierten Verbindungen die im E-Screen ermittelte estrogen Wirkung gut zu deuten ist. Natürlich ist nicht auszuschließen, dass außer den für die instrumentelle Analyse ausgewählten Verbindungen weitere Substanzen zur estrogenen Wirkung einer Umweltprobe beitragen. Die hier vorgestellten Ergebnisse belegen jedoch, dass die Substanzauswahl für das Screening-Protokoll (s. Kapitel 2.1) die wichtigsten für eine estrogen Wirkung in den untersuchten Abwasserproben verantwortlichen Strukturen erfasst.

2.8.2 Öko- und humantoxikologische Relevanz

Inwieweit die in KA-Abläufen gemessenen estrogenen Aktivitäten in der Zellkultur und die analytisch bestimmten Konzentrationen steroidaler Estrogene und Xenoestrogene eine ökotoxikologische Relevanz besitzen, zeigt das Ergebnis eines Halbfreilandexperimentes am Unterlauf der Körsch (Baden-Württemberg). Die Körsch führt als relativ kleiner Vorfluter (Jahreswassermenge 57 Mio. m³) eine verhältnismäßig große Fracht an geklärtem Abwasser von ca. 20 Mio m³ / Jahr. In Trockenperioden besteht der Wasserkörper der Körsch sogar nahezu vollständig aus geklärtem Abwasser. Erwachsene männliche Bachforellen, die zuvor in Quellwasser lebten, wurden im April 1998 in einem Bypass-System vier Wochen lang in Körsch-Wasser gehalten. Nach der Exposition waren im Plasma der Fische die Vitellogeninspiegel mit $72,6 \pm 4,5$ ng / mL

(n = 19) signifikant erhöht gegenüber dem Wert zu Versuchsbeginn ($38,7 \pm 5,1$ ng / mL; n = 19) [285]. Die Induktion der estrogenabhängigen Vitellogeninsynthese bei erwachsenen männlichen Fischen in Flüssen unterhalb von Kläranlagenabläufen wird also keineswegs nur in England [23,286] oder in Ballungsgebieten der USA [287] beobachtet. Bei wiederholten Probennahmen im Verlauf eines Jahres waren außerdem sowohl 17β -Estradiol und Estron als auch eine estrogenische Aktivität im E-Screen nachweisbar [285].

In England wurden mit Einzelsubstanzen Laboruntersuchungen an männlichen Regenbogenforellen durchgeführt [9]; nach drei Wochen Exposition mit 17α -Ethinylestradiol waren die Vitellogenin-Plasmaspiegel noch bei Konzentrationen unter 0,5 ng / L im Wasser signifikant erhöht. In vergleichbaren Experimenten lag die Wirkungsschwelle für 17β -Estradiol bei 1-10, für Estron bei 25 ng / L [13]. Die gleichzeitige Exposition gegenüber einem Gemisch aus je 25 ng / L 17β -Estradiol und Estron zeigte ein mindestens additives Verhalten der Wirkung der beiden Einzelsubstanzen.

Die in dieser Arbeit für Kläranlagenabläufe bestimmten Konzentrationen liegen im Bereich dieser Wirkungsschwellen oder sogar darüber. Zusätzlich müssen noch andere estrogen aktive Substanzen berücksichtigt werden, deren Einzelkonzentrationen jeweils unter der Wirkungsschwelle liegen können. Das bereits beschriebene additive Verhalten der Wirkungen von estrogen aktiven Substanzen im Gemisch bedeutet, dass das Gemisch eine deutliche estrogenische Wirkung zeigen kann, selbst wenn die Konzentrationen der einzelnen Stoffe unterhalb oder an der Wirkungsschwelle liegen.

Ob die Induktion der estrogenabhängigen Vitellogeninbildung in männlichen Fischen und Amphibien bereits negative Auswirkungen auf die Reproduktion und damit auf die Population und den Fortbestand einer Art hat, ist derzeit noch unklar und wird kontrovers diskutiert. Jobling *et al.* [288] fanden im Laborexperiment, dass die Induktion der Vitellogeninbildung in männlichen Forellen durch 4-Alkylphenole von einer Inhibierung des Hodenwachstums begleitet ist. Weitgehend ungeklärt sind auch die Auswirkungen estrogenischer Substanzen auf die zahlreichen Arten der in Fließgewässern lebenden Wirbellosen (z.B. Fliegenlarven, Kleinkrebse, Wasserflöhe, Schnecken). Aufgrund ihrer großen Biomasse, der Artenvielfalt und ihrer Stellung in der mittleren trophischen Ebene besitzen wirbellose Tiere eine zentrale Bedeutung in aquatischen Ökosystemen, z.B. als Nahrungsquellen für Fische und Amphibien.

Eine toxikologische Relevanz der in den Kläranlagenabläufen bestimmten Konzentrationen verschiedener Estrogene für den Menschen ist unwahrscheinlich, obgleich die Datenlage zum Umweltverhalten von einigen dieser Substanzen unbefriedigend ist. Der mögliche Expositionspfad wäre das Trinkwasser, entweder durch Gewinnung aus Oberflächenwasser oder aus Uferfiltraten. Vor allem bioakkumulierbare Stoffe können eine Belastung darstellen, falls sie nicht aufgrund der oralen Applikation metabolisiert und ausgeschieden werden. Einige der nachweisbaren Xenoestrogene sind relativ schlecht in Wasser löslich und besitzen einen relativ hohen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log K_{OW} > 3$). Der $\log K_{OW}$ -Wert für 17α -Ethinylestradiol beispielsweise beträgt 4,2 [274]. Ein hoher $\log K_{OW}$ korreliert mit einer hohen Adsorptionsfähigkeit an organische Kohlenstoff-Matrizes wie Sedimentpartikel und Böden. Deshalb sollten diese Stoffe bereits durch die Uferfiltration aus dem Wasser entfernt werden. Jürgens und Johnson [289] fanden zwar für 17β -Estradiol einen relativ hohen $\log K_{OW}$ von $3,1 \pm 0,1$, bei Sorptionsexperimenten mit Sediment- und Wasserproben aus verschiedenen englischen Flüssen war jedoch der Zusammenhang zwischen dem Verteilungskoeffizient K_d und dem Gehalt an organischem Kohlenstoff im Sediment viel weniger deutlich als für 4-*tert*-Oktylphenol [290]. Da zwischen K_d und dem Anteil an Schluffpartikeln im Sediment aber eine positive Korrelation gefunden wurde [289], sollte die Uferfiltration von Oberflächenwasser bereits für eine weitgehende Entfernung von 17β -Estradiol aus dem Wasser sorgen. Weil sich bei der Oxidation der OH-Gruppe in Position 17 des Estradiol-Moleküls zur Keto-Gruppe die Polarität des Moleküls nicht wesentlich ändern sollte, müsste dies analog auch für Estron gelten. Die in Wasserwerken üblichen Sand- und Aktivkohlefilter sollten demnach die quantitative Entfernung der Steroide aus dem Wasser gewährleisten, zumal sich die Aktivkohlefilter auch im Rahmen dieser Arbeit in der Abwasserreinigung als effizient erwiesen haben und auch beim E-Screen-Assay zur Entfernung der Estrogene aus dem Serum benutzt werden.

Probleme könnten sich eventuell für die 4-Nonylphenoxyessigsäure (4-NP1EC) wegen der Strukturanalogie zur Clofibrinsäure (4-Chlorphenoxyisobutylsäure) ergeben, dem primären Metabolit des als Lipidsenker eingesetzten Clofibrat. Clofibrinsäure wurde nicht nur in zahlreichen deutschen Oberflächengewässern und Kläranlagenabläufen [264,291] sowie im Berliner Grundwasser gefunden [292]; sogar im Berliner Trinkwasser wurde es häufig nachgewiesen ($\leq 0,27 \mu\text{g} / \text{L}$), wobei die Konzentrationen vom Anteil des Uferfiltrats abhängig waren [293]. Untersuchungen zum Verhalten von

4-NP1EC bei der Trinkwasseraufbereitung wären deshalb aus Vorsorgegründen wünschenswert. Doch selbst wenn man eine unvollständige Entfernung von 4-NP1EC bei der Trinkwasseraufbereitung aus Oberflächenwasser bzw. Uferfiltrat unterstellt, liegen die gefundenen Konzentrationen an 4-NP1EC für eine gesundheitliche Beeinträchtigung des Menschen über das Trinkwasser sehr wahrscheinlich zu niedrig.

2.8.3 Zusammenfassende Wertung und Interpretation

Das hier vorgestellte GC-MS-Analyseverfahren erlaubt die simultane quantitative Bestimmung zahlreicher strukturell unterschiedlicher Verbindungen im Abwasser von Kläranlagenabläufen. Analysiert wurden die natürlichen und synthetischen Estrogene 17β -Estradiol, Estron, 17α -Ethinylestradiol und Mestranol, die Phytoestrogene Genistein und β -Sitosterol, die Mykoestrogene Zearalenon und α -Zearalenol und die Xenoestrogene Benzyl-n-butylphthalat, Di-n-butylphthalat, Bisphenol A, 4-Nonylphenol (Isomerengemisch), 4-Nonylphenoxyessigsäure (Isomerengemisch), 4-Nonylphenoldiethoxylat (Isomerengemisch), 4-*tert*-Oktylphenol und α -Endosulfan. Für nahezu alle diese Verbindungen ist eine estrogenische Wirkung ebenso gesichert wie ihre Umweltrelevanz, d.h. sie kommen tatsächlich in der Umwelt vor. Mit Hilfe der erst im Laufe des Screening-Programms zusätzlich analysierten Mykoestrogene Zearalenon und α -Zearalenol und des Xenoestrogens 4-*tert*-Oktylphenol konnte gezeigt werden, dass das Analyseverfahren problemlos auf weitere, strukturell verschiedene Verbindungen mit estrogenischer Wirkung übertragbar ist, solange es sich um organische Spurenstoffe handelt. Eine korrekte Bestimmung des Phthalsäureesters Di-n-butylphthalat dagegen ist aufgrund der umfangreichen Kontaminationsquellen nicht durchführbar.

Die Quantifizierung der ausgewählten Verbindungen erfolgte mit Hilfe von substanzspezifischen, teilweise stabilisotopen-markierten internen Standards. Das angewandte Standardadditions-Verfahren mit vier Aufstockungen erlaubt eine zweifelsfreie Identifizierung und matrixunabhängige Bestimmung und stellt zugleich eine „interne Kontrolle“ für die Quantifizierung dar. Für die steroidalen Estrogene wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32 645 [270] mit einem Vertrauensband von 99 % über das gesamte Verfahren berechnet. Durch die Analyse einer Flusswasserprobe und vor allem durch die Analyse der Abwasserprobe eines Regenüberlaufbeckens konnte zudem gezeigt werden, dass das entwickelte Verfahren auch auf andere, technisch problematischere wässrige Matrices anwendbar ist.

Die Auswahl der beprobten Kläranlagen wurde nach ihrer geographischen Lage, dem industriellen Abwasseranteil, ihrer Kapazität und ihrer technischen Ausstattung vorgenommen. Ein Zusammenhang war nur zwischen der technischen Ausstattung einer Kläranlage und den Konzentrationen estrogenartig wirksamer Verbindungen im Abwasser des Kläranlagenablaufs erkennbar. Durch Wiederholungsbeprobungen einzelner Kläranlagenabläufe konnte zwar die Hypothese erhärtet werden, dass Kläranlagen mit Tropfkörperverfahren deutlich höhere Ablaufkonzentrationen hormonell aktiver Verbindungen aufweisen als Belebungsanlagen mit zusätzlicher Aktivkohlefiltration des Abwassers, doch sind definitive Aussagen zur Eliminationsleistung in Abhängigkeit von der technischen Ausstattung einer Kläranlage erst nach Einzelstufenbeprobungen und Bilanzierungen an weiteren Kläranlagen möglich.

Zwischen den Ergebnissen der GC-MS-Analysen und den Resultaten des biologischen Wirkungstests war eine eindeutige Korrelation erkennbar. Die bei nahezu allen untersuchten Abwässern aus Kläranlagenabläufen messbare estrogenen Gesamtaktivität war im Rahmen eines für biologische Untersuchungen akzeptablen Toleranzbereichs (Faktor 2-3) vergleichbar mit den GC-MS-analytisch bestimmten Konzentrationen hormonell wirksamer Verbindungen. Durch den Vergleich von organischer Spurenanalytik und biologischem Wirkungstest wurde ermittelt, dass über 90 % der estrogenen Gesamtaktivität der Kläranlagenabläufe auf die natürlichen und synthetischen Estrogene (vor allem 17β -Estradiol und 17α -Ethinylestradiol) zurückzuführen sind. Die übrigen estrogenartig wirksamen Verbindungen tragen in diesem Testsystem nur zu einem geringen, aber nicht vernachlässigbaren Anteil zur estrogenen Wirkung einer Abwasserprobe bei.

Die durch estrogen wirkende Verbindungen in aquatischen Organismen ausgelösten Prozesse sind allerdings oftmals wesentlich komplexer, als sich durch den auf zellulärer Basis arbeitenden E-Screen-Assay zeigen lässt. Deshalb ist eine Abgrenzung der estrogenen Wirkung auf die hier dominierenden natürlichen und synthetischen Estrogene nicht angebracht. In Lebewesen können in die Umwelt eingetragene anthropogene Substanzen, wie z.B. die Xenoestrogene zahlreiche Wirkungen hervorrufen, die sich durch ein *in vitro*-Testsystem nicht erfassen lassen. Wichtige Eigenschaften eines estrogen wirkenden Stoffes sind vor allem seine Persistenz und seine Fähigkeit zur Bioakkumulation. Von gleicher Bedeutung sind aber auch die Bioverfügbarkeit einer Substanz im Körper des entsprechenden Organismus und der Metabolisierungs- bzw. Ausscheidungsweg. Von besonderer Relevanz ist die erhöhte Empfindlichkeit von

Organismen auf entsprechende Stoffe in hochsensiblen Stadien der Entwicklung. Allein die dauerhafte Anwesenheit zahlreicher Xenoestrogene in den Abwässern von Kläranlagenabläufen und damit auch in den Oberflächengewässern, und zwar in Konzentrationen bis in den $\mu\text{g} / \text{L}$ -Bereich, kann zu Langzeiteffekten führen, die sich bislang nicht abschätzen lassen.

Die im E-Screen-Assay bestimmte estrogenere Gesamtaktivität der Abwasserproben zeigte die gleiche Abhängigkeit von der technischen Ausstattung der Kläranlage wie die Ergebnisse der GC-MS-Analyse. Die aktivkohlefiltrierten Abwässer aus Kläranlagenabläufen wiesen nur sehr geringe bis nicht nachweisbare estrogenere Gesamtaktivitäten auf; im Vergleich dazu wurde auch hier die höchste estrogenere Aktivität für die Abwasserproben des Kläranlagenablaufs einer reinen Tropfkörperanlage gemessen. Die endgültige Absicherung dieses Zusammenhangs erfordert aber eingehendere Untersuchungen wie Einzelstufenbeprobungen und Bilanzierungen entsprechend ausgestatteter Kläranlagen.

3 Fraktionierung einer Kläranlagenablaufprobe zur chemischen und biologischen Analyse

Wie die Untersuchung der Kläranlagenabläufe mit dem E-Screen-Assay gezeigt hat, ist die estrogenen Aktivität von Abwasserproben überwiegend (> 90 %) auf natürliche und synthetische Estrogene zurückzuführen. Da aber Abwasserproben, auch von einem gereinigten Kläranlagenablauf, mit Sicherheit noch viele andere Verbindungen enthalten, wurde eine Abwasserprobe chromatographisch in einzelne Fraktionen aufgetrennt und diese getrennt analysiert und biologisch getestet.

Dabei sollte zugleich eine generell anwendbare HPLC-Methode zur Auftrennung einer Abwasserprobe entwickelt werden. Die aufgetrennten Fraktionen sollten sowohl strukturspezifisch auf die im Screening ausgewählten Substanzen analysiert als auch mit dem biologischen Wirkungstest auf ihre estrogenen Aktivität getestet werden. Falls außer den für das Screening ausgewählten Analyten noch weitere Substanzen einen signifikanten Beitrag zur estrogenen Wirkung der Abwasserprobe liefern, müsste sich ein deutlicher Unterschied in der estrogenen Aktivität der einzelnen Fraktionen zwischen den über die 17β -Estradiol-Äquivalenzfaktoren berechneten und den durch den biologischen Test erhaltenen EEQ-Werten zeigen.

3.1 Entwicklung und Optimierung einer HPLC-Methode zur Fraktionierung von Abwasser aus Kläranlagenabläufen

Zur Optimierung der analytischen HPLC-Trennung hinsichtlich Laufmittel, Trennsäule und Gradientenprogramm dienten Standardlösungen der für das Screening ausgewählten Analyten. Für die Fraktionierung einer realen Kläranlagenablaufprobe musste die im analytischen Maßstab optimierte Methode auf eine präparative Säule mit entsprechend höheren Flussraten und Injektionsvolumina übertragen werden. Diese Übertragung von der analytischen auf eine präparative Säule mit identischem Packungsmaterial ist problemlos, da sich die Retentionszeiten an den beiden Säulen nur geringfügig, die Reihenfolge der Verbindungen im Chromatogramm überhaupt nicht ändern, sofern folgende Voraussetzungen erfüllt sind:

- gleiche Länge beider Säulen (einschließlich entsprechender Vorsäulen),
- Erhöhung der Flussrate um das vierfache bei doppeltem Säulendurchmesser.

3.1.1 Material und Geräte

Zusätzlich zu den bereits in Kapitel 2.3.1 aufgeführten Materialien wurden folgende weiteren Materialien und Geräte benötigt:

Chemikalien/Lösungsmittel	Reinheit	Quelle
Acetonitril	99,7 %	Mallinckrodt-Baker B. V., Va Deventer, Niederlande
Ammoniumacetat	pro analysi, 98 %	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	pro analysi, 99 %	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure	pro analysi, 85 %	Merck, Darmstadt
Trifluoressigsäure	Uvasol® > 99,8 %	Merck, Darmstadt

Geräte	Spezifikationen	Hersteller
HPLC 1100-System	Entgasermodul G 1322A, binäre Pumpe G1312A, automatischer Probengeber G1313A, DAD G1315A	Agilent Technologies, Waldbronn
HPLC-Pumpe	K-1001 mit Solvent Organizer K-1500	Knauer, Berlin
Säulenthermostat	BFO-04 1s	W. O. Electronics, Langen- zersdorf, Österreich
Detektor	DAD variable wavelength monitor	Knauer, Berlin
Plotter	Mega Series Integrator Model SP 4270	Carlo Erba, San Jose, USA

HPLC-Säulen ^a	Spezifikationen
Prontosil 120-3-C18 SH 3 µm	analytische Säule, ID 4 mm, Länge 100 mm
Vorsäule zu Prontosil 120-3-C18 SH 3 µm	ID 4 mm, Länge 10 mm
Prontosil 120-3-Phenyl 3 µm	analytische Säule, ID 4 mm, Länge 100 mm
Vorsäule zu Prontosil 120-3-Phenyl 3 µm	ID 4 mm, Länge 10 mm
Prontosil 120-3-C18 SH 3 µm	präparative Säule ID 8 mm, Länge 80 mm
Vorsäule zu Prontosil 120-3-C18 SH 3 µm	ID 8 mm, Länge 33 mm

^a Alle HPLC-Säulen wurden bezogen über Firma Bischoff Analystechnik, Leonberg.

3.1.2 Experimentelle Methodenentwicklung im analytischen Maßstab

Aufgrund einer Literaturrecherche wurden zwei verschiedene analytische Trennsäulen auf ihre Verwendbarkeit getestet, eine Phenylsäule (Prontosil 120-3-Phenyl 3 µm, ID 4 mm, Länge 100 mm) und eine RP-C18 Säule (Prontosil 120-3-C18 SH 3 µm, ID 4 mm, Länge 100 mm), jeweils gekoppelt mit den entsprechenden Vorsäulen. Als Laufmittel B wurde Acetonitril gewählt, als Laufmittel A Ammoniumacetat-Pufferlösung (5 mM).

Dieses Laufmittelsystem hat sich bei anderen HPLC-Methodenentwicklungen in der Arbeitsgruppe Metzger bewährt [294]. Das Gradientenprogramm wurde im Laufe der Tests in weiten Grenzen variiert; isokratische Messungen ergaben keine erfolgreiche Trennung. Bei einem optimierten Fluss von 0,6 mL / min erwies sich von den vier verfügbaren Wellenlängen des DAD (210, 235, 250 und 275 nm) die Detektion bei 235 nm als besonders vorteilhaft; damit ließen sich alle in den Standardlösungen enthaltenen Substanzen mit guter Empfindlichkeit nachweisen (s. Abb. 45,46). Die getestete RP-C18-Säule ergab bessere Trennungen als die Phenylsäule.

Nach der Festlegung von Säule, Gradientenprogramm, Flussrate und Detektionswellenlänge wurde noch Laufmittel A angepasst. Da die Kläranlagenabläufe für die spätere Fraktionierung wie im Screening (s. Kapitel 2) bei pH 2 angereichert werden sollten, musste die wässrige Laufmittelkomponente A auf pH 2 einstellbar sein. Der gängige Phosphatpuffer (H_3PO_4 / NaH_2PO_4 , pH 2, 5 mM) erwies sich bei der anschließenden GC-MS-Analyse wegen mangelhafter Flüchtigkeit als ungeeignet. Mit 0,1 %iger wässriger Trifluoressigsäurelösung als Laufmittelkomponente A dagegen ließ sich die GC-MS-Analyse problemlos durchführen; Trifluoressigsäure ist hinreichend leichtflüchtig und führt zu keiner Kontamination des GC-MS-Systems. An der RP-C18 Säule wurden die Standardmischungen mit den in Tab. 17 angegebenen Parametern chromatographisch aufgetrennt. Abb. 45 und 46 zeigen die DAD-Spuren bei 235 nm für sämtliche Trennungen.

Tabelle 17: Chromatographische Parameter für die analytische Fraktionierung von Abwasser aus Kläranlagenabläufen über eine RP-C18-Säule.

Laufmittel A	Wasser/0,1 %ige Trifluoressigsäure (TFA), pH 2
Laufmittel B	Acetonitril (ACN)
Gradientenprogramm	0 min 20 % B; 9,5 min 58 % B; 14 min 58 % B; 15 min 67 % B 18 min 72 % B; 22 min 90 % B; 30 min 90 % B
Temperatur	24 °C
Analytische Säule	Prontosil 120-3-C18 SH 3 µm, ID 4 mm, Länge 100 mm
Vorsäule	Prontosil 120-3-C18 SH 3 µm, ID 4 mm, Länge 10 mm
Fluss	0,6 mL / min
Detektion	DAD bei 235 nm

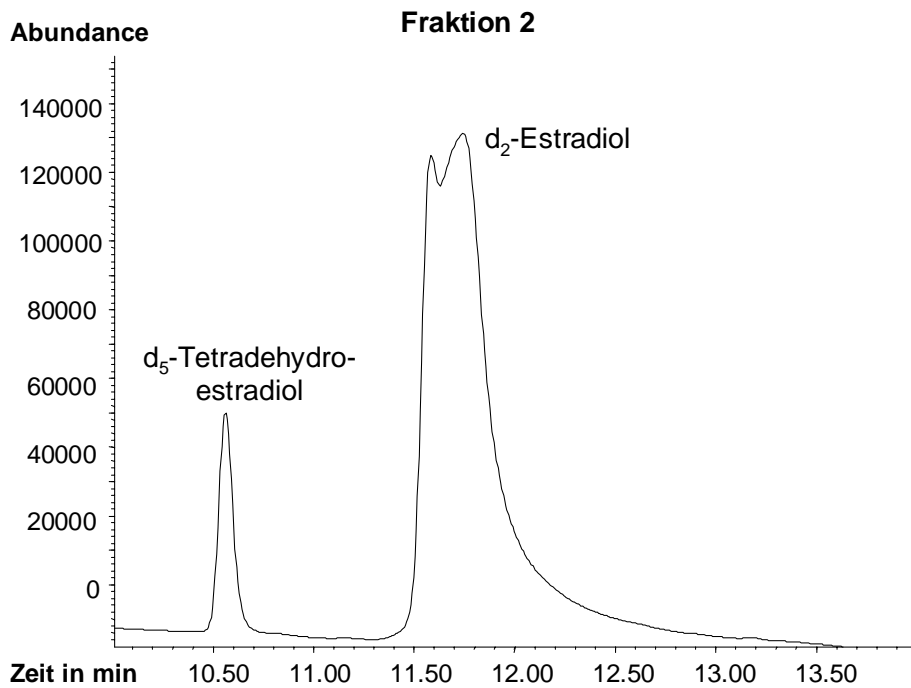
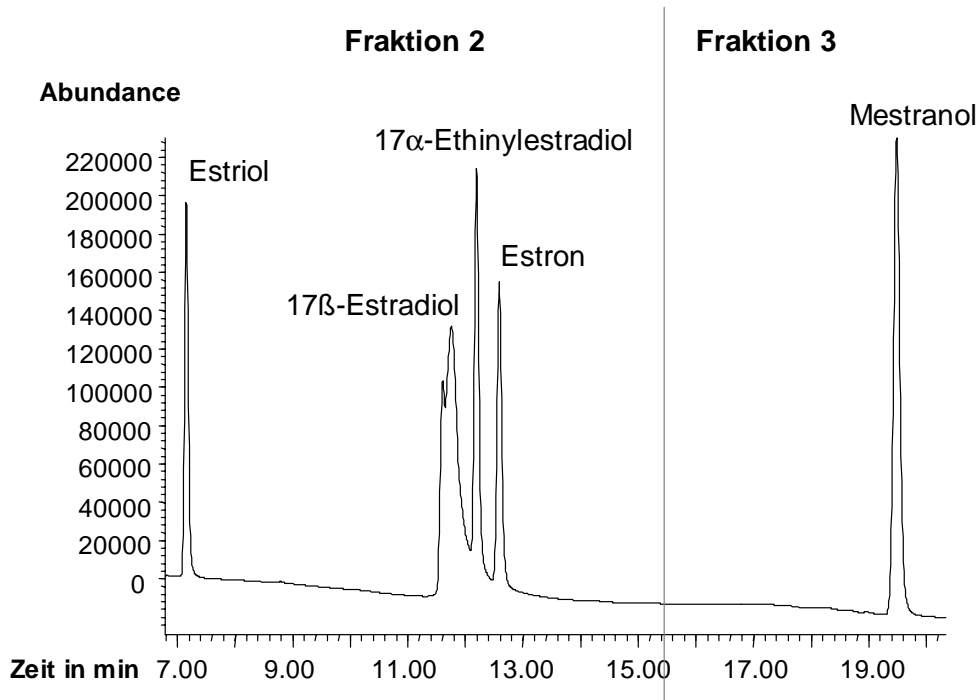


Abbildung 45: HPLC-Chromatogramme der natürlichen und synthetischen Estrogene und der entsprechenden internen Standards nach Auftrennung an der analytischen HPLC-Säule (ID 4 mm) mit Dioden-Array-Detektion bei 235 nm.

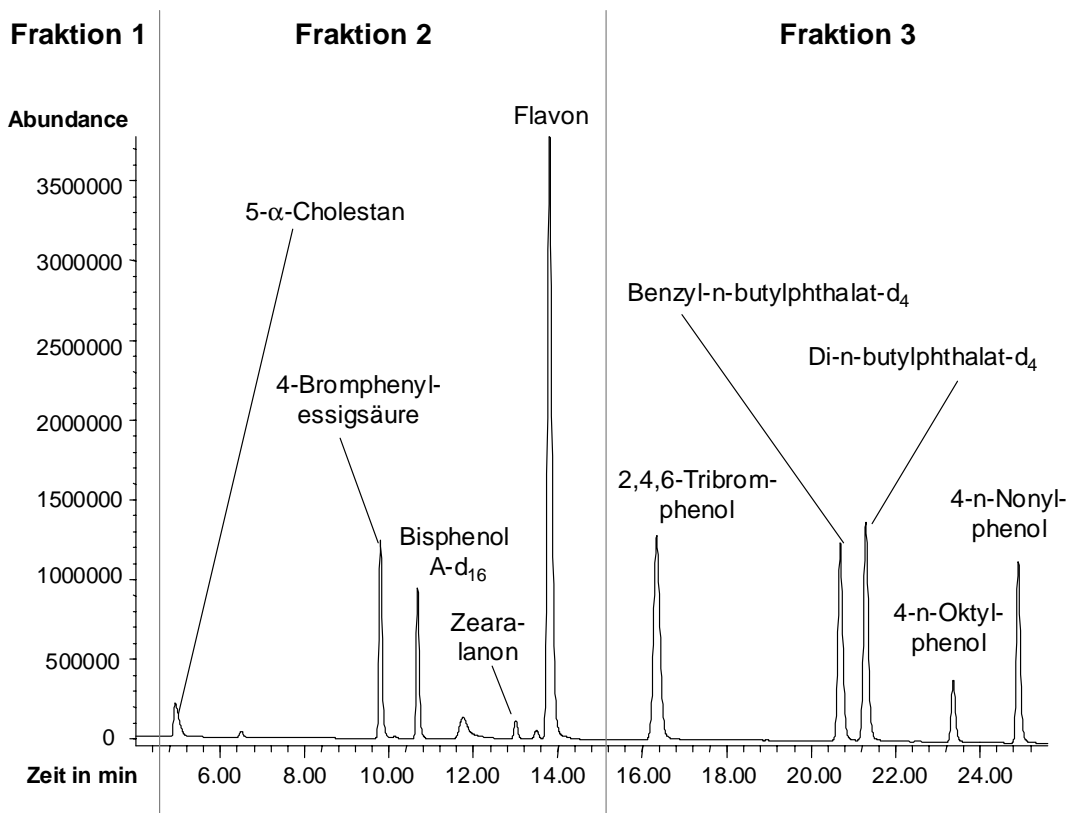
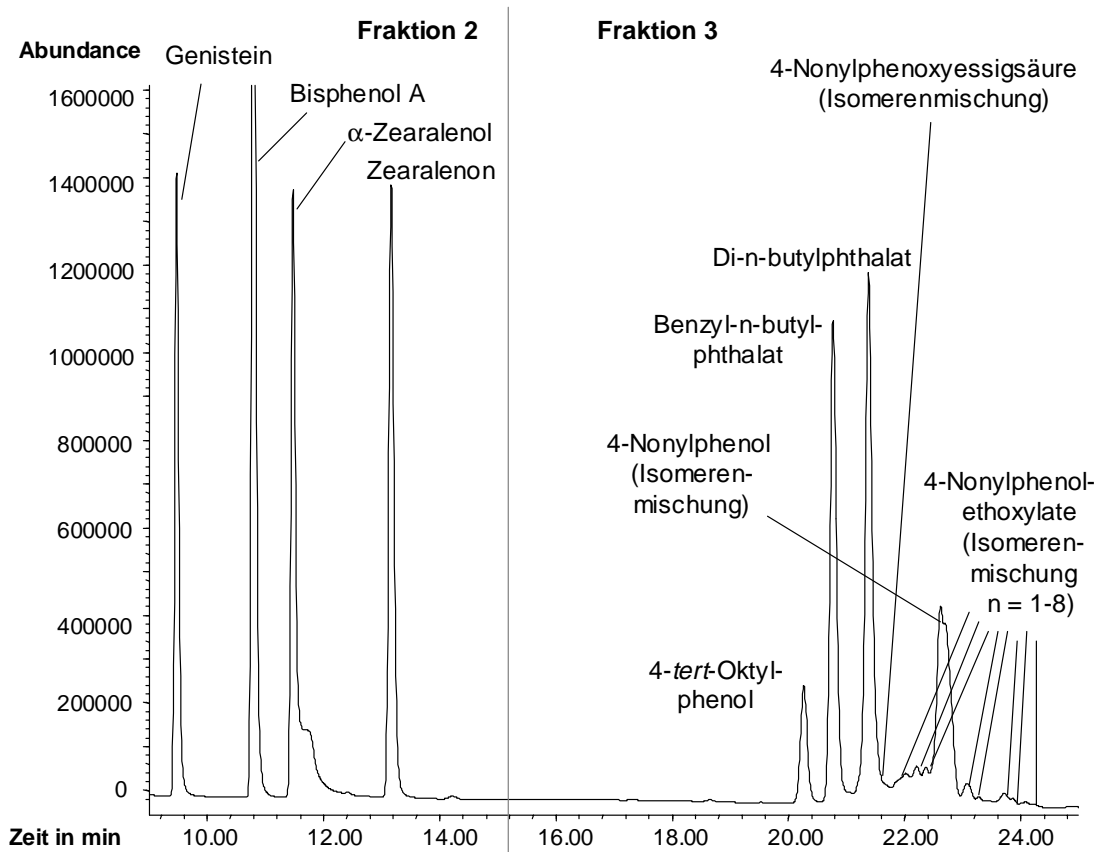


Abbildung 46: HPLC-Chromatogramme der estrogenartig wirksamen Substanzen und der entsprechenden internen Standards nach Auftrennung an der analytischen HPLC-Säule (ID 4 mm) mit Dioden-Array-Detektion bei 235 nm.

Mit der optimierten HPLC-Methode wurde dann das Abwasser eines durch Festphasenextraktion angereicherten und mit Analyten aufgestockten Kläranlagenablaufs in drei Fraktionen aufgetrennt (s. Tab. 18). Dabei zeigte sich, dass Empfindlichkeit und Selektivität des DAD für die quantitative Analyse der in Kläranlagenabläufen vorliegenden Analyt-Konzentrationen nicht ausreichend waren. Die drei Fraktionen wurden daher gemäß ihrer Retentionszeit geschnitten, aufgearbeitet und derivatisiert. Bei der GC-MS-Analyse wurden in den einzelnen Fraktionen die in Tab. 18 angegebenen Verbindungen identifiziert.

Tabelle 18: Fraktionen für die HPLC-Trennung von Abwässern aus Kläranlagenabläufen angeordnet nach abnehmender Polarität.

Fraktionen (Retentionszeit)	Stoffklassen/Substanzen
1 (0-4,6 min)	hydrophile Substanzen wie Huminsäuren u.a.
2 (4,6-15,4 min)	schwach hydrophile bis lipophile Substanzen: 17 β -Estradiol, 17 α -Ethinylestradiol, Estron, Bisphenol A, Genistein, Zearalenon, α -Zearalenol u.a.
3 (15,4-30 min)	Substanzen mit eher lipophilem Charakter: Di-n-butylphthalat, Benzyl-n-butylphthalat, 4- <i>tert</i> -Oktylphenol, 4-Nonylphenol, 4-Nonylphenoxyessigsäure, 4-Nonylphenoldiethoxylat, Mestranol u.a.

3.1.3 Übertragung der optimierten analytischen Methode auf den präparativen Maßstab

Die an der analytischen Säule entwickelte und optimierte HPLC-Methode wurde zur Fraktionierung des Abwassers eines Kläranlagenablaufs auf eine präparative Säule übertragen. Dazu wurde ein aus Einzelkomponenten zusammengesetztes HPLC-System benutzt, mit dem in der Arbeitsgruppe Metzger bereits potentiell bioakkumulierbare Verbindungen aufgetrennt werden konnten [294]. Der Durchmesser der präparativen Säule betrug mit 8 mm das Doppelte des Durchmessers der analytischen HPLC-Säule; die Flussrate wurde daher entsprechend von 0,6 auf 2,4 mL / min erhöht. Die präparative Säule wies mit 113 mm (einschließlich Vorsäule) fast die gleiche Länge auf wie die analytische Säule (110 mm einschließlich Vorsäule). Die chromatographischen Parameter für die präparative HPLC-Trennung sind in Tab. 19 zusammengestellt.

Tabelle 19: Chromatographische Bedingungen für die Fraktionierung von Abwasser aus Kläranlagenabläufen mit präparativer HPLC.

Laufmittel A	Wasser/0,1 %ige TFA (pH 2)
Laufmittel B	Acetonitril (ACN)
Gradientenprogramm	0 min 20 % B; 9,5 min 58 % B; 14 min 58 % B; 15 min 67 % B 18 min 72 % B; 22 min 90 % B; 30 min 90 % B
Temperatur	24 °C
Präparative Trennsäule	Prontosil 120-3-C18 SH 3 µm, ID 8 mm, Länge 80 mm
Präparative Vorsäule	Prontosil 120-3-C18 SH 3 µm, ID 8 mm, Länge 33 mm
Fluss	2,4 mL / min
Detektor	DAD bei 235 nm
Injektionsvolumen	2,0 mL

Die für die präparative HPLC-Säule bestimmten Retentionszeiten sämtlicher Einzelsubstanzen variierten wegen geringer Druckschwankungen der HPLC-Pumpe etwas im Absolutwert; die Elutionsreihenfolge änderte sich erwartungsgemäß nicht gegenüber der an der analytischen Säule (s. Tab. 20). Auch im präparativen Maßstab wurden qualitative Probeläufe mit angereichertem und aufgestocktem Abwasser des Kläranlagenablaufs Stuttgart-Büsnau durchgeführt; dabei konnten nahezu alle zugesetzten Verbindungen sowie die entsprechenden internen Standards mit DAD-Detektion bei 235 nm identifiziert werden.

Auf die Bestimmung von Genistein, α -Endosulfan, α -Zearalenol und Zearalenon sowie der entsprechenden internen Standards wurde verzichtet, da das Screening gezeigt hatte, dass diese Verbindungen nur vereinzelt und dann in sehr geringer Konzentration in Abwässern der untersuchten Kläranlagenabläufe enthalten waren. Da β -Sitosterol bereits in den Standardmischungen bei 235 nm nicht detektiert werden konnte, wurden β -Sitosterol und der zugehörige interne Standard 5 α -Cholestan ebenfalls nicht bestimmt. β -Sitosterol zeigte zudem als einzige der ausgewählten Verbindungen im E-Screen-Assay keine Wirksamkeit und liefert insofern auch keinen Beitrag zur estrogenen Potenz der einzelnen Fraktionen (s. Kapitel 2.7.1). 4-Nonylphenoxyessigsäure (4-NP1EC) eluierte in der dritten Fraktion und konnte nicht über den internen Standard 4-Bromphenylessigsäure quantifiziert werden, da dieser in der zweiten Fraktion eluierte. Bei der präparativen HPLC-Analyse wurde 4-NP1EC deshalb gemeinsam mit 4-Nonylphenol (4-NP) über den internen Standard 4-n-Nonylphenol quantifiziert. Auf die Analyse von Mestranol in Fraktion 3 wurde gleichfalls verzichtet, da es bereits im menschlichen Organismus oder spätestens in der Kläranlage weitgehend zu 17 α -Ethinylestradiol umgewandelt wird.

Tabelle 20: Vergleich der Retentionszeiten (min) für die einzelnen Komponenten bei der analytischen und der präparativen HPLC-Trennung.

Fraktionen	Stoffklassen/Verbindungen	Retentionszeit in der	
		analytischen HPLC	präparativen HPLC
1	Huminsäuren u.a.	-----	-----
2	5 α -Cholestan	5,1	n.a. ^a
	Estriol	7,2	n.a. ^a
	Genistein	9,5	n.a. ^a
	4-Bromphenylessigsäure	9,8	n.a. ^a
	d ₅ -Tetradehydroestradiol	10,6	11 – 12
	Bisphenol A-d ₁₆	10,7	11,5 – 12,5
	Bisphenol A	10,8	11,5 – 12,5
	α -Zearalenol	11,5	n.a. ^a
	17 β -Estradiol	11,6	12 – 13,5
	d ₂ -Estradiol	11,7	12 – 13,5
	17 α -Ethinylestradiol	12,2	14 – 14,5
	Estron	12,6	14,5 - 15
	Zearalanon	13,0	n.a. ^a
	Zearalenon	13,2	n.a. ^a
	Flavon	13,8	n.a. ^a
3	2,4,6-Tribromphenol	16,3	18 – 20
	Mestranol	19,5	n.a. ^a
	4- <i>tert</i> -Oktylphenol	20,3	23 – 24
	d ₄ -Benzyl-n-butylphthalat	20,7	23 – 24
	Benzyl-n-butylphthalat	20,8	23 – 24
	d ₄ -Di-n-butylphthalat	21,3	23,5 – 24,5
	Di-n-butylphthalat	21,4	23,5 – 24,5
	4-Nonylphenoxyessigsäure ^b	21,5	23 – 24
	4-Nonylphenol ^b	22,6	22,5 – 25
	4-n-Oktylphenol	23,4	26,5 – 28
	4-n-Nonylphenol	24,9	27 – 28,5
	4-Nonylphenolmono- bis octa-ethoxylat ^b	22 – 24,5	26 - 29

^a Verbindung wurde nicht analysiert; ^b Isomerengemisch.

3.1.4 Quantitative Fraktionierung des Abwassers aus einem Kläranlagenablauf

Bei der quantitativen Analyse der einzelnen HPLC-Fractionen wurde das in Kapitel 2 beschriebene GC-MS-Verfahren im Wesentlichen beibehalten. Nach Glasfaserfiltration wurden 5 x 1000 mL für Fraktionierung und Bestimmung der Estrogene, 1 x 1000 mL für Fraktionierung und Bestimmung der estrogenen Gesamtaktivität und 5 x 200 mL für Fraktionierung und Bestimmung der Xenoestrogene bei pH 2 auf RP-C18-Säulen angereichert, jeweils nach Zugabe der entsprechenden Aufstocklösungen zur Standardaddition sowie der Lösungen der entsprechenden internen Standards. Die Säulen wurden als Ganzes lyophilisiert und mit Aceton (6 mL) eluiert; die Eluate wurden auf < 0,1 mL eingengt, mit Acetonitril (2 x 0,5 mL) in 1,5 mL GC-Gläschen überspült und bis zur Fraktionierung im Kühlschrank bei + 5 °C aufbewahrt. Jede der so erhaltenen 11 Teilproben (je 5 Proben zur Analyse auf Estrogene bzw. Xenoestrogene und eine Probe zur biologischen Bestimmung der estrogenen Gesamtaktivität) wurde mit 0,1 %iger wässriger Trifluoressigsäure (3 mL) versetzt (Gesamtvolumen 4 mL) und in zwei HPLC-Läufen (Injektionsvolumen je 2 mL) fraktioniert (s. Abb. 47). Die einzelnen Fraktionen wurden getrennt aufgefangen, an der Vakuumzentrifuge vom Acetonitril befreit und lyophilisiert. Die getrockneten Rückstände wurden mit Aceton quantitativ in 200 µL Inlets überführt, zur Trockne eingengt, wie in Kapitel 2 beschrieben mit 20 µL MSTFA/TMCS-Mischung in 30 µL Acetonitril/Pyridin derivatisiert und mit GC-MS analysiert. Zur Auswertung wurde auch hier das Standardadditions-Verfahren eingesetzt; die Intensitäten sind auf die entsprechenden im Screening angegebenen internen Standards bezogen. Nur 4-Nonylphenoxyessigsäure musste, wie oben begründet, statt auf 4-Bromphenylessigsäure auf 4-n-Nonylphenol als internen Standard bezogen werden.

3.2 Ergebnisse der GC-MS-Analyse für die einzelnen Fraktionen

Zur Fraktionierung und quantitativen Analyse wurde eine Abwasserprobe des Kläranlagenablaufs Sindelfingen verwendet (2. Beprobung, Probennahme 19.10.1999). Die Ergebnisse aus der Analyse der einzelnen Fraktionen werden im Folgenden mit den Konzentrationen verglichen, die beim Screening (s. Kapitel 2.6.2) der unfraktionierten Abwasserprobe dieses Kläranlagenablaufs bestimmt wurden (Abb. 48, Tab. 21a,b).

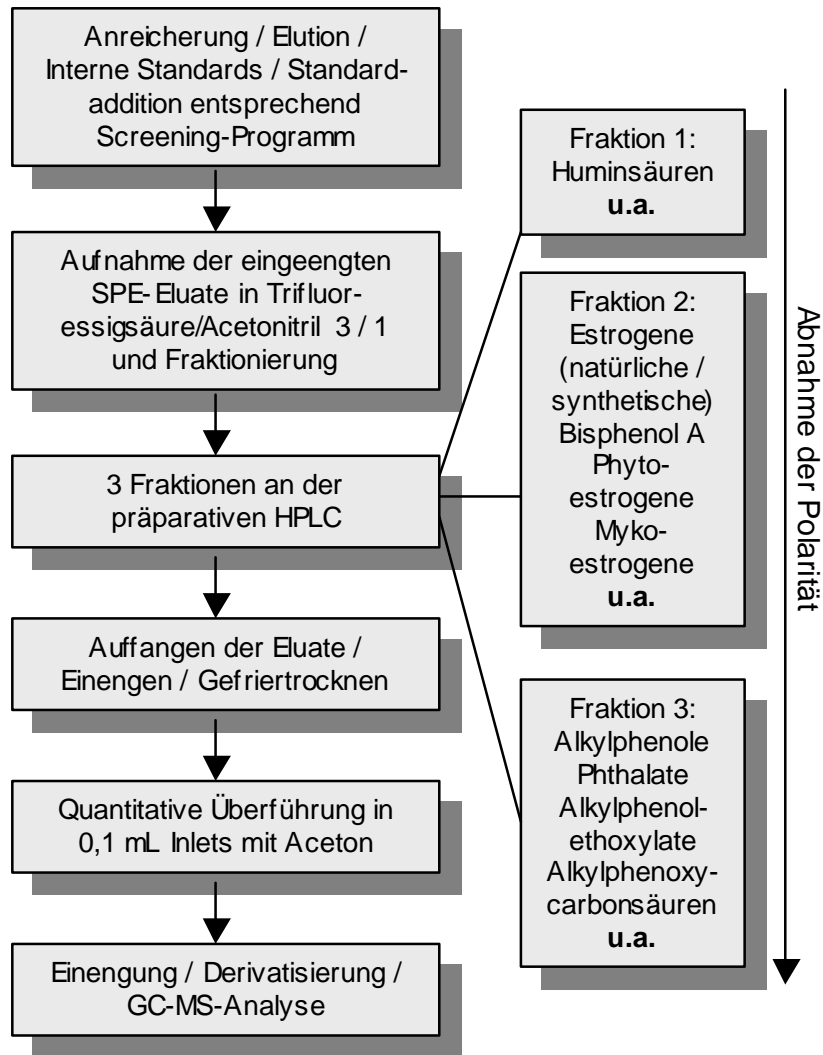


Abbildung 47: Analysenschema für die Fraktionierung des Abwassers eines Kläranlagenablaufs zur GC-MS-Analyse und biologischen Testung der einzelnen Fraktionen.

Tabelle 21a: Konzentrationen (**ng / L**) an natürlichen und synthetischen Estrogenen und an Genistein in der unfraktionierten ^a und der fraktionierten Abwasserprobe des Kläranlagenablaufs der Kläranlage Sindelfingen (Probennahme 19.10.1999); die Messunsicherheit entspricht für alle Werte 20 % des Analysenwertes (95 % Vertrauensband).

Analyten	Konzentrationen	
	ohne Fraktionierung	nach Fraktionierung
17 β -Estradiol	1,8	0,6
Estron	27	13
Mestranol	2,3	n.a. ^b
17 α -Ethinylestradiol	4,2	4,5
Genistein	8,7	n.a. ^b

^a Ergebnisse übernommen aus Kapitel 2, Tab. 11a;

^b Verbindung wurde nicht analysiert.

Tabelle 21b: Konzentrationen ($\mu\text{g} / \text{L}$) an Myko- und Xenoestrogenen und an β -Sitosterol in der unfraktionierten ^a und der fraktionierten Abwasserprobe des Kläranlagenablaufs der Kläranlage Sindelfingen (Probennahme 19.10.1999); die Messunsicherheit entspricht für alle Werte 20 % des Analysenwertes (95 % Vertrauensband) ^b.

Analyten	Konzentrationen	
	ohne Fraktionierung	nach Fraktionierung
β -Sitosterol	1,5	n.a. ^c
Zearalenon	< NG	n.a. ^c
α -Zearalenol	< NG	n.a. ^c
4-Nonylphenol ^d	1,2	1,7
4-Nonylphenoxyessigsäure ^d	5,5	5,9
4-Nonylphenoldiethoxylat ^d	4,3	0,98
Bisphenol A	0,50	0,93
Di-n-butylphthalat	0,57	1,2
Benzyl-n-butylphthalat	0,66	0,64
4- <i>tert</i> -Oktylphenol	0,13	0,14

^a Ergebnisse übernommen aus Kapitel 2, Tab. 11b,c; ^b NG Nachweisgrenze; ein Signal/Rausch(S/N)-Verhältnis < 3:1 ist mit < NG angegeben. ^c Verbindung wurde nicht analysiert; ^d Isomerengemisch.

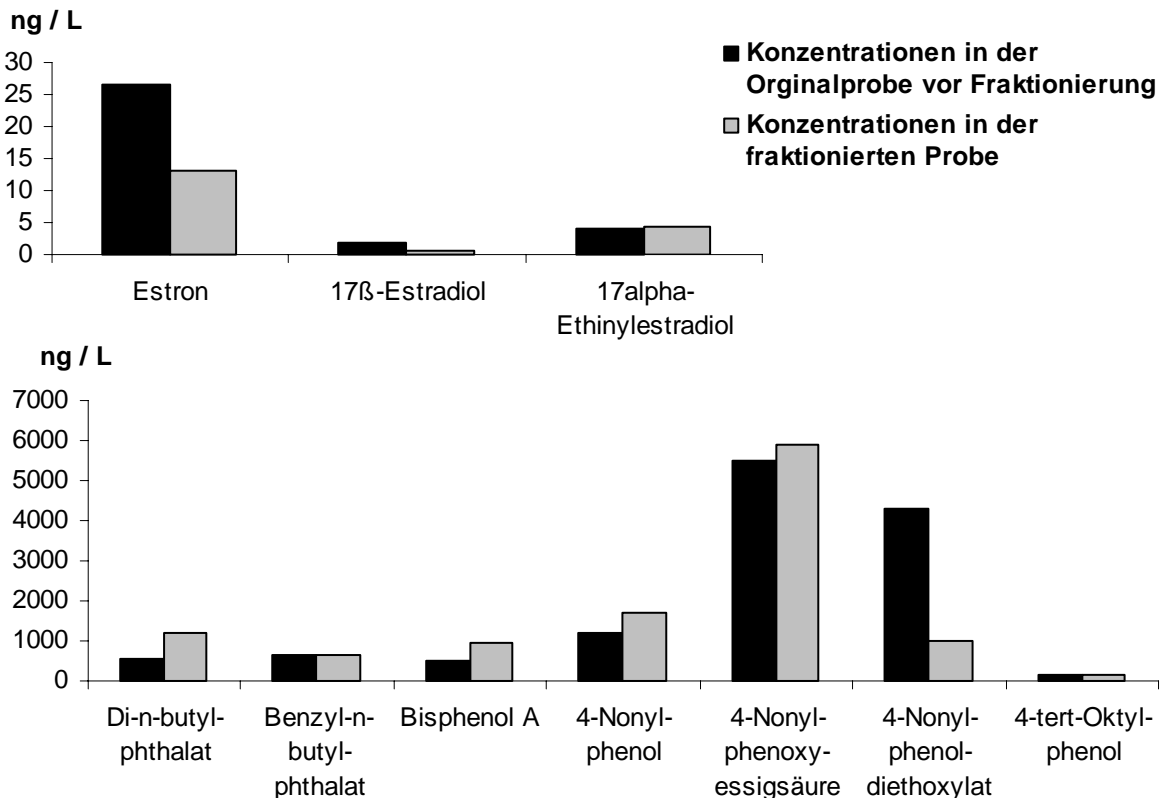


Abbildung 48: Konzentrationen estrogen wirkender Verbindungen im Abwasser des Kläranlagenablaufs der Kläranlage Sindelfingen vom 19.10.1999 (Werte entsprechend Tab. 21a,b).

Aus dem Vergleich der Konzentrationen estrogenartig wirksamer Substanzen, die einmal für die Gesamtprobe, zum anderen für die drei aufgetrennten Fraktionen bestimmt wurden, lassen sich mehrere Schlüsse ziehen. Beide Analysen wurden mit derselben Abwasserprobe (KA-Ablauf Sindelfingen, Probennahme 19.10.1999) durchgeführt, allerdings lagen zwischen der Festphasenextraktion der Probe mit direkt anschließender Analyse und der Festphasenextraktion der Probe mit anschließender Fraktionierung aus organisatorischen Gründen zwei Wochen.

Während das persistente, schlecht abbaubare 17α -Ethinylestradiol erwartungsgemäß vor und nach Fraktionierung nahezu die gleiche Konzentration aufweist, haben sich die Konzentrationen von Estron und 17β -Estradiol annähernd halbiert. Trotz der recht guten Abbaubarkeit dieser beiden Verbindungen ist eine Halbierung der Konzentration durch Abbauprozesse unter den gewählten Bedingungen der Probenaufbewahrung (Dunkelheit, Glasflaschen, 5 °C) innerhalb von zwei Wochen sehr unwahrscheinlich [W. Körner, persönliche Mitteilung]. Sicher spielen Sorptionsprozesse bei den Konzentrationsänderungen eine entscheidende Rolle. Höhere Verluste im Zuge der wesentlich umfangreicheren Aufarbeitung bei der Fraktionierung müssten durch die Anwendung des Standardadditions-Verfahrens und substanzspezifischer interner Standards eigentlich kompensiert werden. Worauf die deutlich geringeren Konzentrationen von Estron und 17β -Estradiol in der Probe nach der Fraktionierung zurückzuführen sind, muss daher offen bleiben.

Der Wert für Benzyl-n-butylphthalat stimmt gut mit dem für die unfraktionierte Abwasserprobe überein. Für Di-n-butylphthalat wird nach der Fraktionierung ein etwa doppelt so hoher Wert erhalten, was in Anbetracht der umfangreicheren Aufarbeitungsschritte bei der Fraktionierung und dem dadurch verstärkten Kontakt mit weichmacherhaltigen Kunststoffmaterialien nicht verwundert. Die Analyse der ubiquitären Phthalaten (Di-n-butyl- und vor allem Di-(2-ethylhexyl)phthalat) erfordert daher generell eine besondere Aufarbeitung, wie sie Brüll *et al.* [256] beschrieben haben.

Die Analyse auf Alkylphenole und ihre Derivate ergab nach der Fraktionierung eine deutlich geringere Konzentration an 4-Nonylphenoldiethoxylat sowie einen leicht erhöhten Gehalt an 4-Nonylphenol und 4-Nonylphenoxyessigsäure. Ob dies auf einem signifikanten Abbau des metabolisch deutlich weniger stabilen 4-Nonylphenoldiethoxylats beruht oder durch sorptive Prozesse hervorgerufen wird (s. Kapitel 4), lässt sich nicht entscheiden. Die Konzentrationen von 4-*tert*-Oktylphenol waren hingegen vor und nach Fraktionierung nahezu identisch.

3.3 Korrelation der Ergebnisse aus GC-MS-Analyse und E-Screen-Assay

Zur Untersuchung mit dem biologischen Wirkungstest wurde die entsprechende Probe in gleicher Weise aufgearbeitet (nur ohne Zusatz eines internen Standards) und fraktioniert wie für die GC-MS-Analyse. Die drei Fraktionen wurden im E-Screen-Assay auf ihre estrogenen Aktivität getestet (Tab. 22). Wie im Screening (s. Kapitel 2.8) wurde auch hier mit den 17 β -Estradiol-Äquivalenzfaktoren (EEF) der einzelnen estrogenartig wirksamen Substanzen ein Vergleich zwischen gemessenen und berechneten EEQ-Werten in der Gesamtprobe und in den drei Fraktionen durchgeführt (Tab. 22, Abb. 49).

Tabelle 22: Vergleich der estrogenen Aktivität in EEQ der unfraktionierten Abwasserprobe des Kläranlagenablaufs Sindelfingen (Probennahme 19.10.1999) sowie der einzelnen Fraktionen im E-Screen-Assay mit den aus EEF- und GC-MS-Analysenwerten berechneten EEQ.

Proben	EEQ-Wert aus dem E-Screen-Assay in ng / L (\pm SD) ^a	EEQ-Wert über die GC-MS-Analyse in ng / L
unfraktionierte Gesamtprobe	3,0 (\pm 0,5)	9,0
Fraktion 1	n.n. ^b	n.n. ^b
Fraktion 2	3,5 (\pm 2,4)	5,7
Fraktion 3	0,4 (\pm 0,1)	0,24

^a Standardabweichung; ^b nicht nachweisbar.

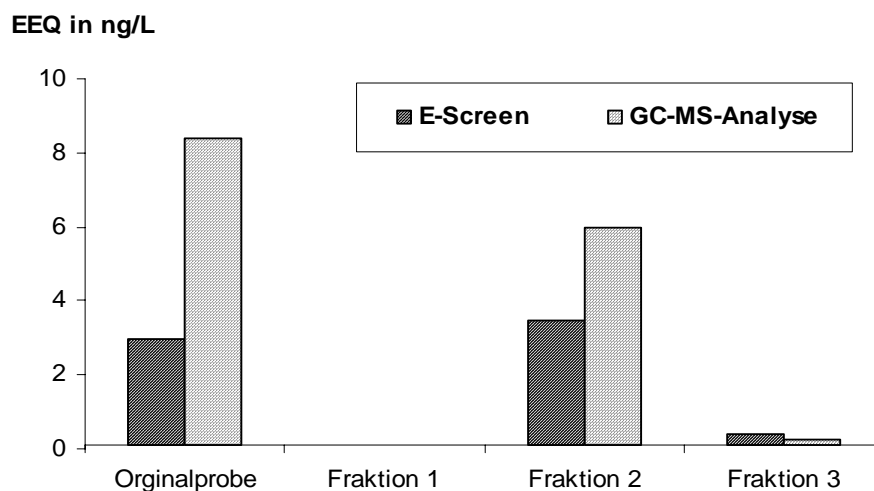


Abbildung 49: Graphischer Vergleich der estrogenen Aktivität in EEQ der unfraktionierten Abwasserprobe des Kläranlagenablaufs Sindelfingen (Probennahme 19.10.1999) sowie der einzelnen Fraktionen im E-Screen-Assay mit den aus EEF- und GC-MS-Analysenwerten berechneten EEQ.

Fraktion 1, die keine der für die hier beschriebene Untersuchung ausgewählten estrogenartig wirksamen Verbindungen enthält, zeigte im E-Screen-Assay in der Tat keine estrogene Aktivität. In diesem Polaritätsfenster liegen also mit Sicherheit keine anderen, bislang nicht identifizierten polaren estrogenartig wirksamen Verbindungen vor (zumindest nicht in Konzentrationen oberhalb der Wirkungsschwelle des E-Screen-Assays). Zum Nachweis solcher Strukturen müsste eine erheblich größere Abwassermenge (50-100 L) durch Extraktion aufkonzentriert und untersucht werden.

Der relative Proliferationseffekt (RPE, nicht dargestellt) von Fraktion 2 liegt mit > 80 % deutlich höher als der von Fraktion 3 (27 %); für Fraktion 1 wurde keine Proliferation festgestellt. Der RPE-Wert von Fraktion 2, die genau wie 17 β -Estradiol vollständig agonistisch wirkt, liegt auch deutlich höher als alle Werte für die unfraktionierten Abwasserproben aus Kläranlagenabläufen, die aufgrund ihrer zwischen 25 und 80 % liegenden RPE-Werte als partielle Agonisten eingestuft wurden. Fraktion 3 verhält sich mit einem RPE von 27 % gleichfalls als partieller Agonist. Die hohe estrogene Aktivität von Fraktion 2 ist auf die natürlichen und synthetischen Estrogene in dieser Fraktion zurückzuführen, die estrogene Potenz von Fraktion 3 sicher überwiegend auf die darin enthaltenen Xenoestrogene (s. Tab. 21a,b). Deren Anteil an der estrogenen Gesamtaktivität der Abwasserprobe darf keinesfalls vernachlässigt werden (s. Kapitel 3.4).

Ein Vergleich der estrogenen Gesamtaktivität der Abwasserprobe (EEQ = 3,0 ng / L) mit der Summe der Einzelaktivitäten der beiden estrogen aktiven Fraktionen 2 und 3 (Σ EEQ_{F2, F3} = 3,9 ng / L) ergibt eine für ein biologisches Testsystem gute Übereinstimmung (s. Kapitel 2.8.1). Dasselbe Ergebnis erhält man beim Vergleich der aus EEF-Werten und analytisch bestimmten Konzentrationen berechneten EEQ-Werte. Der EEQ-Wert für die nicht fraktionierte Gesamtprobe liegt mit 9,0 ng / L um nahezu den gleichen Faktor höher wie der Summenwert für die Fraktionen 2 und 3, Σ EEQ_{F2, F3} = 5,94 ng / L. Wie schon im Screening korrelieren auch bei der Analyse der Einzelfraktionen die rein biologisch ermittelten E-Screen-EEQ-Werte von unfraktionierter Gesamtprobe, Fraktion 2 und Fraktion 3 mit den berechneten EEQ-Werten innerhalb des Toleranzfaktors 2-3 (s. Kapitel 2.8.2).

3.4 Zusammenfassung

Der Hauptteil der estrogenen Aktivität der Abwasserprobe des Kläranlagenablaufs Sindelfingen (~ 90 %) ist in der zweiten Fraktion konzentriert, die die natürlichen und synthetischen Estrogene enthält. Auf Basis der EEF-Werte der einzelnen untersuchten Verbindungen war dies nach den Ergebnissen der Screening-Analysen (s. Kapitel 2) auch zu erwarten. Die erste Fraktion enthält Substanzen wie beispielsweise Huminsäuren und liefert daher keinen messbaren Beitrag zur estrogenen Gesamtaktivität der Abwasserprobe; in der dritten Fraktion ist ein Anteil von etwa 10 % konzentriert. Die Anwesenheit weiterer Verbindungen mit estrogenen Wirkung in den einzelnen Fraktionen ist aufgrund dieser Untersuchung nicht auszuschließen, doch wird die estrogenen Aktivität im E-Screen-Assay überwiegend durch die natürlichen und synthetischen Estrogene bestimmt. Von diesen ist zumindest 17 α -Ethinylestradiol wegen seiner Persistenz und schlechten Abbaubarkeit in seiner Umweltrelevanz als problematisch einzustufen.

Die 10 % der estrogenen Gesamtaktivität der Abwasserprobe in Fraktion 3 beruhen auf Verbindungen, die wegen ihrer hohen log P_{OW}-Werte (Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient) als mäßig bioakkumulierbar anzusehen sind; für 4-Nonylphenol z.B. ist der log P_{OW} = 4,48 [296]. Verbindungen mit erhöhten log P_{OW}-Werte stellen infolge einer potentiellen Bioakkumulation ein Risikopotential für Langzeiteffekte dar. Ein vollständiger Abbau bis zur Mineralisierung ist beispielsweise für 4-Nonylphenol keineswegs gegeben [296]. Die estrogenen Aktivität von Fraktion 3 macht deutlich, dass estrogenen Auswirkungen in der Umwelt nicht auf natürliche und synthetische Estrogene begrenzt sind. Etwa 60 % der estrogenen Aktivität in Fraktion 3 lassen sich den für die Analyse ausgewählten Verbindungen zuordnen. Die verbleibenden 40 % beruhen höchstwahrscheinlich zum größten Teil auf weiteren Alkylphenolpolyethoxylat-Derivaten.

4 Eliminationsverhalten estrogenartig wirksamer Verbindungen in Kläranlagen am Beispiel der 4-Nonylphenolpolyethoxylate

4-Nonylphenolpolyethoxylate (NPnEO) gehören zu den nichtionischen Tensiden. Sie stellen einen Anteil von etwa 80 % der Alkylphenolpolyethoxylate (APnEO), von denen weltweit mehr als 600000 Tonnen/Jahr hergestellt werden (1998) [295]. Nach Hager [295] teilte sich der Verbrauch 1998 weltweit wie in Tab. 23 angegeben auf.

Tabelle 23: Weltweiter Verbrauch von APnEO 1998 [295].

Kontinent(e)	APnEO-Verbrauch in 1000 t / a
Europa	80
Nordamerika	200
Südamerika	100
Asien und Australien	180
Afrika	40

4.1 Herstellung und Anwendung

Die APnEO werden in der Regel durch Reaktion von Ethylenoxid mit 4-Nonylphenol (NP) oder 4-Oktylphenol (OP) synthetisiert (Abb. 50) [155]; der para-Alkylrest ist im Falle des NP stark verzweigt. Die Abbauprodukte werden mit den Abkürzungen AP (Alkylphenol), APnEC (Alkylphenolpolyethoxycarbonsäuren) sowie NPnEC (Nonylphenolpolyethoxycarbonsäuren) charakterisiert. Wie bei den APnEO sind darunter, sofern nicht ausdrücklich anders angegeben, stets die technischen, überwiegend para-substituierten Mischungen zu verstehen.

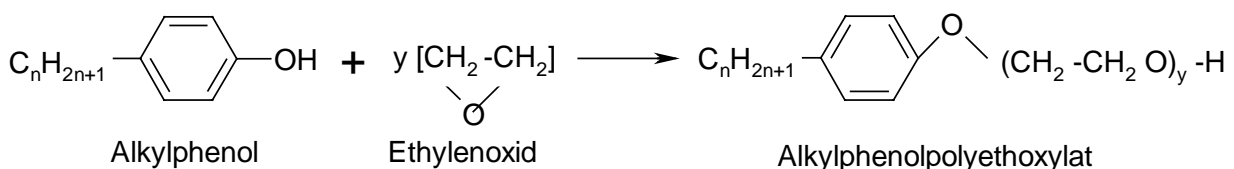


Abbildung 50: Herstellung der Alkylphenolpolyethoxylate (APnEO).

Eingesetzt werden APnEO weltweit zu 55 % in der Industrie als Hilfs- oder Grundstoffe bei der Textil- und Lederverarbeitung, der Herstellung von Papier und Farben, der

Polymerproduktion und der Produktion von Phenoloximen. Weitere Anwendungsgebiete sind die Agrochemie, z.B. als Bestandteil von Pflanzenbehandlungs- und Schädlingsbekämpfungsmitteln (PBSM), und die Metallindustrie, z.B. zur Oberflächenbehandlung [116,295-297]. Fast ein Drittel der weltweit hergestellten APnEO werden im nichtproduzierenden Gewerbe verwendet, z.B. als Reinigungsmittel für Fahrzeuge und Textilien [116]. Private Haushalte haben einen Anteil von 15 %; dort werden APnEO in Kosmetika und Waschmitteln eingesetzt [116]. In Deutschland und in vielen Ländern Europas sowie in den USA ist der Einsatz von APnEO für privat genutzte Kosmetik- und Reinigungsmittel seit geraumer Zeit verboten. Seit 1992 wird in Deutschland außerdem in industriellen Reinigungsmitteln, soweit sie dem Waschmittelgesetz von 1975 unterliegen, auf APnEO verzichtet [295], sodass importierte Roh- und Fertigtextilien die Haupteintragsquelle für APnEO in das aquatische Milieu in der BRD darstellen (s. Tab. 24) [295].

Tabelle 24: Eintragsquellen von APnEO in das aquatische Milieu in Deutschland 1999 [295].

Importierte Roh- und Fertigtextilien	500 t
Industrielle Reinigungsmittel	250 t
APnEO in Flockungshilfsmitteln	110 t
Galvano- und Elektroindustrie	100 t
Textil- und Lederhilfsmittel	37 t
Papierrecycling	11 kg (nur NP)

4.2 Eigenschaften der Nonylphenolpolyethoxylate (NPnEO) und einiger wichtiger Eliminationsprodukte

Etwa 60 % der verwendeten APnEO gelangen direkt oder über Kläranlagen in die aquatischen Ökosysteme [54]; ihr biologischer Abbau (z.B. in der Kläranlage) zu kurz-kettigen APnEO, APnEC und schließlich AP ist durch zahlreiche Studien gesichert [54,116,155,298]. Abb. 51 zeigt am Beispiel der N(Nonyl)PnEO eine Auswahl der in der Umwelt gebildeten Metabolite. Obwohl zahlreiche weitere Abbauprodukte isoliert wurden [298,299] (s. Kapitel 4.3), stellen diese Verbindungen mit Sicherheit die Haupteliminationsprodukte dar.

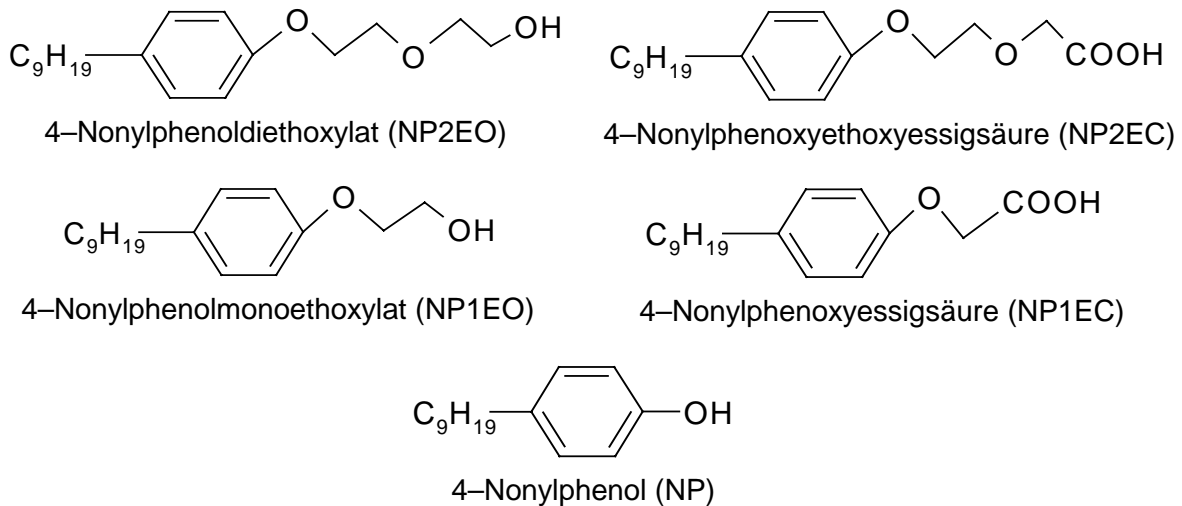


Abbildung 51: Strukturformeln der wichtigsten Eliminationsprodukte von NPnEO.

Während NPnEO sich als oberflächenwirksame Stoffe leicht an Schwebepartikel und Sedimente anlagern, neigen NPnEC aufgrund ihrer polaren Säurefunktion weniger zur Adsorption [298]. Einige wichtigen physikalischen Daten von NP1EC und NP, die beide korrosiv wirken, sind in Tab. 25 zusammengestellt [300]. Der Hersteller (*Ciba Additives Division*) stuft NP1EC als teilweise biologisch abbaubar ein. NP adsorbiert z.B. leicht an Glas- und Kunststoffoberflächen (s. Kapitel 4.5.4). Der bei Ratten ermittelte LD₅₀-Wert liegt für NP1EC bei 1674 mg / kg, für NP zwischen 1600 und 1900 mg / kg [296].

Tabelle 25: Eigenschaften von NP1EC und NP [300].

Parameter	NP1EC	NP
Siedepunkt	> 250 °C	290-300 °C
Dichte	1.01-1.05 g / cm ³ bei 20°C	0,95 g / cm ³ bei 20 °C
Wasserlöslichkeit	40 mg / L bei 20 °C	ca. 6 mg / L bei 20 °C
Dampfdruck	2,5*10 ⁻³ Pa	0,3 Pa bei 25 °C
pH-Wert	4,2 (0,004 % in Wasser bei 20 °C)	
Zersetzungstemperatur	290 °C	

4.2.1 Bioakkumulation und akute Toxizität

Die Bioakkumulation von NP und NPnEO wird als eher mäßig eingestuft [62]. Für die NPnEC liegen zwar keine Daten vor, doch ist wegen der besseren Wasserlöslichkeit ihre Fähigkeit zur Bioakkumulation sicher als geringer einzustufen als die von NPnEO.

Nach Untersuchungen zur toxischen Wirkung von NP, NPnEO und NPnEC auf verschiedene aquatische Organismen besitzt NP die höchste Toxizität unter den NPnEO-

Abbauprodukten. Der LC_{50} -Wert für Shrimps und Lachs liegt zwischen 0,13 und 0,3 mg NP / L [78,155]. Holcombe *et al.* [301] ermittelten für eine Elritzen-Art einen LC_{50} -Wert von 0,16 mg NP / L. In Tab. 26 sind LC_{50} -Werte für verschiedene Organismen zusammengestellt [62]. Die Schwankungsbreite von zwei Größenordnungen erklärt sich durch die sehr unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Spezies innerhalb einer Organismengruppe gegenüber der gleichen Verbindung. Mit steigender Ethoxylatkettenlänge zeigt sich bei allen Tests eine abnehmende Toxizität. Yoshimura [302] ermittelte die in Tab. 27 angegebenen LC_{50} -Werte für japanische Killifische.

Tabelle 26: Akute Toxizität von NP für verschiedene Organismen als LC_{50} in $\mu\text{g} / \text{L}$ [62].

Fische	17 – 3000
Wirbellose	20 – 3000
Algen	27 – 2500

Tabelle 27: Akute Toxizität von NPnEO-Mischungen für Killifische bezogen auf die durchschnittliche Ethoxylateinheitenanzahl n [302].

NPnEO	n=	0	1	3.3	5	6.4	8.4	13	16.6
LC_{50} in mg / L		1.4	3.0	2.5	3.6	5.4	11.6	48	110

Gut untersucht in Laborversuchen ist die toxische Wirkung von NP, NPnEO und auch NPnEC, für die sonst nur relativ wenige Daten vorliegen, auf den Wasserfloh *Daphnia magna*. Für diesen Organismus lassen sich daher die Toxizitäten der einzelnen Verbindungsklassen vergleichen. Die in Tab. 28 zusammengestellten Werte stellen allerdings nur Anhaltspunkte dar, da die Versuche von verschiedenen Forschergruppen bei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt wurden [62].

Tabelle 28: Akute toxische Wirkung von NP, NPnEO und NPnEC auf *Daphnia magna* [62].

Verbindungen	LC_{50} -Werte in $\mu\text{g} / \text{L}$
NP	140
NP2EO	148
NP7EO	4100
NP10EO	44200
NP1EC	14000
NP2EC	990

Auch für Bakterien wurden Toxizitätstests durchgeführt. Knie *et al.* [303] bestimmten den 30-Minuten- EC_{10} -Wert für den Sauerstoffverbrauch von *Pseudomonas putida* zu

> 10000 µg / L für NP. Für das *Photobacterium phosphoreum* wurde ein EC₅₀-Wert von 60600 µg / L für NP ermittelt [304].

Trotz der unterschiedlichen Testverfahren, Testbedingungen und Testorganismen lassen sich folgende allgemeine Aussagen machen:

- NPnEO mit langer Ethoxylatkette sind vergleichsweise wenig toxisch.
- NPnEO mit kurzer Ethoxylatkette und NP besitzen eine höhere Toxizität und eine schlechtere biologische Abbaubarkeit, wobei NP am stärksten toxisch wirkt [54].
- Zusätzlichen Einfluss auf die Toxizität hat die Art der Verzweigung des Alkylrestes [296].

Die Toxizität gegenüber Fischen, Wirbellosen und Algen ist in etwa vergleichbar, für Bakterien ist sie deutlich geringer [62]. Eine genotoxische Wirkung von NP und NPnEO [305] lässt sich ebensowenig nachweisen wie eine mutagene Wirkung im SOS oder Ames-Test [306]. Kurzkettige NPnEO sind für aquatische Organismen weniger toxisch als die korrespondierenden NPnEO mit gleicher Ethoxylatkettenlänge; ihre Toxizität entspricht der von NPnEO mit sechs bis neun (CH₂CH₂O)-Einheiten [62]. Bei Ratten ist dagegen nach Herstellerangaben die Toxizität von NP1EO und NP mit einem LD₅₀-Wert von 1600-1900 mg / kg vergleichbar [296,301].

4.2.2 Estrogene Wirkung

Verschiedene *in vivo*- und *in vitro*-Tests zum Nachweis der estrogenen Wirkung einzelner Verbindungen liefern qualitativ gut übereinstimmende Ergebnisse, weisen aber in ihren quantitativen Resultaten zum Teil Unterschiede auf [182]. White *et al.* [54] untersuchten die estrogenen Wirkung von verschiedenen Alkylphenolderivaten *in vitro* über die estrogenabhängige Stimulation der Vitellogeninproduktion in isolierten Hepatozyten von Forellen, die Gentranskription und das Wachstum von Brustkrebszellen. Unabhängig vom Testverfahren zeigte sich eine deutliche estrogenen Wirkung der 4-NPnEO erst bei ≤ 3 (CH₂CH₂O)-Einheiten; 4-NP zeigte gleichfalls eine signifikante estrogenen Wirkung.

Die estrogenen Wirkung von 4-NP und 4-NPnEO wurde auch von Islinger *et al.* [307] mit einem *in vitro*-Testverfahren (Anregung der Vitellogeninproduktion in der Leber von Forellen) geprüft. Beim Vergleich mit 17β-Estradiol zeigte 4-NP eine 2000-3000fach geringere estrogenen Potenz. Hock *et al.* [65] ermittelten bei einem ähnlichen Vergleich mit einem Rezeptorbindungstest den Faktor 1250. Hansen *et al.* [30] stellten *in vivo*

eine estrogene Wirkung auf Forellen bereits bei 4-NP-Konzentrationen von 14 µg / L fest, während Jobling *et al.* [288] im analogen Experiment eine Wirkungsschwelle von etwa 10 µg / L ermittelten. Ashfield *et al.* [46] untersuchten die Auswirkung umweltrelevanter Konzentrationen von 4-NP, 4-NP2EO und 4-NP1EC auf Länge und Gewicht von jungen Regenbogenforellen in Langzeitversuchen von über einem Jahr. Die Verbindungen wirkten sich bereits in Konzentrationen ≥ 1 µg / L deutlich auf das Wachstum der Forellen aus und zeigten sogar ein Jahr nach Abschluss der Experimente noch Effekte. Die Autoren vermuten daher, dass die Auswirkungen relativ geringer Konzentrationen von NP, NPnEO und NPnEC auf die heranwachsenden Forellen wesentlich größer sind, als aufgrund der *in vitro*-Tests zu erwarten wäre.

Jobling *et al.* [148] ermittelten über die Vitellogenin-Synthese von Forellen die in Tab. 29 zusammengefassten relativen estrogenen Potenzen verschiedener NPnEO-Abbauprodukte im Vergleich zum natürlichen 17 β -Estradiol. Aus den verschiedenen Testergebnissen lassen sich einige allgemeine Aussagen ableiten: Eine deutliche estrogenere Wirkung zeigen NP, NPnEO und NPnEC mit einer verzweigten Nonylkette in para-Stellung. NP, NPnEO oder NPnEC, die in meta- oder ortho-Stellung alkylsubstituiert sind oder einen linearen Alkylrest besitzen, binden aus sterischen Gründen nicht an den Estrogenrezeptor und weisen keine bzw. wie bei 4-n-NP nur eine sehr schwache estrogenere Aktivität auf [57,259].

Tabelle 29: Relative estrogenere Potenz von 4-NPnEO, 4-NP1EC und 4-NP [148].

Verbindungen	relative estrogenere Potenz
17 β -Estradiol	1,0
4-NP9EO	2×10^{-7}
4-NP2EO	6×10^{-6}
4-NP1EC	$6,3 \times 10^{-6}$
4-NP	9×10^{-6}

4.2.3 Löslichkeit

Die oberflächenwirksamen Stoffe NP und NPnEO lagern sich leicht an Schwebepartikel an und reichern sich deshalb in Sedimenten [297] und Klärschlamm [183] an. Mit abnehmender Länge der Ethoxylatkette nehmen NPnEO zunehmend hydrophoben Charakter an [54]. Wasserlöslichkeit und Oktanol-Wasserkoeffizienten einiger NP-Derivate sind beispielhaft in Tab. 30 aufgeführt [157,308]. NPnEC sind wesentlich besser wasserlöslich [116], wie ein Vergleich der Flusssedimentproben von 30 mit Abwas-

ser belasteten Flüssen in den USA mit den zugehörigen Wasserproben zeigt. Die Konzentrationen von NP und NPnEO lagen in den Sedimentproben zwischen 170 und 3000 µg / kg, in den Wasserproben zwischen < 0,1 und 15 µg / L [164]. Für Wasserphase und Schlamm in Kläranlagen ist eine vergleichbare Verteilung anzunehmen.

Tabelle 30: Wasserlöslichkeit und Oktanol-Wasserkoeffizient (log K_{ow}) von NP, NP1EO, NP2EO und NP1EC [157,308].

Verbindungen	Wasserlöslichkeit bei 20,5 °C in mg / L	log K _{ow}
NP1EC	40	n.b. ^a
NP	5,43	4,48
NP1EO	3,02	4,17
NP2EO	3,38	4,21

^a nicht bekannt

4.3 Abbauege der NPnEO

4.3.1 Mechanismus des Abbaus

Eine biologische Elimination der NPnEO (z.B. in der Kläranlage) zu kurzkettigen NPnEO, NPnEC und NP ist durch mehrere Studien gesichert [54,116,155,298]. Durch enzymatische Hydrolyse wird zunächst die Ethoxylatkette sukzessive bis zu NP2EO und NP1EO abgespalten. Unter *aeroben* Bedingungen entstehen anschließend durch Oxidation die entsprechenden Carbonsäuren, d.h. vor allem NP2EC und NP1EC [309]. Eichhorn *et al.* [298] vermuten dagegen, dass unter *aeroben* Bedingungen im ersten Abbauschritt bereits die langkettigen NPnEO zu langkettigen NPnEC oxidiert werden, die dann in einem zweiten Schritt zu kurzkettigen NPnEO gespalten und anschließend erneut oxidiert werden. Bei beiden Abbauegen stellen kurzkettige NPnEO und NPnEC entscheidende Zwischenstufen im Abbauprozess dar. Eichhorn *et al.* [298] und Ding *et al.* [299] wiesen unter *aeroben* Bedingungen außerdem durch terminale Oxidation der Alkylkette gebildete carboxylierte Nonylphenolpolyethoxycarbonsäuren (CNPnEC) nach. Unter *anaeroben* Bedingungen wird NPnEO überwiegend direkt zu NP metabolisiert [309], in der Kläranlage insbesondere bei der *anaeroben* Schlammbehandlung; dies konnten Tschui *et al.* im Laborversuch bestätigen [81].

In einer Risk-Assessment-Studie der EU [296] stellt sich der weitere Abbau von NP wie folgt dar: Ein abiotischer Abbau etwa durch Photolyse ist im aquatischen Milieu zu vernachlässigen. Für den biologischen Abbau wird die Halbwertszeit im Boden auf 300 d, im Oberflächenwasser auf 150 d geschätzt. Beim Abbau von NP werden so-

wohl der Phenolring wie die Alkylseitenkette metabolisiert (durch terminale Oxidation) [309]. Die diskutierten Abbauprozesse sind in Abb. 52 schematisch zusammengefasst.

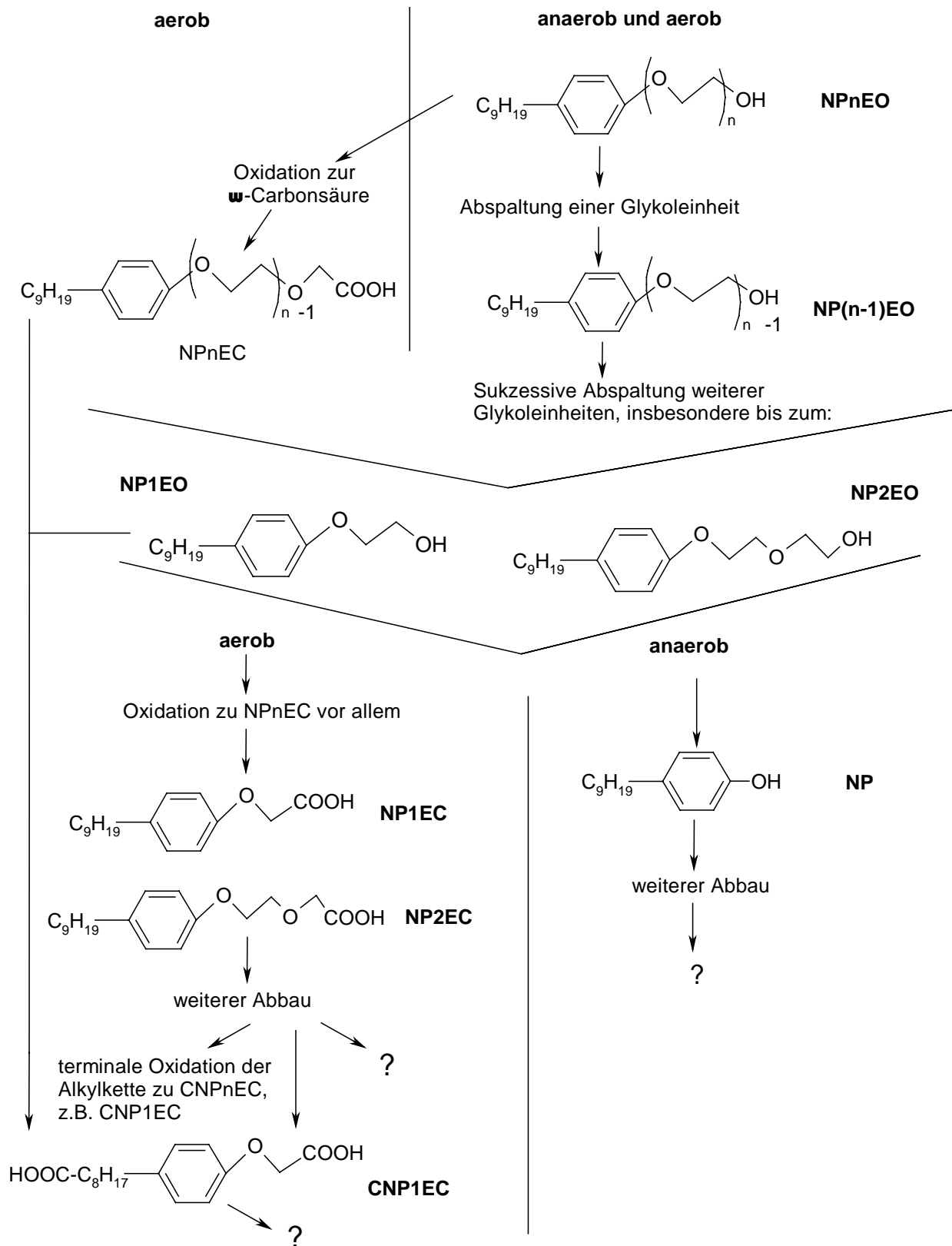


Abbildung 52: Eliminationswege der NPnEO.

4.3.2 Elimination in Kläranlagen

Bei Untersuchungen von Kläranlagenabwässern [309] wurden drei Hauptabbauprodukte der NPnEO nachgewiesen: NP, NPnEO (n = 1-4) und NPnEC (hauptsächlich n = 1,2). Im Kläranlagenablauf überwiegen die NPnEC wegen der besseren Wasserlöslichkeit. Brenner *et al.* [310] haben NP-Konzentrationen im Klärschlamm aus *aerober* und *anaerober* Klärschlammbehandlung verglichen und bei *aerober* Klärschlammbehandlung durchschnittlich 0,3 g NP / kg Trockengewicht, bei *anaerober* Behandlung dagegen einen Mittelwert von 1,27 g NP / kg Trockengewicht bestimmt. Diese Befunde stützen die Hypothese, dass NPnEO vor allem unter *anaeroben* Bedingungen zu NP metabolisiert werden. Ahel *et al.* [157] haben den Konzentrationsverlauf von NP, NPnEO und NPnEC durch die verschiedenen Stufen in Kläranlagen verfolgt (Ergebnisse s. Tab. 31). NPnEO mit n > 2 werden in den untersuchten Kläranlagen durchschnittlich zu 92 % eliminiert, insbesondere in der biologischen Stufe der Kläranlage. In der Risk-Assessment-Studie der EU zu NP [296] wird aus mehreren Untersuchungen ein „worst case“-Szenario für den Verbleib von NPnEO nach der Abwasserbehandlung konstruiert (Tab. 32).

Tabelle 31: Anteile von NP, NPnEO und NPnEC in der Kläranlage vor und nach den einzelnen Reinigungsstufen in mol % [157].

Probennahmestellen	NP	NPnEO (n = 1,2)	NPnEO (n > 2)	NPnEC (n = 1,2)
unbehandeltes Rohabwasser	3	11,5	82,4	3,1
nach mechanischer Klärung	3	11,5	82,4	3,1
nach biologischer Klärung	3,9	21,8	< BG ^a	46,1
Freisetzung in die Umwelt (von 100 % NPnEO-Zulauf)	25 ^b	11	8	19

^a Bestimmungsgrenze; ^b davon 90 % an Klärschlamm gebunden.

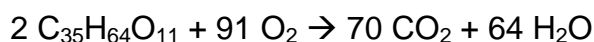
Tabelle 32: Verbleib von NP, NPnEO und NPnEC nach der Abwasserbehandlung [296].

Eliminationsprodukte von NPnEO	Anteil in mol %
vollständige Mineralisation oder weitgehend abgebaut	45
NP1EO, NP2EO und NPnEC im Abwasser des Kläranlagenablaufs	25
NPnEO mit n > 3 im Abwasser des Kläranlagenablaufs	8
NP im Abwasser des Kläranlagenablaufs	2,5
NP in <i>anaerob</i> behandeltem Klärschlamm	19,5

4.3.3 Abbau nach der OECD-Methode und Untersuchungen zum biologischen Sauerstoffbedarf (BSB)

Staples *et al.* [84] untersuchten den Abbau von NP1EC und NP2EC nach der OECD-Methode 301B. Nach der OECD-Norm wird das beim biologischen Abbau entstandene CO₂ in Prozent des bei vollständiger Mineralisation theoretisch möglichen CO₂ angegeben. Eine Verbindung wird als biologisch abbaubar eingestuft, wenn sie nach 28 d zu $\geq 60\%$ mineralisiert ist und der Anstieg von 10 auf 60 % nicht mehr als 10 d benötigt. Staples *et al.* erhielten nach 28 d Versuchslaufzeit 59-66 % CO₂ für NP1EC und 65 % CO₂ für NP2EC. Ein merklicher CO₂-Anstieg und damit ein signifikanter Abbau setzte aber erst nach 5 Tagen ein; der nach der OECD-Norm geforderte Anstieg von 10 auf 60 % CO₂ innerhalb von 10 Tagen wurde nicht erreicht. Dennoch schließen die Autoren [84] aus ihren Ergebnissen, dass sich NPnEC in der Umwelt nicht anreichern. Ebenfalls nach der OECD-Methode 301B haben Varineau *et al.* [311] den Abbau von NPnEO mit einer mittleren Kettenlänge von 9 Ethoxyeinheiten untersucht und 53-58 % Abbau nach 28 d festgestellt. Kurzkettige NPnEC und NPnEO werden also unter *aeroben* Bedingungen abgebaut, allerdings vergleichsweise langsam.

In einer unveröffentlichten Studie des Instituts für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart wurden Untersuchungen zum BSB von NP10EO (C₃₅H₆₄O₁₁, Mol.-Masse 661 g / mol) durchgeführt [312]. Bei vollständiger Oxidation von NP10EO ergäbe sich nach



ein theoretischer Sauerstoffbedarf (TSB) von 2203 mg / g. Dieser theoretische Wert wurde experimentell durch Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) zu 2240 mg / g (= 101,7 % des TSB) bestätigt. Der biologische Sauerstoffbedarf beträgt nach fünf Tagen (BSB₅) allerdings nur 732 mg / g (= 33,2 % des TSB), nach 10 Tagen (BSB₁₀) 789 mg / g (= 35,8 % des TSB). Selbst unter den extrem *aeroben* Bedingungen des BSB-Tests (Durchblasen von Luft) ist somit eine vollständige Mineralisierung von NPnEO zu CO₂ nicht zu erreichen. Der Vergleich der beiden BSB-Werte zeigt überdies, dass der Abbauprozess nach fünf Tagen weitgehend zum Erliegen gekommen ist. Auch im BSB-Versuch werden die längerkettigen NPnEO also nur unvollständig abgebaut.

4.4 Material und Methoden

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich zu den in Kapitel 2 und 3 aufgeführten folgende weiteren Materialien und Geräte eingesetzt.

4.4.1 Materialien und Geräte

Chemikalien / Lösungsmittel	Reinheit und Spezifikationen	Bezugsquelle
Ammoniakwasser	25 %, reinst	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	98 %	Aldrich, Deisenhofen
Essigsäure	> 99,8 % p.a.	Merck, Darmstadt
Imbentin N/040	technische Mischung von NPnEO, zu einem überwiegenden Anteil 4-NPnEO mit einer Gaus'schen Verteilung der (CH ₂ CH ₂ O)-Einheiten n von n = 1-10	Dr. Kolb AG, Heddelfingen, Schweiz
Marlophen NP3	technische Mischung von NPnEO, zu einem überwiegenden Anteil (> 95 %) 4-NPnEO mit einer mittleren Kettenlänge von 3 (CH ₂ CH ₂ O)-Einheiten	CONDEA Chemie GmbH, Marl
Marlophen NP5	technische Mischung von NPnEO, zu einem überwiegenden Anteil (> 95 %) 4-NPnEO mit einer mittleren Kettenlänge von 5 (CH ₂ CH ₂ O)-Einheiten	CONDEA Chemie GmbH, Marl
4-n-NP2EO	> 99 %	Promochem, Wesel
Tributylamin	puriss. p.a. > 99 %	Fluka, Deisenhofen
Triethylammoniumacetatpuffer	1.0 M in Wasser, pH 7	Fluka, Deisenhofen
2,4,6-Trimethylphenol	98 %	Lancaster, Mühlheim / Main

Geräte und HPLC-Säule	Bezeichnungen und Spezifikationen	Hersteller
Autosampler	Gilson 232 XL	Abimed, Langenfeld
Woulfesche Flasche, 2 L	mit 3 Hälsen NS 29/32 als Batchreaktor	Schott, Deutschland
HPLC	1100 Series	Agilent Technologies, Waldbronn
HPLC-Säule mit zugehöriger Vorsäule	Prontosil 120-3-C18-SH 3,0 µm ID 4 mm, Länge 100 mm; Vorsäulenlänge 10 mm	Bischoff Analysetechnik, Leonberg
Membranpumpe		WISA, Deutschland
Tripelquadrupolmassenspektrometer	API 365 mit <i>Electrospray Ionisation</i> (ESI) bzw. <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i> (APCI)	PE-Sciex, Thornhill, Canada

Für die technischen Nonylphenolpolyethoxylat-Mischungen Marlophen NP3 und Marlophen NP5 gibt der Hersteller CONDEA Chemie die Zusammensetzung in Tab. 33 an. Daraus ergeben sich als mittlere Mol.-Massen 356,9 g / mol für Marlophen NP3 und 428,4 g / mol für Marlophen NP5.

Tabelle 33: Zusammensetzung der technischen NPnEO-Mischungen Marlophen NP3 und Marlophen NP5 (Mol %).

Verbindungen	Marlophen NP3	Marlophen NP5
NP	1,9	0,4
NP1EO	11,8	4
NP2EO	23,8	11,4
NP3EO	26,4	15,8
NP4EO	21,4	18
NP5EO	9,5	18,5
NP6EO	4,4	13,8
NP7EO	1,7	8,1
NP8EO	0,8	5,2
NP9EO	keine Angaben	3,3
NP10EO	keine Angaben	1,6
NP11EO	keine Angaben	0,9
NP12EO	keine Angaben	0,4
NPnEO n > 12	keine Angaben	keine Angaben

4.4.2 Versuchsaufbau für die Batchversuche

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit hat A. Link in seiner Diplomarbeit [313] Untersuchungen in einem Batchreaktor zum Eliminationsverhalten der NPnEO im Abwasser durchgeführt. Der Versuchsaufbau wurde im Wesentlichen von Möhle [291] übernommen, die damit das Eliminationsverhaltens von Pharmaka untersucht hat.

Als Batchreaktor wurde eine Woulfesche Flasche (2 L) mit belebtem Schlamm und Überstandswasser aus dem Belebungsbecken des Lehr- und Forschungsklärwerks (LFKW) Stuttgart-Büsnau im Verhältnis 1:5 befüllt und über einen Pipettierroboter mit einem HPLC-MS/MS-System gekoppelt. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abb. 53 dargestellt. Außer den Verbindungen, deren Eliminationsverhalten geprüft werden sollte, wurden dem belebten Schlamm keine weiteren Substrate (Nährstoffe) zugeführt. Durchmischung und Belüftung erfolgte durch Einblasen von Luft mit einer Membranpumpe. Bei einigen Versuchen wurde der Batchreaktor konstant auf 10-11 °C ge-

kühlt, um die Abbauvorgänge im realen Belebungsbecken im Labormaßstab nachzustellen. Der Autosampler entnahm Proben aus dem Batchreaktor, die nach Filtration über Glaswolle (Schritt 1, Abb. 53) direkt ohne weitere Aufarbeitung in das HPLC-System injiziert wurden (Schritt 2). Wie bei HPLC-MS-Analysen üblich [314] wurde für die chromatographische Auftrennung eine RP-HPLC-Säule gewählt (RP-C18 mit Vorsäule). Zur Detektion wurde das MS/MS-System mit einer ESI (*Electrospray Ionization*) bzw. APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)-Quelle im MRM-Modus (*Multiple Reaction Monitoring*) betrieben (Schritt 3). Mit diesem Versuchsaufbau lässt sich der biologische Eliminationsansatz (Simulation eines Belebungsbeckens) direkt und zeitnah mit der hochsensitiven HPLC-MS/MS-Messtechnik koppeln. Allerdings können nur wässrige Proben ohne Feststoffanteil untersucht werden; eine Quantifizierung von stark sorbierenden Substanzen ist nicht möglich.

4.4.3 Versuchsbedingungen für die Batchversuche

Befüllung des Batchreaktors

Einige der Vorversuche wurden in 2000 mL destilliertem Wasser durchgeführt. Für die Belebtschlamm(BS)-Versuche wurden aus dem Belebungsbecken des LFKW Stuttgart-Büsnau 400 mL BS direkt und 1600-1700 mL Überstandswasser nach Absetzen des BS verwendet. Das Anfangsvolumen wurde so gewählt, dass das Gesamtvolumen im Batchreaktor bei der Zugabe von NPnEO (meist nach etwa 24h und mehrfacher vorheriger Probennahme) noch 2000 mL betrug. Der Feststoffgehalt des BS im Belebungsbecken zum Zeitpunkt der Probennahme lag nach einer *on line*-Messung am Becken zwischen 2,5 und 3,7 g / L; bei einem der Vorversuche war der Gehalt mit 4,7 g / L deutlich höher.

Temperatur und pH-Wert im Batchreaktor

Bei den Versuchen ohne Kühlung lag die Temperatur des Batchreaktors entsprechend der Umgebungstemperatur im Labor mit tageszeitlichen Schwankungen bei 23-28 °C. Bei den Versuchen mit Kühlung wurde ein mit kaltem Wasser durchflossener Schlauch um den Reaktor gewickelt. Die Kühlwassertemperatur wurde mit einem Kryostaten konstant bei 10-11°C gehalten. Als pH-Wert zu Versuchsbeginn wurde der Wert aus der *on line*-Messung im Belebungsbecken genommen, zu Versuchsende wurde der pH-Wert bei einigen Belebtschlammversuchen mit einer pH-Einstabmesselektrode bestimmt. Zu Versuchsbeginn lagen die pH-Werte bei 6,8-7,2, nach 5 Tagen Batchversuchs-Laufzeit bei 8,2-8,4.

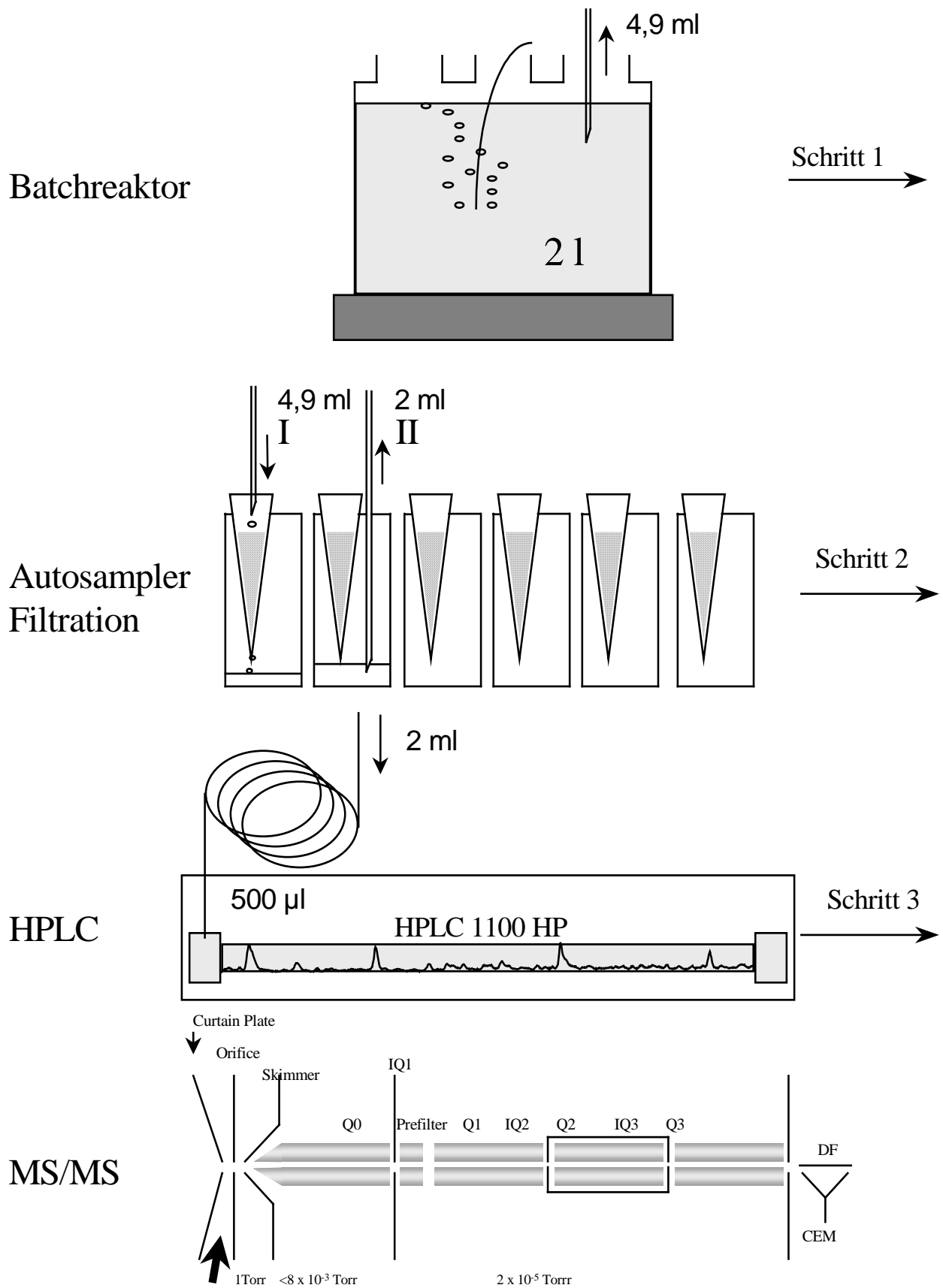


Abbildung 53: Schema des Versuchsaufbaus für die Eliminationsuntersuchungen nach Möhle [291].

Zugabe des Eliminierungs-Substrats, Durchmischung und Belüftung des Reaktors

Die Zugabe von 200 bis 500 µL der unterschiedlich konzentrierten methanolischen Lösungen verschiedener NPnEO bzw. NP1EC zu 2 L Reaktorinhalt erfolgte meist nach einem Tag. In dieser Konzentration (< 0,1 %) ist Methanol nicht toxisch für die Mikroorganismen (s. Kapitel 4.5.4). Die Durchmischung und Belüftung des Reaktors wurde durch permanentes Einblasen von Luft über zwei Kunststoffschläuche gewährleistet und nur während der Probennahme durch den Autosampler für etwa 10 min unterbrochen. In Vorversuchen wurde der Reaktorinhalt zusätzlich mit einem Magnetrührer durchmischt, was aber bereits nach einer Versuchslaufzeit von 2 d zur Zerstörung der Belebtschlammflocken führte. Auch ohne mechanisches Rühren ist allein durch das Einblasen von Luft eine ausreichende Durchmischung gewährleistet. Eine eventuelle Kontamination des belebten Schlamms durch aus den Kunststoffschläuchen austretendes NP ist mengenmäßig unerheblich. Zudem wurde NP bei den Eliminationsversuchen nicht bestimmt (s. Kapitel 4.5.4).

4.5 Durchführung und Ergebnisse ^[#]

4.5.1 Probennahme und HPLC-Methodenentwicklung

Der Gilson Pipettierroboter übernimmt vier Aufgaben: Probennahme aus dem Batchreaktor, Filtration über Glaswolle, Mischen der Probe im Rollrandglas (Höhe 80 mm, AußenØ 30 mm) mit dem internen Standard und Aufgabe auf den HPLC-Injektor (s. Abb. 53). Vor der Probennahme werden Durchmischung und Belüftung für 10 min ausgeschaltet, damit kein belebter Schlamm in das Messsystem gelangt. 4,9 mL Probe werden vom Pipettierroboter entnommen und über Glaswolle in ein Rollrandglas filtriert, in das 1 mL einer internen Standardlösung vorgelegt wurden; die Glaswolle wird anschließend mit 2 mL Acetonitril/Reinstwasser (1:1) nachgespült. 500 µL der Lösung im Rollrandglas werden über die Autosampler-Probenschleife in die HPLC injiziert.

Zur Auftrennung wurde eine RP-C18-Säule eingesetzt, DAD-Detektion erfolgte bei 235 nm. Als Eluent A wurde 5 mM wässrige Ammoniumacetat-Pufferlösung, als Eluent B Acetonitril verwendet. Die wässrige Komponente wurde mit Ammoniak auf pH 8 eingestellt. Die Analyten NP und NP1EC wurden mit 4-n-NP, 4-n-NP2EO, 4-Bromphenyllessigsäure, 2,4,6-Tribromphenol und 2,4,6-Trimethylphenol als potentiellen internen

[#] Die in Kapitel 4.5 diskutierten Versuche sind von A. Link im Rahmen seiner Diplomarbeit [313] durchgeführt worden.

Standards zu einer Standardmischung vereinigt; die technischen NPnEO-Mischungen standen zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung. Für NP und NPnEC wurden wie bei den Screening-Versuchen 4-n-NP und 4-Bromphenylessigsäure als interne Standards verwendet. Folgende Verbindungen wurden als interne Standards für die MS/MS-Bestimmung von NPnEO getestet: 2,4,6-Tribromphenol (interner Standard zur Quantifizierung des 4-NP2EO bei den Screening-Analysen), 4-n-NP2EO und 2,4,6-Trimethylphenol (von Ahel *et al.* [155] als interner Standard zur Quantifizierung von NP, NP1EO und NP2EO benutzt). Das in Tab. 34 angegebene Gradientenprogramm ergab bei einem Fluss von 0,6 mL / min eine gute Auftrennung in vertretbarer Zeit (Abb. 54). Trotz Variation des Gradientenprogramms konnten NP und 4-n-NP nur bis zu einer Retentionszeitdifferenz von 0,3 min getrennt werden, was bei einer realen Probe mit Matrixbelastung sicherlich nicht ausreichend ist. 2,4,6-Tribromphenol schied als interner Standard aus, da es unter den gegebenen HPLC-Bedingungen nur als extrem breiter Peak eluierte.

Tabelle 34: Gradientenprogramm zur Auftrennung von Standardlösungen an der HPLC.

Zeit	Eluent A (wässrige Ammoniumacetatlösung, 5 mmolar, pH 8)
0 min	90 %
10 min	5 %
20 min	5 %

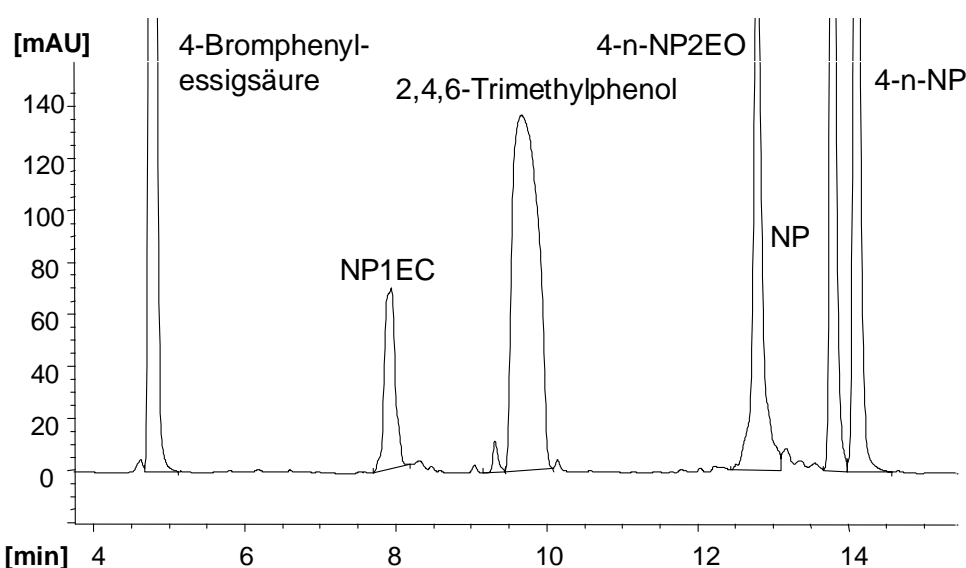


Abbildung 54: Chromatogramm der HPLC-Trennung von Standardlösungen ausgewählter Analyten (DAD-Detektion bei 235 nm).

4.5.2 Ionisierung und Detektion über MS/MS

Die HPLC wurde mit einer ESI (*Electrospray Ionization*)- bzw. Heated Nebulizer (*Turbo Ion Spray*)-Quelle oder mit der APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)-Quelle eines Tripelquadrupol-Massenspektrometers (TSQ) gekoppelt. Bei Direktinjektion über die Spritzenpumpe wurde eine Mikro-ESI-Quelle eingesetzt. Als Scan-Modus wurden Q₁-, Produktionen-, Precursor-Ionen- und MRM-Scan (*Multiple Reaction Monitoring*) angewandt, und zwar im Negativ- wie im Positiv-Ionen-Modus. Die Massenspektren wurden als Profil- und nicht als Zentroid-Daten aufgenommen.

Bei den Screening-Analysen waren die Rohproben aufgereinigt, aufkonzentriert und die Inhaltsstoffe dann als organische Lösung mit GC/MS, d.h. nach gaschromatographischer Auftrennung massenspektrometrisch bestimmt worden (s. Kapitel 2). Dabei gelangen – von zufälliger Koelution einmal abgesehen – die Analyten im GC-Peak jeweils als Reinsubstanzen in das Massenspektrometer. Die Zuordnung der einzelnen TIC-Peaks zu einem bestimmten Analyten ist (außer durch die Retentionszeit) in jedem Fall durch das Aufstocken mit authentischem Material (im Zuge des Standardadditions-Verfahrens) zweifelsfrei gesichert.

Bei den *on line*-Bestimmungen aus den Batchreaktor-Ansätzen, d.h. aus hochverdünnter wässriger Matrix ist dies nicht möglich. Die einzelnen Analyten werden zwar an der HPLC-Säule aufgetrennt (bei wesentlich geringerer Trennleistung als an einer Kapillar-GC-Säule), doch gelangen beim Versprühen in der Spray-Quelle zwangsläufig auch immer Komponenten aus Matrix und Eluens in den MS-Analysator. Daher wird Q₁, das erste Quadrupolfilter des TSQ, auf eine bestimmte Masse eingestellt, hier z.B. auf die Masse der Quasimolekülionen der jeweiligen Analyten [M-H]⁻. Wegen der hohen Verdünnung der Analyten in den *on line* aus dem Batchreaktor gezogenen Proben muß das MS auf höchste Empfindlichkeit eingestellt werden, was zwangsläufig eine verminderte Massen-Trennschärfe bedingt ($\Delta m/z \pm 0.5$ amu). So zeigt z.B. das Negativ-ESI-Produktionen-Spektrum des technischen Nonylphenoxyessigsäure-Gemischs (Abb. 56) neben dem *Parent*-Peak (bei m/z 277) nur minimale CO₂-Abspaltung aus dem Quasi-Molekülion [M-H]⁻ (bei m/z 233); der Basispeak bei m/z 219 entspricht dem Verlust eines Acetoxy-Radikals aus dem Molekül-Radikalanion [M[•]]⁻. Das Q₁-Massenfilter lässt offensichtlich beide Anionen bei m/z 278 und 277 passieren.

Daher werden die in Q₁ selektierten Ionen im zweiten Quadrupol Q₂ des TSQ-Systems durch Kollision mit einem Stoßgas (CID, *Collision Induced Dissociation*) zur (weiteren)

Fragmentierung angeregt. Das dritte Massenfilter Q_3 wird selektiv auf den m/z -Wert eines Ions eingestellt, das nur aus dem zu bestimmenden (Quasi-)Molekülion entstehen kann, bei 4-Bromphenylelessigsäure (s. Abb. 55) etwa auf m/z 171 für den CO_2 -Verlust aus m/z 215, dem Quasi-Molekülion $[\text{M}-\text{H}]^-$ für das schwerere Bromisotop, und entsprechend auf m/z 169 für m/z 213. So werden in Q_3 als dem eigentlichen massenselektiven Detektor alle Q_1 passierenden Ionen ausgeblendet, die nicht vom jeweiligen Analyten, sondern z.B. von Matrixkomponenten stammen.

Um die geeigneten Fragmentierungen für die Detektion in Q_3 zu bestimmen, wurden die verschiedenen Analyten und die zugehörigen Standards (s. Tab. 35) zunächst in 5 mM wässriger Ammoniumacetatlösung (1 mg / L) direkt mit Fließinjektion in die Ionenquelle injiziert (0,3-12 mL / h). Dabei wurde sowohl mit der Mikro-ESI- wie mit der *Heated Nebulizer*-ESI-Quelle gearbeitet, für die NPnEO wurden auch Versuche mit der APCI-Quelle durchgeführt. Um jeweils die Ionisierungstechnik mit der höchsten Ionenausbeute und der selektivsten Fragmentierung zu ermitteln, wurde jede Substanz im Negativ- und Positiv-Ionen-Modus vermessen.

Tabelle 35: Zur Detektion am MS/MS ausgewählte Analyten und interne Standards.

Analyt	interner Standard
NP	4-n-NP
NP1EC	4-Bromphenylelessigsäure
Marlophen NP3, technische Mischung von NPnEO	n-NP2EO, Trimethylphenol
Marlophen NP5, technische Mischung von NPnEO	n-NP2EO, Trimethylphenol
Imbentin N/040, technische Mischung von NPnEO	n-NP2EO, Trimethylphenol

2,4,6-Trimethylphenol erwies sich dabei wegen zu starker Fragmentierung als ungeeignet zur internen Standardisierung für eine MS/MS-Quantifizierung. Für die Analyten 4-NP und NP1EC und die zugehörigen internen Standards 4-n-NP und 4-Bromphenylelessigsäure (s. Tab. 35) wurden die in Tab. 36 angegebenen Massenübergänge ausgewählt. Die entsprechenden Produktionen-Spektren sind in den Abb. 55-58 wiedergegeben. Da die Messungen auf Empfindlichkeit optimiert sind, ergibt sich, wie oben dargelegt, eine Ungenauigkeit für die Massenselektion in Q_1 bzw. die m/z -Bestimmung in Q_3 von $\pm 0,5$ amu. Der zur Peak-Erkennung verwandte Algorithmus gibt zudem jeweils den m/z -Wert für die Stelle höchster Intensität im Peakprofil an (also eventuell auch für einen Spike). Daher zeigen die Massenspektren in den Abb. 55-58 teilweise Abweichungen von ± 1 Dalton von den theoretischen m/z -Werten.

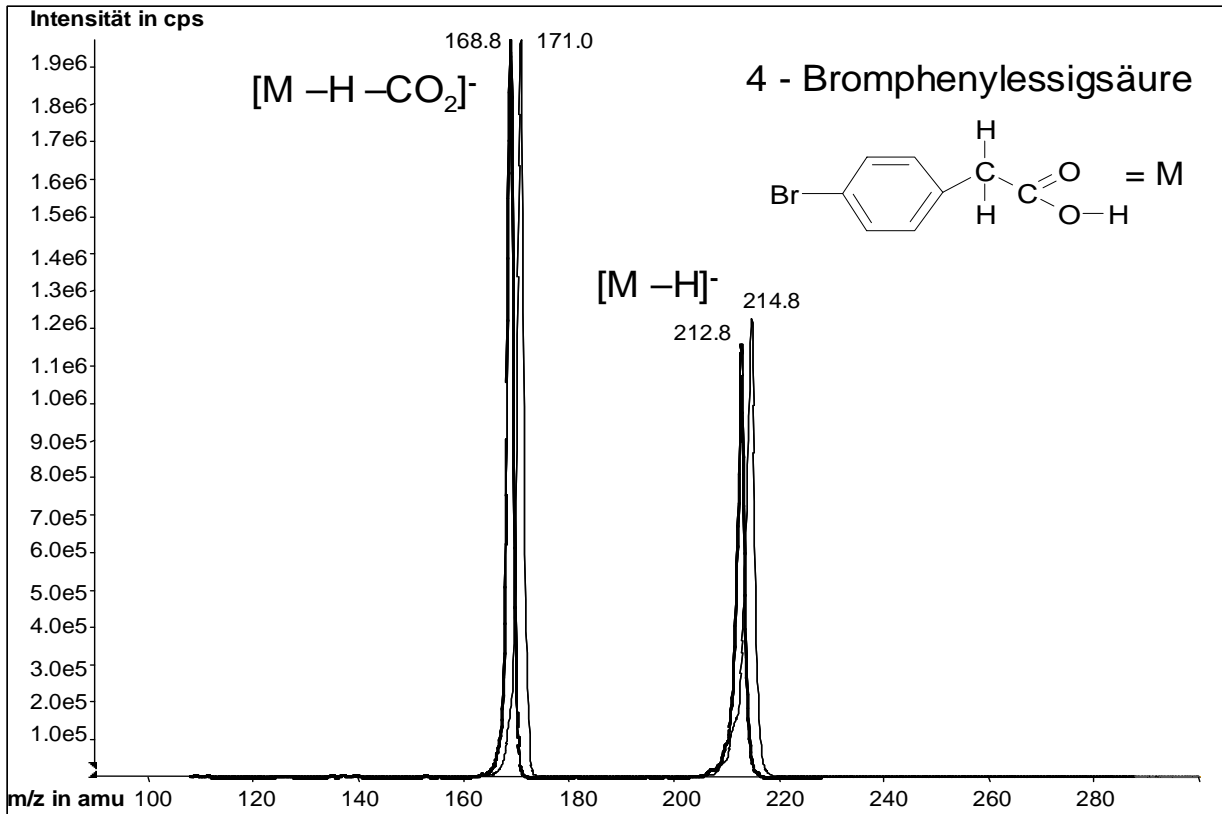


Abbildung 55: Überlagerte Produktions-Spektren der Quasimolekülonen $[M - H]^-$ von 4-Bromphenylelessigsäure, m/z 213 und 215 (aufgenommen im negativ-ESI-Modus).

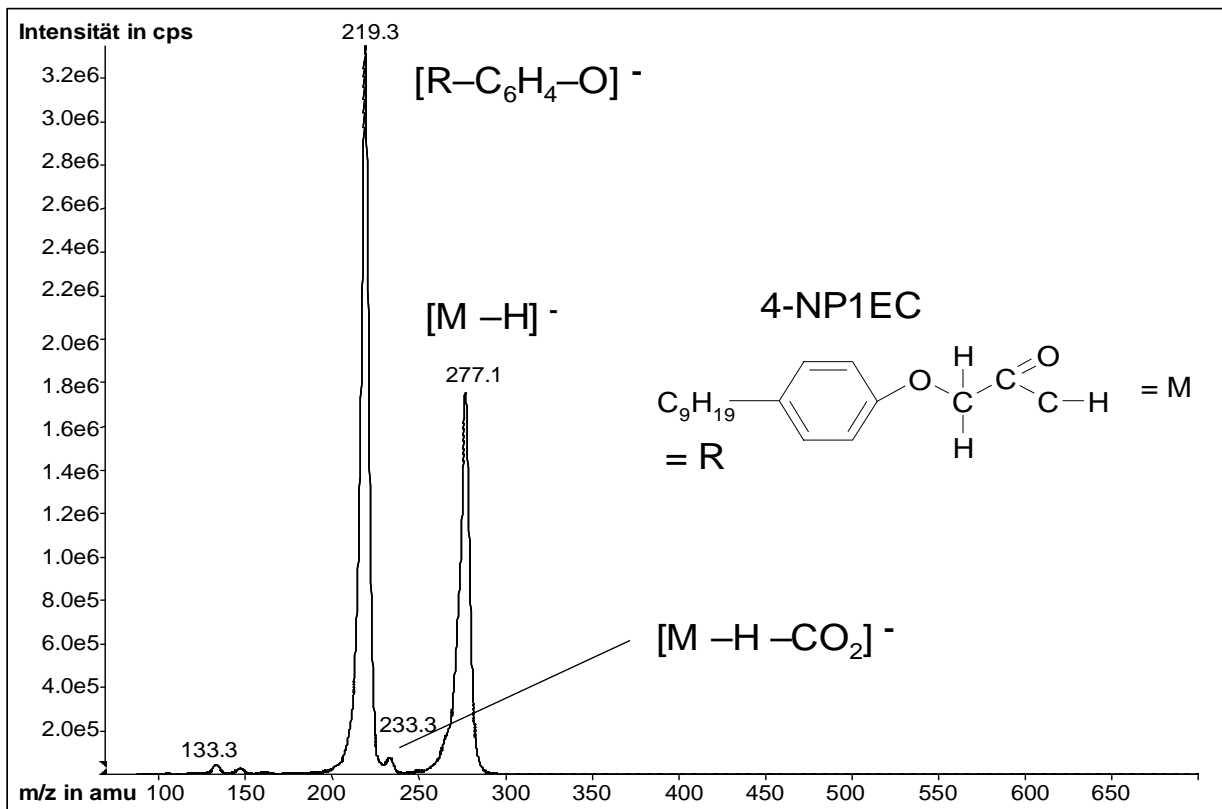


Abbildung 56: Produktions-Spektrum des Quasimolekülonen $[M - H]^-$ von technischer NP1EC (Isomerenmischung), m/z 277 (aufgenommen im Negativ-ESI-Modus).

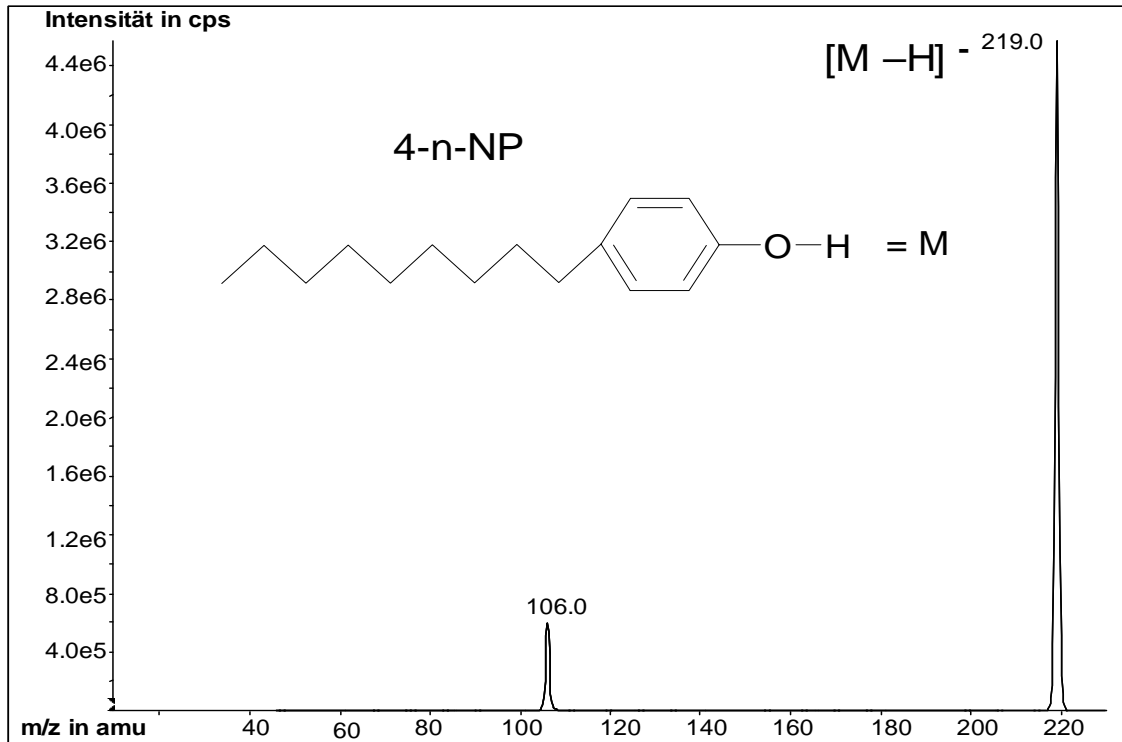


Abbildung 57: Produktions-Spektrum des Quasimoleküls $[M-H]^-$ von 4-n-NP, m/z 219 (aufgenommen im negativ-ESI-Modus).

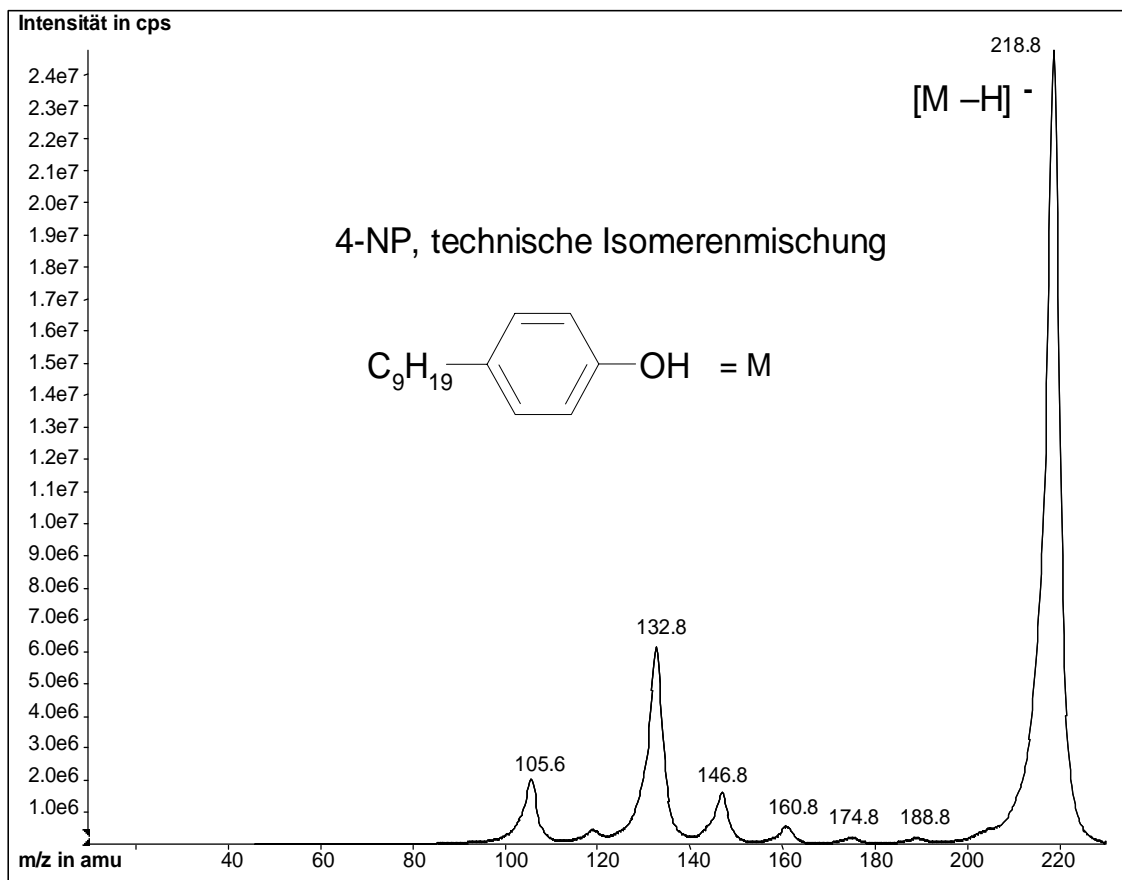


Abbildung 58: Produktions-Spektrum des Quasimoleküls $[M-H]^-$ von technischem NP (Isomerenmischung), m/z 219 (aufgenommen im Negativ-ESI-Modus).

Tabelle 36: Zur Detektion am MS/MS ausgewählte Massenübergänge.

Substanz	Ionisierungsmodus	Massenübergänge [m/z]
4-Bromphenylelessigsäure	negativ-ESI	213 [⁷⁹ Br] / 215 [⁸¹ Br] → 169 / 171
4-NP1EC	negativ-ESI	277 → 219
4-n-NP	negativ-ESI	219 → 106
4-NP	negativ-ESI	219 → 133, 219 → 147

Die technischen NPnEO-Mischungen Marlophen und Imbentin ebenso wie der interne Standard n-NP2EO zeigen bei *Electrospray*-Ionisierung im Negativ- wie im Positiv-Ionen-Modus nur sehr geringe Intensitäten für das Quasimolekülion und für alle Fragmentationen. Durch Zusatz von Triethyl- bzw. Tributylammoniumacetat (pH 7,7, 7, 5,3 oder 4,2) zum Eluenten (5 mM) wurde versucht, die Empfindlichkeit im Positiv-ESI-Modus zu verbessern. Bei Anlagerung der Trialkylammoniumverbindungen an die NPnEO verschieben sich zum einen die Molekülmassen in einen Bereich mit weniger Störsignalen; aufgrund der Bildung von Trialkylammoniumaddukten, insbesondere bei niedrigen pH-Werten, sollte sich zudem die Ionisierungsausbeute verbessern und dadurch die Nachweisempfindlichkeit erhöhen lassen. Auch bei doppelter bzw. vierfacher Trialkylammoniumacetat-Konzentration erhöhte sich die Ionenintensität aber nicht.

Schließlich wurden die NPnEO, gelöst in 5 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 8), über Fließinjektion in eine APCI-Quelle injiziert und dabei Nadelspannung und die Temperatur des *Nebulizer*-Gases variiert. Die Ionenausbeute und damit die Empfindlichkeit verbesserten sich aber gegenüber den Versuchen mit der ESI-Quelle erst bei relativ geringen *Nebulizer*-Gastemperaturen von etwa 200 bis 250 °C merklich. Die gesamte APCI-Quelle und das MS-Einlasssystem zeigten dabei jedoch bereits nach wenigen Stunden Messzeit so erhebliche Verschmutzung, dass eine Weiterbenutzung des Systems ohne Reinigung unmöglich wurde. Auf die Detektion von NPnEO und dem zugehörigen internen Standard 4-n-NP2EO mit MS/MS wurde daher verzichtet.

4.5.3 Quantifizierung

Zur Quantifizierung von NP und NP1EC wurde der MS/MS-*Response* über die internen Standards normiert. Die Kalibrierungen wurden zu Beginn und mehrfach zwischen den Messungen durchgeführt, um Veränderungen in der Messempfindlichkeit des HPLC-MS/MS-Systems weitgehend zu kompensieren. Für die Kalibrierung wurden 5 bis 7 verschiedene Konzentrationen der Analyten NP und NP1EC in 2,5 mM wässrigem Ammoniumacetatpuffer angesetzt. Zur Kalibrierung von NP1EC wurde zunächst

vom Labor Jennifer Field bezogene NP1EC verwendet, später das technische Produkt Irgacor NPA (NP1EC, technisch); die Kalibrierung zeigte für beide Produkte gute Übereinstimmung. Den Kalibrierlösungen wurden die internen Standards 4-n-NP und 4-Bromphenylelessigsäure in jeweils gleicher Konzentration zugesetzt. Die Mischungen wurden mit dem Gilson-Pipettierroboter aus Autosampler-Gläsern gezogen und aufgegeben. Im gemessenen Konzentrationsbereich (Doppelmessung pro Konzentrationsstufe) ergab sich eine gut reproduzierbare lineare Konzentrations-Peakflächen-Beziehung ($R^2 > 0,99$). Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden über ein S/N-Verhältnis von 3:1 bzw. 6:1 in den Chromatogrammen festgelegt und sind in Tab. 37 zusammengestellt.

Tabelle 37: Nachweis-(NG) und Bestimmungsgrenzen (BG) der Analyten NP und NP1EC ermittelt über ein S/N-Verhältnis von 3:1 bzw. 6:1 bei mehrfach durchgeführten externen Kalibrierungen ($\mu\text{g} / \text{L}$).

Analyten	Konzentrationsbereich der Kalibrierlösungen in $\mu\text{g} / \text{L}$	NG	BG
NP	8-800	} 10	25
	10-1000		
NP1EC	0,07-77	0,05	0,1
	0,09-450	} 0,5	1
	0,07-770		

Bei der Bestimmung von NP erhielten wir bei den ersten Kalibrierungen vergleichsweise hohe Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Vorversuche hatten gezeigt, dass NP stark am belebten Schlamm und selbst an der Glaswand des Reaktors adsorbiert wird (s. Kapitel 4.5.4); bei den Proben aus dem Batchreaktor wurde die Bestimmungsgrenze außer bei einem Vorversuch in destilliertem Wasser mit deutlich höheren NP-Konzentrationen nie überschritten. Da NP in Proben aus dem Batchreaktor somit nicht quantifizierbar war, wurde auf eine wiederholte Kalibrierung von NP nach den ersten Eliminationsversuchen verzichtet.

Zur Quantifizierung von NP1EC wurden die Analytpeakflächen (APF) aus den Chromatogrammen vor der Umrechnung in Konzentrationen über die Peakflächen des zugehörigen internen Standard 4-Bromphenylelessigsäure normiert:

$$\text{Normierte APF} = \frac{\text{(Mittelwert der Internen-Standard-Peakfläche)}}{\text{(Interne-Standard-Peakfläche)}} \times \text{APF}$$

Damit lassen sich sowohl Veränderungen in der chromatographischen Trennung bei Variation der Matrix als auch Schwankungen in der Empfindlichkeit des HPLC-MS/MS-Systems ausgleichen. Abb. 59 zeigt beispielhaft die TIC-Chromatogramme und die daraus bestimmte Kalibriergerade für NP1EC.

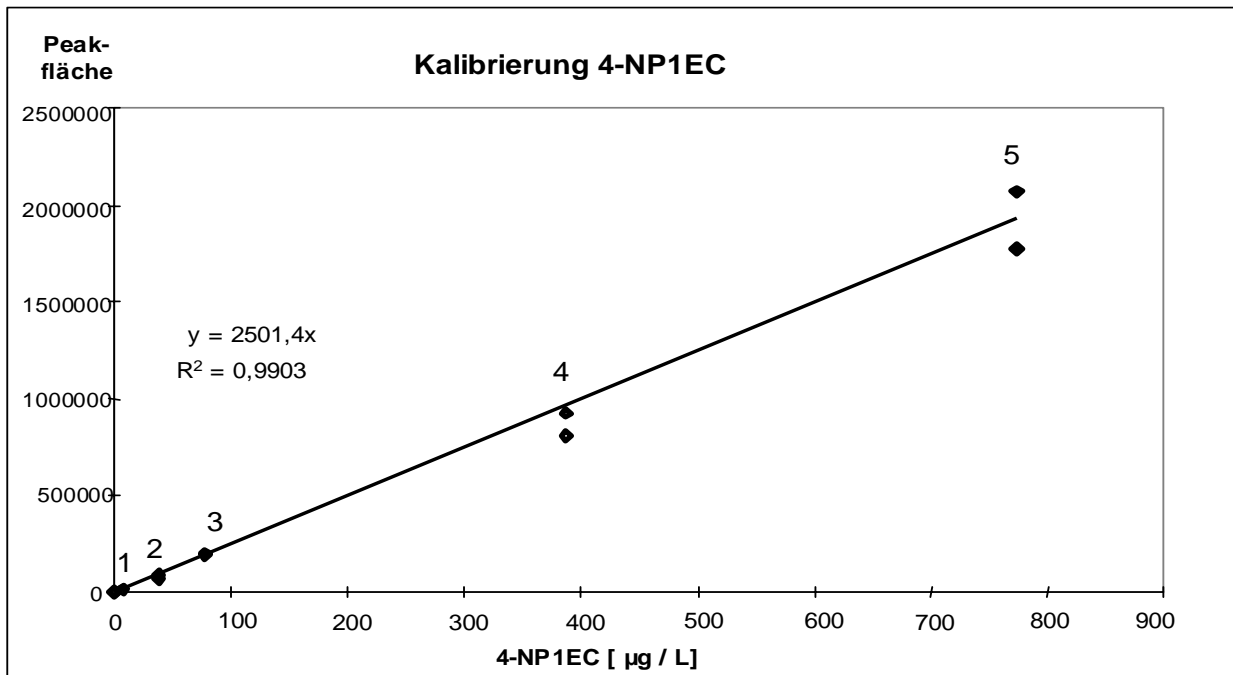
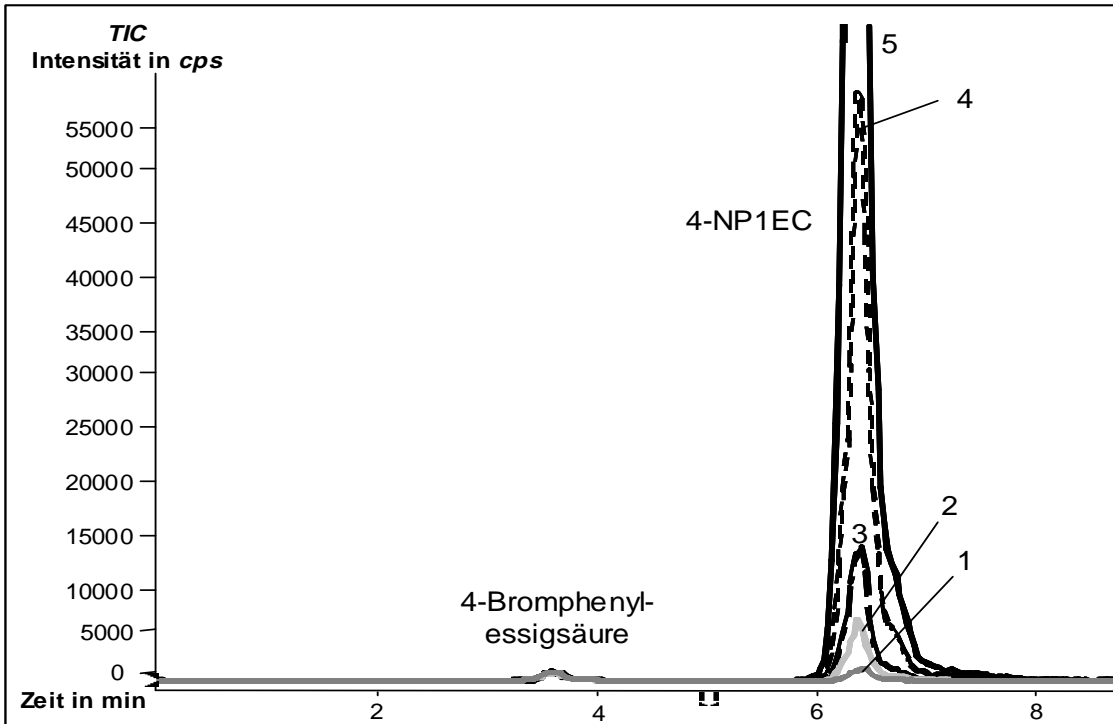


Abbildung 59: HPLC-MS/MS-Kalibrierung vom 28.03.00 für NP1EC. Dargestellt sind die TIC-Chromatogramme für NP1EC in den zur Kalibrierung verwendeten Konzentrationsstufen mit dem zugehörigen internen Standard 4-Bromphenylessigsäure und das nach Normierung über den internen Standard erhaltene Konzentrations-Peakflächen-Diagramm für die Kalibrierung.

4.5.4 Vorversuche zu den Eliminationsversuchen

In drei Vorversuchen wurde der Batchreaktor mit destilliertem Wasser gefüllt und NP, NP1EC oder Marlophen NP3 (technische NPnEO-Mischung) zugegeben. Zwei weitere Vorversuche wurden mit belebtem Schlamm und Überstandswasser aus dem Belebungsbecken des LFKW Stuttgart-Büsnau (Verhältnis 1:5) durchgeführt; dabei wurden dem belebten Schlamm im ersten Ansatz keine weiteren Substanzen zugesetzt, im zweiten Ansatz das Handelsprodukt Irgacor NPA (technische NP1EC).

Bei den meisten nachstehend beschriebenen Batchversuchen stellte sich nach einigen Stunden biologischer Abbautätigkeit ein NP1EC-Konzentrationsniveau ein, das über Stunden oder gar Tage im Rahmen der Messgenauigkeit konstant blieb. Um die Konzentrations-Plateaus der einzelnen Batchversuche miteinander vergleichen zu können, wurde für die Messergebnisse, die einem Niveau zuzuordnen sind, jeweils der arithmetische Mittelwert gebildet und auf einen ganzzahligen Wert gerundet. Dies ist bei der gegebenen Messgenauigkeit hinreichend genau, um Aussagen zum biologischen Eliminationsverhalten der NPnEO zu erlauben.

Vorversuche in destilliertem Wasser

Der Inhalt des Batchreaktors (2 L destilliertes Wasser) wurde unmittelbar vor Messbeginn mit NP aufgestockt (NP-Konzentration unmittelbar nach Zugabe $289 \mu\text{g} / \text{L}$). Wie Abb. 60 zeigt, nimmt die NP-Konzentration in der wässrigen Phase innerhalb weniger Stunden stark ab. Dies kann nicht durch Ausflocken des Substrats bedingt sein, da NP bei $20,5 \text{ }^\circ\text{C}$ eine Wasserlöslichkeit von $> 5 \text{ mg} / \text{L}$ besitzt (s. Tab. 30). Ein biologischer Abbau ist unter diesen Bedingungen gleichfalls auszuschließen, d.h. NP muss an der Reaktorwand adsorbiert werden.

NP-Konz. [$\mu\text{g} / \text{L}$]

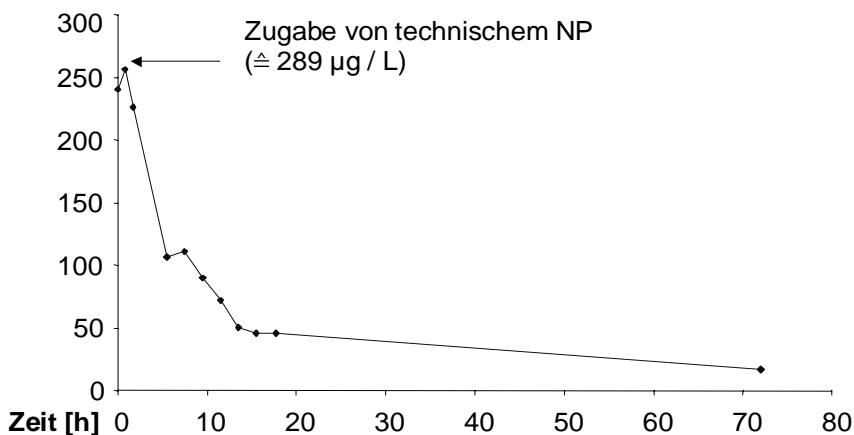


Abbildung 60: Vorversuch zum Eliminationsverhalten von NP in destilliertem Wasser.

Da bei der Quantifizierung von 4-NP1EC keine Sorptionsprobleme auftraten, wie ein weiterer Vorversuch in destilliertem Wasser zeigte (s. Abb. 61), wurde auf eine Silanisierung der Glasgeräte verzichtet und NP, insbesondere auch wegen der hohen Bestimmungsgrenze bei der MS/MS-Detektion (s. Kapitel 4.5.3) nicht quantifiziert. Beim zweiten Vorversuch in destilliertem Wasser mit NP1EC lagen die gemessenen Konzentrationen über einen Zeitraum von 14 h in einem Bereich von 73-100 $\mu\text{g} / \text{L}$, entsprechend 81-111 % der zugegebenen Konzentration (90 $\mu\text{g} / \text{L}$). Diese Schwankungsbreite zeigte sich auch bei den Versuchen mit belebtem Schlamm; sie ist messsystembedingt. Während knapp 20 h Versuchslaufzeit war kein signifikantes Absinken der NP1EC-Konzentration zu erkennen; eine Adsorption von NP1EC an der Wandung des Reaktorgefäßes oder den Belüftungsschläuchen (wie bei NP) ist demnach für die Abbauprobversuche unerheblich.

NP1EC-Konz. [$\mu\text{g} / \text{L}$]

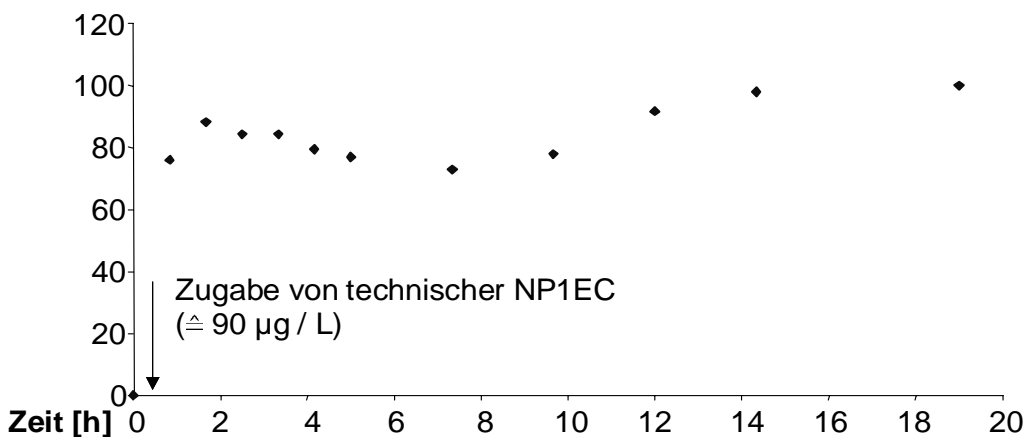


Abbildung 61: Vorversuch zum Eliminationsverhalten von NP1EC in destilliertem Wasser.

In einem weiteren Vorversuch wurde Marlophen NP3 in einer Konzentration von 355 $\mu\text{g} / \text{L}$ in destilliertes Wasser gegeben, und die NP1EC-Konzentration innerhalb von 13 h regelmäßig gemessen. Sie lag während der gesamten Versuchszeit unter der Bestimmungsgrenze von 0,5 $\mu\text{g} / \text{L}$. Marlophen NP3 enthält also keine für die Versuche relevanten NP1EC-Beimengungen.

Vorversuche in belebtem Schlamm

Der Batchreaktor wurde beim ersten Versuch ausschließlich mit belebtem Schlamm und Überstandswasser befüllt und belüftet (ohne Zugabe von NPnEO oder NP1EC). Dabei ergab sich innerhalb von 3 d Laufzeit der in Abb. 62 dargestellte Konzentrationsverlauf für NP1EC.

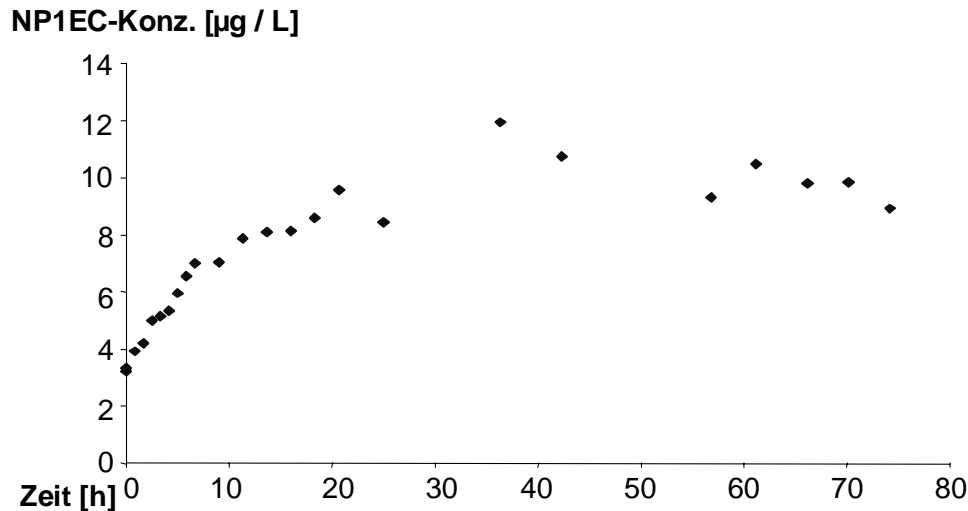


Abbildung 62: Vorversuch zur Bestimmung des Konzentrationsniveaus von NP1EC in belebtem Schlamm *ohne* Zugabe von NPnEO oder NPnEC.

Bereits zu Beginn der Messung waren etwa $3 \mu\text{g} / \text{L}$ NP1EC im belebten Schlamm enthalten, entsprechend der NP1EC-Konzentration im Belebungsbecken des LFKW Stuttgart-Büsnau zum Zeitpunkt der Probennahme. Bei den Screening-Versuchen (s. Kapitel 2) wurde im Abwasser des Kläranlagenablaufs Stuttgart-Büsnau eine NP1EC-Konzentration von $5,5 \mu\text{g} / \text{L}$ bestimmt. Da während der gesamten Abwasseraufbereitung, also auch noch nach der biologischen Stufe, NPnEO eliminiert und so u.a. NP1EC gebildet wird, ist die gemessene NP1EC-Konzentration im Belebungsbecken durchaus plausibel. Zudem schwanken die NP1EC-Werte je nach Zeitpunkt der Probennahme (Zulaufzusammensetzung, Temperatur) und Abbauleistung der Mikroorganismen; bei weiteren Eliminationsversuchen wurden z.B. NP1EC-Anfangskonzentrationen von bis zu $10 \mu\text{g} / \text{L}$ bestimmt.

Innerhalb einiger Stunden stieg die NP1EC-Konzentration an. Nach ca. 24 h war ein Konzentrationsniveau von $10 \mu\text{g} / \text{L}$ erreicht, dass sich (im Rahmen der Messgenauigkeit von $\pm 2 \mu\text{g} / \text{L}$) auch während der restlichen Versuchszeit (48 h) nicht mehr veränderte. Daraus ergeben sich vier wichtige Schlussfolgerungen für die Eliminationsversuche:

- NP1EC ist mit Sicherheit bereits im Belebungsbecken vorhanden.
- Da NP1EC ein Eliminationsprodukt von NPnEO ist und seine Bildung in einer biologischen Kläranlage durch andere Prozesse als den Abbau von NPnEO auszuschließen ist, muss auch der „metabolische Vorläufer“ NPnEO bereits im Belebungsbecken vorliegen.

- Der Abbau von NPnEO zu NP1EC beginnt sofort nach Versuchsstart ohne lag-Phase.
- 24 h nach Versuchsbeginn hat die NP1EC-Konzentration einen „*steady state*“-Wert erreicht. NPnEO wird also bei Raumtemperatur im Wesentlichen innerhalb von 24 h zu NP1EC abgebaut, das seinerseits unter diesen Bedingungen kaum mehr metabolisiert wird.

Bei allen weiteren Eliminationsversuchen wurde daher NPnEO erst nach einer „Inkubationszeit“ von etwa 24 h zugegeben, um sicherzustellen, dass im belebten Schlamm bereits vorhandenes NPnEO weitgehend zu NP1EC abgebaut ist.

In einem letzten Vorversuch wurde nach 24 h Versuchslaufzeit NP1EC in den mit belebtem Schlamm befüllten Batchreaktor gegeben und die NP1EC-Konzentration dadurch sprunghaft um $90 \mu\text{g} / \text{L}$ erhöht. Vor der Zugabe hatte sich das NP1EC-Konzentrationsniveau auf $23 \mu\text{g} / \text{L}$ eingestellt, unmittelbar nach der Zugabe lag es bei etwa $100 \mu\text{g} / \text{L}$ (s. Abb. 63). Somit wurden 88 % der zugegebenen NP1EC-Menge wiedergefunden; der Verlust von 12 % dürfte weitgehend matrixbedingt sein. Die Kalibrierungen waren demgegenüber in destilliertem Wasser, d.h. unter Ausschluss von Matrixeffekten, durchgeführt worden. Ein Verlust von 12 % ist in Anbetracht der messtechnisch bedingten Schwankungsbreite der Konzentrationsniveaus aber nicht relevant. Das NP1EC-Konzentrationsniveau von ca. $100 \mu\text{g} / \text{L}$ blieb über weitere 24 h konstant (s. Abb. 63). Abbau oder Sorption in relevantem Maße während dieses Zeitraums sind somit auszuschließen.

NP1EC-Konz. [$\mu\text{g} / \text{L}$]

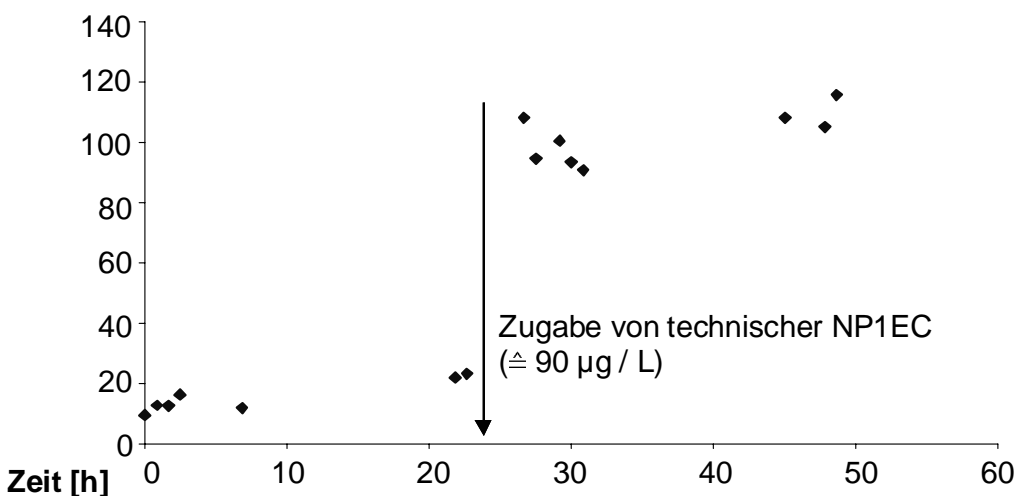


Abbildung 63: Vorversuch zum Anstieg der NP1EC-Konzentration im belebten Schlamm nach Zusatz von NP1EC in einer Konzentration von $90 \mu\text{g} / \text{L}$ (24 h nach Versuchsstart).

4.5.5 Eliminationsversuche in belebtem Schlamm

Die Eliminationsversuche wurden mit zwei verschiedenen technischen NPnEO-Mischungen durchgeführt, Marlophen NP3 und Marlophen NP5 (s. Kapitel 4.4.1). Zusätzlich wurde die zugegebene Menge an Marlophen sowie die Temperatur im Batchreaktor variiert. Für verschiedene europäische Kläranlagen sind NPnEO-Zulaufkonzentrationen zwischen 30 und 9000 $\mu\text{g} / \text{L}$ und Ablaufkonzentrationen zwischen 2 und 500 $\mu\text{g} / \text{L}$ bestimmt worden [75]. Dementsprechend haben wir dem belebten Schlamm NPnEO in einem Konzentrationsbereich von 100 bis 500 $\mu\text{g} / \text{L}$ zugesetzt.

Eliminationsversuche mit Marlophen NP3 bei Raumtemperatur

Mit dieser technischen NPnEO-Mischung wurden drei Abbauversuche bei Raumtemperatur durchgeführt. Im ersten Versuch (A) wurden nach 22,5 h – die NP1EC-Konzentration war in diesem Zeitraum von 4 auf 11 $\mu\text{g} / \text{L}$ angestiegen – 106 $\mu\text{g} / \text{L}$ Marlophen NP3 zugegeben. Die NP1EC-Konzentration stieg nach der Zugabe rasch an und pendelte sich nach etwa 60 h auf einem mittleren Konzentrationsniveau von 20 $\mu\text{g} / \text{L}$ ein (Abb. 64).

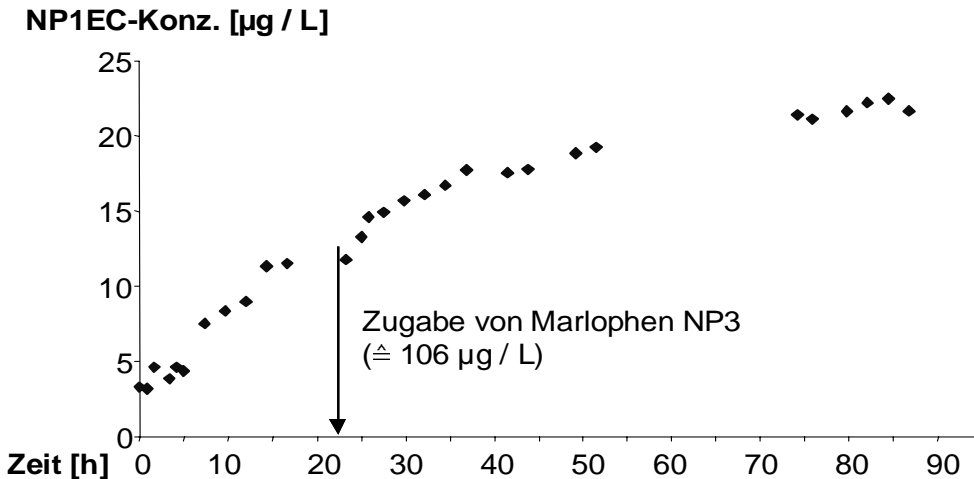


Abbildung 64: Konzentrationsverlauf von NP1EC beim Eliminationsversuch mit Marlophen NP3 unter Raumtemperatur (Versuch A).

Der Anstieg der NP1EC-Konzentration in den ersten 24 h (durch Elimination von bereits im Belebungsbecken vorhandenen NPnEO) ist nur wenig geringer (ca. $\frac{2}{3}$) als nach der Zugabe von 106 $\mu\text{g} / \text{L}$ Marlophen NP3. Zum Zeitpunkt der Probennahme aus dem Belebungsbecken des LFKW Stuttgart-Büsnau muss demnach die NPnEO-Gesamtkonzentration deutlich höher als 100 $\mu\text{g} / \text{L}$ gewesen sein.

Bei den zwei weiteren Versuchen (**B,C**) wurden, um einen deutlich höheren Anstieg zu erzwingen, jeweils 355 $\mu\text{g} / \text{L}$ Marlophen NP3 zugegeben. Beim dritten Versuch (**C**) wurde nach 93 h Gesamtversuchszeit erneut Marlophen NP3 zugegeben ($\hat{=}$ 709 $\mu\text{g} / \text{L}$). Der Konzentrationsverlauf beider Eliminationsversuche ist in Abb. 65 dargestellt. Abb. 66 zeigt beispielhaft die Total-Ionenstrom(TIC)-Chromatogramme und den NP1EC-Konzentrationsverlauf für den zweiten Versuch (**B**).

NP1EC-Konz. [$\mu\text{g} / \text{L}$]

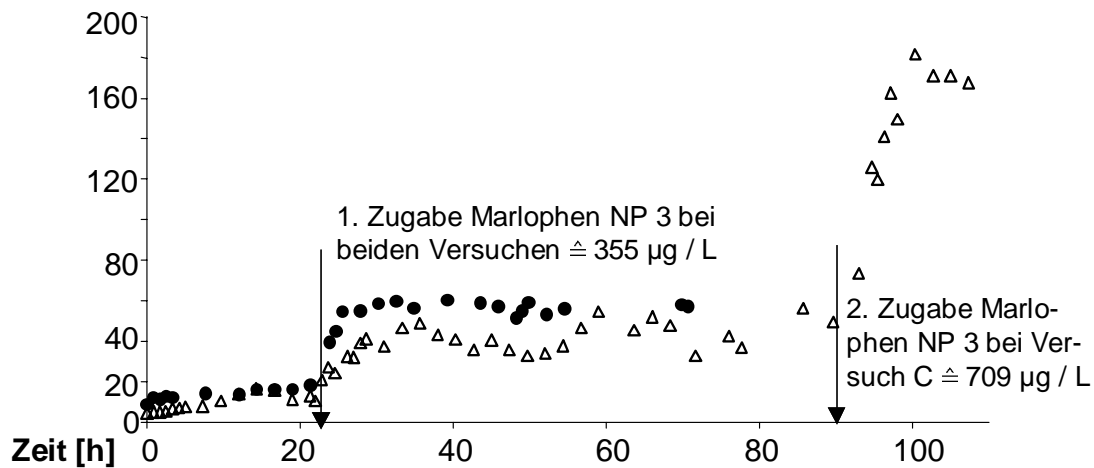


Abbildung 65: NP1EC-Konzentrationsverlauf in den Eliminationsversuchen mit Marlophen NP3 bei Raumtemperatur (● Versuch B; Δ Versuch C).

Nach der ersten Zugabe von 355 $\mu\text{g} / \text{L}$ Malophen NP3 steigt die NP1EC-Konzentration in den Versuchen **B** und **C** um 40 bzw. 30 $\mu\text{g} / \text{L}$ an (Tab. 38). Dies stimmt gut mit der Zunahme von 10 $\mu\text{g} / \text{L}$ bei Versuch **A** überein (Marlophen-Zugabe 106 $\mu\text{g} / \text{L}$).

Tabelle 38: Konzentrationsniveaus von NP1EC bei den Eliminationsversuchen mit Marlophen NP3 bei Raumtemperatur [$\mu\text{g} / \text{L}$].

Versuche	Start (0 h)	vor Zugabe (~24h)	nach 1. Marlophenzugabe (355 $\mu\text{g} / \text{L}$)	nach 2. Marlophenzugabe (709 $\mu\text{g} / \text{L}$)
B	9	17	57	-
C	5	12	42	170

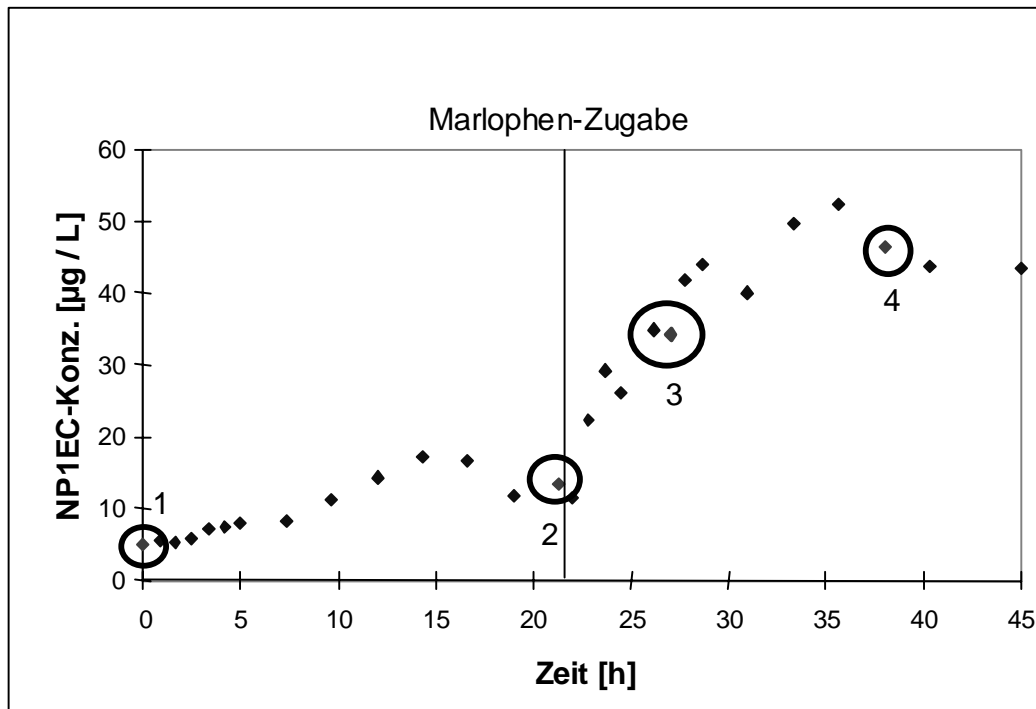
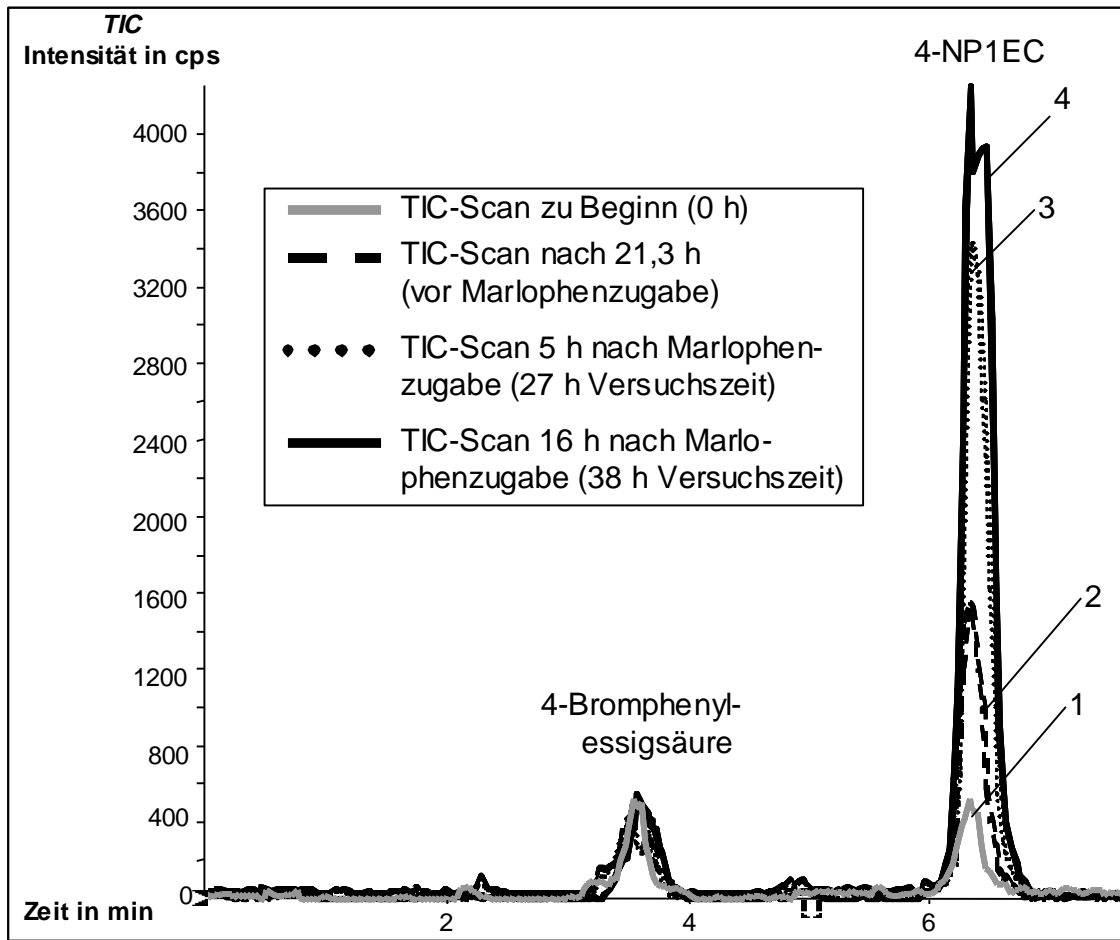


Abbildung 66: TIC-Chromatogramme und NP1EC-Konzentrationsverlauf für Eliminationsversuch **B** mit Marlophen NP3 bei Raumtemperatur (Zugabe entsprechend einer Konzentration von 355 µg / L).

Offensichtlich blieb bei beiden Versuchen das NP1EC-Konzentrationsniveau, das sich 6 bzw. 9 h nach der ersten Zugabe von Marlophen NP3 eingestellt hatte, im Rahmen der Messgenauigkeit über mehrere Tage stabil. Der Anstieg der NP1EC-Konzentration nach der zweiten Marlophen NP3-Zugabe zeigt außerdem, dass die Mikroorganismen auch nach 4 Tagen Versuchslaufzeit noch zu effizientem Abbau befähigt sind.

Theoretisch könnte bei *aerobem* biologischem Abbau aus jedem mol NPnEO (mit $n > 0$) ein mol NP1EC entstehen, wenn der Abbauweg über die kurzkettigen NPnEO zu den kurzkettigen NPnEC zugrundegelegt wird (s. Kapitel 4.3). Aus $355 \mu\text{g} / \text{L}$ bzw. $994 \text{ nmol} / \text{L}$ Marlophen NP3 könnten also theoretisch $994 \text{ nmol} / \text{L}$ NP1EC entstehen. Tatsächlich entstanden sind 40 (Versuch **B**) bzw. $30 \mu\text{g} / \text{L}$ (Versuch **C**) oder 143 bzw. $108 \text{ nmol} / \text{L}$ NP1EC. Marlophen NP3 enthält zu $11,8 \text{ Mol-\%}$ NP1EO (s. Tab. 33), bei $994 \text{ nmol} / \text{L}$ Marlophen NP3 somit $117 \text{ nmol} / \text{L}$ NP1EO. Daher ist anzunehmen, dass NP1EC weitgehend direkt durch Oxidation von NP1EO gebildet wurde. Die länger-kettigen NPnEO werden somit in einem Zeitraum von 2-3 Tagen kaum zu NP1EO abgebaut, sondern höchstens zu NPnEC mit unveränderter Kettenlänge oxidiert [298]. Da für länger-kettige und kurzkettige NPnEC vergleichbare Stabilität anzunehmen ist, kann deshalb innerhalb des Versuchszeitraums keine weitere NP1EC gebildet werden.

Eliminationsversuch (D) mit Marlophen NP5 bei Raumtemperatur

Marlophen NP5 wurde in einer vergleichbaren molaren Konzentration wie Marlophen NP3 zugesetzt ($953 \text{ nmol} / \text{L}$ entsprechend $408,4 \mu\text{g} / \text{L}$). Abb. 67 und Tab. 39 geben den Verlauf des NP1EC-Konzentrationsanstiegs und die mittleren NP1EC-Konzentrationsniveaus wieder.

NP1EC-Konz. [$\mu\text{g} / \text{L}$]

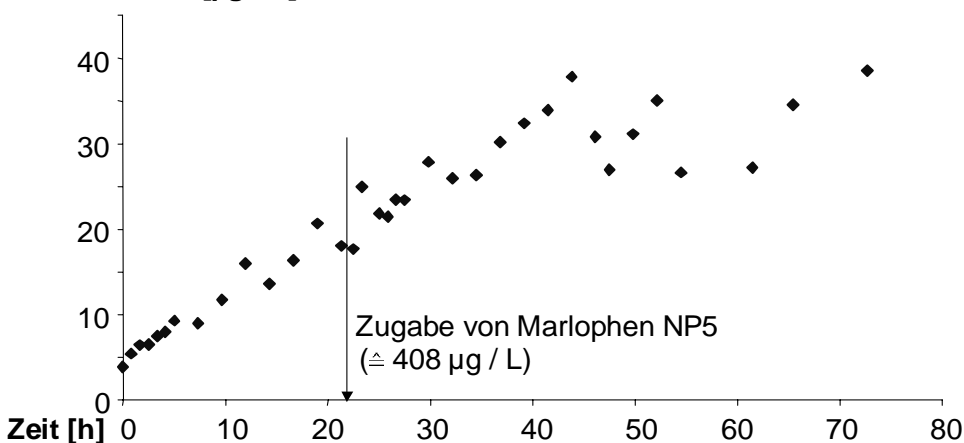


Abbildung 67: NP1EC-Konzentrationsverlauf für den Abbauversuch mit Marlophen NP5 bei Raumtemperatur (Versuch **D**).

Tabelle 39: Konzentrationsniveaus von NP1EC beim Abbauersuch (**D**) mit Marlophen NP5 bei Raumtemperatur (Zugabe entsprechend einer Konzentration von 408 µg / L).

	Start (0h)	vor Zugabe (22h)	nach Marlophenzugabe
NP1EC-Konz. in µg / L	4	18	32

Der Plateauwert für die NP1EC-Konzentration wird nach der Zugabe von Marlophen NP5 etwas langsamer erreicht als bei den Versuchen mit Marlophen NP3; auch liegt der Endwert niedriger. In Tab. 40 sind die Ergebnisse für die beiden Eliminationsversuche mit Marlophen NP3 (**B,C**; Zugabe 994 nmol / L) und für den Eliminationsversuch mit Marlophen NP5 (**D**; Zugabe 953 nmol / L) einander gegenübergestellt. Die Konzentration von NP1EO im Reaktor nach Zugabe von 953 nmol / L Marlophen NP5 beträgt 38 nmol / L, die entstandene Menge NP1EC 50 nmol / L. Bei allen drei Versuchen ist der Anstieg der NP1EC-Konzentration in erster Linie auf die Oxidation des in Marlophen enthaltenen NP1EO zurückzuführen. Bei den Versuchen **C** und **D** muss NP1EC aber zusätzlich auf einem anderen Abbauweg entstanden sein, da die zugegebene NP1EO-Menge alleine nicht ausreicht, um den Anstieg der NP1EC-Konzentration zu erklären. Daher könnten bei diesem Versuch auch längerkettige NPnEO anteilig über NP1EO zu NP1EC abgebaut worden sein.

Tabelle 40: Vergleich des NP1EC-Konzentrationsanstiegs bei Zugabe von Marlophen NP3 und Marlophen NP5.

Versuche	zugegebene Marlophenkonz.	darin enthaltene NP1EO-Konz.	Plateauwert der NP1EC-Konz. nach Marlophenzugabe
Versuch B , Marlophen NP3	994 nmol / L	117 nmol / L	143 nmol / L
Versuch C , Marlophen NP3	994 nmol / L	117 nmol / L	108 nmol / L
Versuch D , Marlophen NP5	953 nmol / L	38 nmol / L	50 nmol / L

Eliminationsversuch mit Marlophen NP3 unter Kühlung des Reaktors (E)

Bei einer Temperaturerhöhung um 10 ° erhöht sich die Geschwindigkeit enzymatisch katalysierter Reaktionen auf das Doppelte bis Vierfache [315]. Der Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Metabolisierung von Marlophen NP3 wurde in einem weiteren Eliminationsversuch (**E**) untersucht, bei dem der Batchreaktor von außen auf 10-11 °C gekühlt wurde. Diese Temperatur entspricht den realen Verhältnissen im Belebungsbecken des LFKW Stuttgart-Büsnau in den Wintermonaten [316] (Abb. 68).

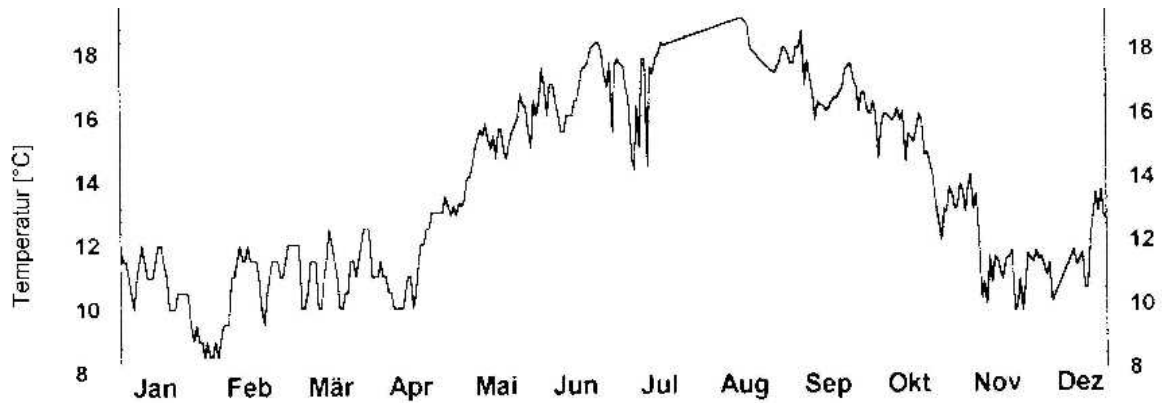


Abbildung 68: Temperaturverlauf im Belebungsbecken des LFKW Stuttgart-Büsnau 1998 [316].

Marlophen NP3 wurde wiederum in einer Menge zugegeben, die einer Konzentrations-erhöhung um $355 \mu\text{g} / \text{L}$ im Reaktor entspricht. Der Anstieg der NP1EC-Konzentration nach Zugabe von Marlophen NP3 (Abb. 69, Tab. 41) bis zu einem stabilen Konzentrationsniveau (nach 24 h) fällt deutlich geringer aus als in den Versuchen bei Raumtemperatur (**B,C**). Bei niedriger Temperatur erscheint der Abbau von NPnEO zu NP1EC demnach deutlich retardiert.

NP1EC-Konz. [$\mu\text{g} / \text{L}$]

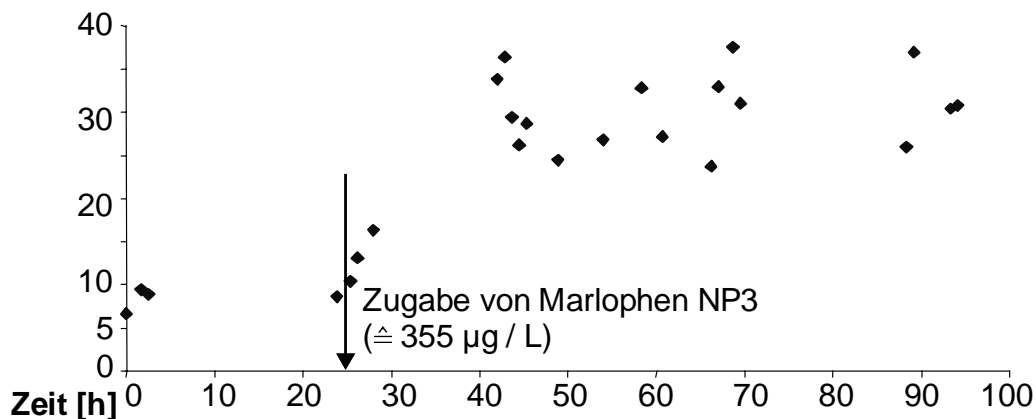


Abbildung 69: Konzentrationsverlauf der NP1EC-Konzentration für den Eliminationsversuch mit Marlophen NP3 (Versuch **E**) bei Kühlung des Reaktors.

Tabelle 41: NP1EC-Konzentrationsniveaus im Versuch **E** mit Marlophen NP3 bei Kühlung des Reaktors (Zugabe entsprechend einer Konzentration von $355 \mu\text{g} / \text{L}$).

	Start (0h)	vor Zugabe (22h)	nach Marlophenzugabe
NP1EC-Konz. in $\mu\text{g} / \text{L}$	8	9	30

4.6 Zusammenfassende Wertung

Das vorgestellte Verfahren erlaubt durch die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit einem Tripelquadrupolmassenspektrometer (HPLC-MS/MS) eine zeitnahe automatisierte Analyse der biologischen Elimination z.B. von NPnEO. Außer einer automatisierten Filtration über Glaswolle ist keine weitere Probenaufarbeitung erforderlich. Durch Kopplung des HPLC-MS/MS-Messsystems mit der kontinuierlichen und automatischen Probennahme aus einem Batchreaktor lassen sich Konzentrations/Zeitkurven für NP1EC, einer der Hauptmetabolite beim *aeroben* Abbau der NPnEO, bestimmen. Dagegen gelang es nicht, Messbedingungen für das HPLC-MS/MS-System zu finden, die eine Quantifizierung des stark hydrophoben und zur Sorption neigenden Eliminationsproduktes NP und der NPnEO selbst erlaubten.

Die Versuche zur Elimination von NPnEO wurden unter Bedingungen ähnlich denen der biologischen Stufe einer Kläranlage (KA) durchgeführt, allerdings ohne Zusatz von organischen C-Quellen oder anderen Nährstoffen, und ergaben folgende Resultate. Neben NPnEO liegt auch das Abbauprodukt NP1EC bereits im Belebungsbecken des LFKW Stuttgart-Büsnau vor. Nach Einbringen des belebten Schlammes aus dem Belebungsbecken in den Batchreaktor setzt sich der Abbau der vorhandenen NPnEO zu NP1EC fort, bis nach spätestens 24 h die NP1EC-Konzentration ein konstantes und über mehrere Tage stabiles Niveau erreicht hat. Die Zugabe von weiterem NPnEO zu diesem Zeitpunkt (d.h. nach 24 h Versuchslaufzeit) lässt die NP1EC-Konzentration wieder ansteigen, bis sich ein neues „*steady state*“-Niveau eingestellt hat. Damit ist NP1EC als ein Hauptmetabolit im NPnEO-Abbau gesichert; zudem ist bewiesen, dass die Biomasse während der Versuchszeit weitgehend intakt bleibt. Vorversuche haben gezeigt, dass die zugegebene NPnEO-Mischung keine NP1EC enthält und dass die NP1EC-Konzentrationsänderungen auch nicht durch Sorptions- bzw. Desorptionsprozesse hervorgerufen werden.

Bei höherer Reaktortemperatur während der Abbauprobe wird das konstante NP1EC-Konzentrationsniveau rascher erreicht und auch mehr NP1EC gebildet. Erhöhte Temperaturen des belebten Schlammes, der zur Befüllung des Batchreaktors verwendet wurde, beschleunigen die Elimination ebenfalls. Kühlung des Batchreaktorinhalts führt erwartungsgemäß zum entgegengesetzten Effekt. Bei der Elimination von NPnEO-Mischungen mit einem größeren Anteil längererkettiger NPnEO steigt die NP1EC-Konzentration langsamer an und erreicht auch nur ein niedrigeres Niveau als bei der Elimination von Mischungen mit kürzerkettigen NPnEO. Die durch Elimination

von zugegebenen NPnEO gebildete Menge an NP1EC entspricht in etwa dem Anteil, der durch Oxidation von in der Mischung enthaltenem NP1EO zu erwarten ist, oder übertrifft diesen leicht. Unter den *aeroben* Bedingungen des Batchversuches ist die Bildung größerer Mengen NP unwahrscheinlich. Auch wenn die starke Sorptionstendenz von NP eine effektive Konzentrationsbestimmung erheblich behinderte, hätte es bei einer signifikanten Metabolisierung der NPnEO zu NP zumindest kurzfristig zu einer deutlichen und messbaren Überschreitung der NP-Bestimmungsgrenze kommen müssen. In der Literatur [81,297,310] ist nennenswerte Bildung von NP beim Abbau von NPnEO nur unter *anaeroben* Bedingungen beschrieben.

Wenn man die Ergebnisse der Batchversuche auf die realen Prozesse in einer KA mit *aerober* biologischer Abwasserreinigung übertragen will, ist außer evtl. starken Temperaturschwankungen und zusätzlichen Nährstoffquellen vor allem die Verweilzeit des Abwassers in der biologischen Stufe zu beachten. Für die Batchversuche mit belebtem Schlamm und Überstandswasser wurden Laufzeiten von bis zu 5 Tagen gewählt; der dem Belebungsbecken entnommene belebte Schlamm war zu Versuchsbeginn naturgemäß bereits mehrere Tage alt. Obwohl die Verweilzeiten im realen Belebungsbecken je nach Abwassermenge und Anlagenführung stark variieren, können folgende Orientierungswerte angenommen werden: Aufenthaltszeit des Abwassers 10 bis maximal 20 h, Aufenthaltszeit des belebten Schlammes durch Rückführung 4-12 d. Da sich NPnEO und NP vor allem am belebten Schlamm anlagern, ist für die Verweilzeit dieser Stoffe im Belebungsbecken wie für die des belebten Schlammes selbst ein Zeitraum von mehreren Tagen anzunehmen; dies ist mit der Aufenthaltszeit bei den beschriebenen Batchversuchen direkt vergleichbar. NPnEO und NP verlassen die KA aufgrund ihrer Lipophilie zu einem signifikanten Anteil über den Schlammweg. Die vergleichsweise gut wasserlöslichen NPnEC sind dagegen vor allem in der wässrigen Phase zu finden und gelangen daher aus dem Belebungsbecken einer KA bereits nach wenigen Stunden in den Vorfluter. Ein Abbau der länger- zu kurzkettigen NPnEC oder gar der kurzkettigen NPnEC in der KA ist bei derart kurzen Verweilzeiten unwahrscheinlich. Im Gewässer selbst sind die Bedingungen für einen Abbau der NPnEC noch deutlich schlechter, da die Mikroorganismendichte wesentlich niedriger ist und auf den Abbau von NPnEC spezialisierte Organismen wenn überhaupt nur in geringerer Anzahl vorhanden sind. Vor allem die kurzkettigen und biologisch wirksameren NPnEC werden daher Tage oder gar Wochen im Gewässer verbleiben und können dort ihr biologisches Potential ausspielen; sie stellen also ein reales ökotoxisches Problem dar.

5 Zusammenfassung

Durch die Entwicklung und Optimierung eines GC-MS-Analyseverfahrens ist es möglich gewesen, ein breites Spektrum strukturell unterschiedlicher Verbindungen in variierenden wässrigen Matrices simultan zu bestimmen. Gemeinsam ist den für das hier beschriebene Screening ausgewählten organischen Spurenstoffen lediglich die estrogenen Wirkung und ihr Vorkommen in der aquatischen Umwelt. Strukturell eindeutig identifiziert und quantifiziert wurden mit dem vorgestellten Verfahren natürliche Estrogene (*Estron*, *17 β -Estradiol*), synthetische Estrogene (*17 α -Ethinylestradiol*, *Mestranol*), Phytoestrogene (*β -Sitosterol*, *Genistein*) und Xenoestrogene (*Benzyl-n-butylphthalat*, *Di-n-butylphthalat*, *Bisphenol A*, *4-Nonylphenol (4-NP)*, *4-Nonylphenoxyessigsäure (4-NP1EC)*, *4-Nonylphenoldiethoxylat (4-NP2EO)*, *α -Endosulfan*). Zur Beprobung wurden 21 Abwässer aus den Abläufen kommunaler wie industrieller Kläranlagen, eine Oberflächengewässerprobe und das Abwasser eines Regenüberlaufbeckens in Baden-Württemberg ausgewählt. Im Laufe des Screenings wurden die Mykoestrogene *Zearalenon* und *α -Zearalenol* sowie als weiteres Xenoestrogen *4-tert-Oktylphenol* in die Analyse einbezogen. So konnte gezeigt werden, dass das Verfahren problemlos zur Bestimmung weiterer organischer Spurenstoffe eingesetzt werden kann. Lediglich bei *Di-n-butylphthalat* war aufgrund der Vielzahl von Kontaminationsquellen keine analytisch korrekte Quantifizierung möglich.

Die GC-MS-analytische Identifizierung und Quantifizierung der Verbindungen schließt sich an eine Filtration, Festphasenextraktion und teilweise Aufreinigung über Kieselgel an und wird nach dem Standardadditions-Verfahren mit Normierung auf substanzspezifische, teilweise stabilisotopen-markierte interne Standards durchgeführt. Dadurch sind eine zweifelsfreie Identifizierung, eine matrixunabhängige Bestimmung und eine „interne Analysenkontrolle“ bei der Quantifizierung gesichert. Bei allen Proben wurde für die Identifizierung und Quantifizierung der Verbindungen ein Signal-zu-Rausch(S/N)-Verhältnis von 3:1 als Nachweisgrenze und ein S/N-Verhältnis von 6:1 als Bestimmungsgrenze definiert. Für die steroidalen Estrogene wurden zusätzlich Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN 32 645 mit einem Vertrauensband von 99 % über das gesamte Verfahren im Abwasser eines Kläranlagenablaufes ermittelt.

Bei der Diskussion der Befunde in Abhängigkeit von geographischer Lage, industriellem Abwasseranteil, Kapazität und technischer Ausstattung der einzelnen Kläranlagen wird ein Zusammenhang nur zwischen der technischen Ausstattung einer

Kläranlage und den Konzentrationen estrogenartig wirksamer Verbindungen erkennbar. Die Ablaufkonzentrationen hormonell wirksamer Verbindungen lagen bei einer reinen Tropfkörperanlage deutlich über dem Durchschnitt; bei zwei Belebungsanlagen mit zusätzlicher Aktivkohlefiltration wurden dagegen äußerst niedrige Ablaufwerte gemessen. Endgültige Aussagen zur Eliminationsleistung der entsprechenden Reinigungsverfahren bzw. -stufen sind jedoch erst nach Einzelstufenbeprobungen und Bilanzierungen an geeigneten Kläranlagen möglich.

Die GC-MS-Analysergebnisse korrelieren bei nahezu allen Abwasserproben aus Kläranlagenabläufen mit den Resultaten eines biologischen Wirkungstests (E-Screen-Assay) zur Ermittlung der estrogenen Gesamtaktivität (W. Körner [260]). Die estrogenen Aktivitäten der Abwasserproben differieren lediglich um den Faktor 2-3 von den Ergebnissen der GC-MS-Analysen der entsprechenden Abwasserproben; ein solcher Toleranzbereich ist für biologische Untersuchungen akzeptabel. Durch diesen Vergleich ist auch gesichert, dass > 90 % der estrogenen Gesamtaktivität in den untersuchten Abwasserproben auf natürliche und synthetische Estrogene, insbesondere 17 β -Estradiol und 17 α -Ethinylestradiol, zurückzuführen sind. Im E-Screen-Assay zeigte sich ebenfalls die bei der GC-MS-Analyse festgestellte Abhängigkeit von der technischen Ausstattung der Kläranlagen. Während in aktivkohlefiltrierten Abwässern aus Kläranlagenabläufen die estrogenen Gesamtaktivitäten sehr gering bis nicht nachweisbar waren, wurden im Ablauf der untersuchten Tropfkörperanlage die höchsten estrogenen Aktivitäten gemessen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Abwasser eines Kläranlagenablaufs nach der Polarität der Spurenstoffe fraktioniert. Die Abwasserprobe wurde dabei in drei Fraktionen geschnitten. Die größte estrogene Aktivität ist, wie aufgrund der Ergebnisse der Screening-Analyse zu erwarten, in der zweiten Fraktion konzentriert, die die natürlichen und synthetischen Estrogene enthält. Die stärker polare erste Fraktion liefert keinen Beitrag zur estrogenen Gesamtaktivität des Abwassers. In der eher lipophilen dritten Fraktion der Abwasserprobe sind etwa 10 % der estrogenen Gesamtaktivität konzentriert, verursacht größtenteils durch Xenoestrogene. Auch für die einzelnen Fraktionen waren die Ergebnisse von E-Screen-Assay und GC-MS-Analyse vergleichbar. Wegen der höheren log P_{OW} -Werte der in der dritten Fraktion enthaltenen Verbindungen ist das ökotoxische Potential dieser Fraktion trotz der geringeren estrogenen Aktivität nicht zu vernachlässigen; insbesondere sind Langzeiteffekte durch Bioakkumulation einzelner Verbindungen aus dieser Fraktion zu beachten.

Im dritten Teil der Arbeit wird das Eliminationsverhalten hormonell wirkender Verbindungen am Beispiel der Nonylphenolpolyethoxylate (NPnEO) untersucht. Die Eliminationsversuche wurden in einem Batchreaktor ausgeführt, der mit belebtem Schlamm und Überstandswasser aus dem Belebungsbecken des Lehr- und Forschungsklärwerks (LFKW) Stuttgart-Büsnau befüllt war, und mit Hilfe von HPLC-MS/MS analysiert (A. Link [313]). Dabei konnte nur die Bildung von NP1EC als Metabolit der NPnEO in Abhängigkeit von Temperatur und Zusammensetzung der zugegebenen NPnEO-Mischung verfolgt werden. Es gelang nicht, Messbedingungen für das HPLC-MS/MS-System zu finden, die eine Quantifizierung der NPnEO selbst sowie des stark hydrophoben und zur Sorption neigenden Eliminationsproduktes NP erlaubt hätten.

Die nichtionischen Tenside (NPnEO) sind ebenso wie das Abbauprodukt NP1EC grundsätzlich im Belebungsbecken des LFKW Stuttgart-Büsnau vorhanden. Der Abbau dieser bereits vorhandenen NPnEO-Konzentration zu NP1EC erreicht spätestens 24 h nach Versuchsbeginn einen „*steady state*“. Nach Zugabe von weiterem NPnEO kommt es zu einem erneuten Anstieg der NP1EC-Konzentration bis auf ein neues, höheres Konzentrationsplateau. Die Biomasse bleibt während der Laufzeit der Versuche weitgehend intakt; die NP1EC-Konzentrationsänderungen werden auch nicht durch Sorptionprozesse hervorgerufen. Bei Temperaturerniedrigung im Batchreaktor verlangsamt sich die Entstehung der NP1EC und erreicht auch nur eine niedrigere „*steady state*“-Konzentration. Die durch Elimination von zugesetzten NPnEO-Mischungen gebildete NP1EC entspricht in etwa dem Anteil, der durch Oxidation von in der Mischung enthaltenem NP1EO zu erwarten ist. Dies bestätigt die Hypothese, dass NP1EC überwiegend direkt durch Oxidation aus NP1EO gebildet wird [309]. Signifikante Metabolisierung von NPnEO zu NP wurde unter den *aeroben* Bedingungen der Batchversuche nicht beobachtet.

Neben der Temperaturabhängigkeit der Abbaurate und dem eventuellen Angebot zusätzlicher Nährstoffquellen ist insbesondere die Verweilzeit des Abwassers in der biologischen Stufe einer Kläranlage entscheidend. Die Aufenthaltszeit des belebten Schlammes beträgt bei Rückführung 4-12 Tage, die des Abwassers 10 bis maximal 20 Stunden. NPnEO und NP verlassen die Kläranlage zu einem signifikanten Anteil über den Schlammfad, die gebildeten Nonylphenolpolyethoxycarbonsäuren (NPnEC) wegen ihrer vergleichsweise guten Wasserlöslichkeit dagegen hauptsächlich über die wässrige Phase. Ein Abbau der länger- zu kurzkettigen NPnEC oder NPnEO oder gar ein Abbau der kurzkettigen NPnEC in der Kläranlage ist bei derart kurzen Aufent-

haltszeiten nur in sehr geringem Umfang möglich, wie Batchversuche mit Versuchslaufzeiten von bis zu 5 Tagen gezeigt haben. Für einen Abbau der NPnEC im Gewässer sind die Voraussetzungen nochmals deutlich ungünstiger. Daher ist eine Persistenz vor allem der kurzkettigen und hormonell erheblich aktiveren NPnEC im aquatischen Milieu über viele Tage oder gar Wochen anzunehmen.

6 Summary

A GC-MS-based analytical procedure was developed and optimized which allows simultaneous determination of a broad spectrum of organic compounds in varying aqueous matrices. Analytes with widely divergent structures were selected for the screening protocol, all of which are estrogenically active, though, and are actually found in aquatic environments. The protocol allows both the unequivocal structural identification and quantification of the following compounds: the natural estrogens *estrone* and *17 β -estradiol*, the synthetic estrogens *17 α -ethinylestradiol* and *mestranol*, the phytoestrogens *β -sitosterol* and *genistein*, and the xenoestrogens *benzyl butyl phthalate*, *dibutyl phthalate*, *bisphenol A*, *4-nonylphenol (4-NP)*, *4-nonylphenoxy acetic acid (4-NP1EC)*, *4-nonylphenol diethoxylate (4-NP2EO)*, and *α -endosulfan*. The waste water samples were taken from the effluent of 21 municipal and industrial sewage plants in Baden-Württemberg; additionally, one surface water sample and one waste water sample from a storm retention basin were analyzed. During the development of the screening protocol, the mycoestrogens *zearalenone* and *α -zearalenol* and one additional xenoestrogen, *4-tert-octylphenol*, were included in the analysis. It could be demonstrated, thus, that the procedure may be extended, in a straightforward manner, to additional organic trace compounds. Only in the case of dibutyl phthalate, the manifold sources of contamination thwarted an analytically correct quantification.

The analytical sequence comprises filtration, solid-phase extraction, and sometimes clean-up with silica gel cartridges. The individual analytes then are identified and quantified by GC-MS with the standard-addition procedure; the response for each analyte is normalized *via* compound-specific, in part stable-isotope-labelled internal standards. This procedure ensures an unequivocal identification as well as a matrix-independent determination, and at the same time constitutes an internal control for the quantification. For all samples, a signal-to-noise (S/N) ratio of 3:1 is defined as limit of detection (LOD), and a S/N of 6:1 as limit of quantification. For the steroidal estrogens, LOD and LOQ in the waste water of a sewage plant effluent were also calculated according to the German standard DIN 32645, with a 99 % confidence interval over the complete analytical procedure.

The results for the individual sewage treatment plants (STP) are discussed in terms of geographical location, the percentage of industrial waste water, and the technical

equipment. A significant correlation with the concentration of estrogenically active compounds in the effluent is apparent only for the technical equipment standard. For an STP working with a trickling filter for biological treatment, effluent concentrations of hormonally active compounds were significantly above the average of all other STP effluents; in the case of two STPs, comprising an activated sludge process and an additional activated charcoal filtration, this level was far below the average. Definite statements, though, on the elimination efficiency of the respective waste water treatment steps will be feasible only after single-step sampling and mass balancing for suitable STPs.

For almost all waste water samples from STP effluents, the GC-MS results are consistent with the total estrogenic activity determined with a biological test system (W. Körner [260]). The estrogenic activities differ at most by a factor of 2-3 between the two methods; with a biological test, this tolerance is acceptable. The good agreement between GC-MS-derived concentrations and biological activity proves that > 90 % of the total estrogenic activity of the waste water samples is in fact due to natural and synthetic estrogens, mainly 17β -estradiol and 17α -ethinylestradiol. The E-screen assay displayed the same dependence on the technical STP equipment standard noted on the basis of the GC-MS results. For charcoal-filtered waste water from STP effluents, the total estrogenic activity was negligible or even below the detection limit; the effluent from the trickling filter plant, on the other hand, displayed the highest estrogenic activity.

In the second part of this work, the waste water from a sewage plant effluent was fractionated according to the polarity of the trace compounds, and the sample cut into three fractions. As expected from the results of the screening analysis, most of the estrogenic activity is concentrated in the second fraction, containing the natural and synthetic estrogens. The more polar first fraction does not contribute at all to the total estrogenic activity. In the more lipophilic third fraction of the waste water sample, ca. 10 % of the activity are concentrated, due principally to xenoestrogens. The results of E-screen assay and GC-MS analysis were once again comparable, individually, for the three single fractions. Despite its lower estrogenic activity, the oecotoxic potential of the third fraction cannot be considered as negligible since its components have higher $\log P_{ow}$ values; long-term effects due to bioaccumulation of specific compounds from this fraction must definitely be considered.

In a third part of this work, the elimination behaviour of hormonally active compounds was studied exemplarily for the nonylphenol ethoxylates (NPnEO). The elimination experiments were carried out in a batch reactor, filled with activated sludge and supernatant water from the aeration tank of the research sewage plant (LFKW) of the University of Stuttgart at Stuttgart-Büsnau, and monitored by HPLC-MS/MS (A. Link [313]). Formation of the NPnEO metabolite nonylphenoxy acetic acid (NP1EC) was followed, depending on the reactor temperature and the composition of the technical NPnEO mixture added. No experimental conditions for the HPLC-MS/MS system could be found which would allow quantification of either the original NPnEO or of their highly hydrophobic and adsorption-prone elimination product nonylphenol (NP).

Both the non-ionic surfactants NPnEO and their degradation product NP1EC are present in the aeration tank of the LFKW Stuttgart-Büsnau. Degradation of this original NPnEO concentration to NP1EC reaches a steady state 24 h after the start of the experiment. When additional NPnEO is added, the NP1EC concentration rises once again until a new, higher saturation level is reached. Over the time of the experiment, the biomass stays more or less intact; the change in the NP1EC concentration cannot be due to sorption processes. When the temperature in the batch reactor is lowered, NP1EC formation is retarded, and the final steady state concentration is lower. The NP1EC formed by degradation of the NPnEO added with the surfactant mixture corresponds with what is expected from the oxidation of the nonylphenol monoethoxylate (NP1EO) contained in the technical mixture. This confirms the hypothesis that NP1EC is formed primarily directly from NP1EO by oxidation. Under the aerobic experimental conditions in the batch reactor, no significant metabolization of NPnEO to NP is observed.

Apart from the temperature dependence of the degradation rate and additional nutrient sources, the detention period of the waste water in the biological stage of the STP is decisive for the degradation. With return flow, the retention time of the activated sludge is 4 to 12 days, for the waste water, at most 10 to 20 hours. Both the NPnEO and the NP leave the STP primarily via the sewage sludge; because of their comparatively high water solubility, the nonylphenol polyethoxy carboxylic acids (NPnEC), formed by oxidation of the corresponding NPnEO, are eliminated mainly via the STP effluent. Degradation of longer- to shorter-chain NPnEC or NPnEO or, even more, degradation of short-chain NPnEC in the short detention period in the STP can be considered as negligible as batch reactor experiments running up to five days have shown. In surface

water, conditions for NPnEC degradation are even more unfavourable. Thus, persistence of the hormonally more active short-chain NPnEC in the aquatic environment must be considered in terms of many days or even weeks.

7 Literatur

- [1] Colborn T, Dumanoski T, Myers JP. 1996. *Die bedrohte Zukunft: gefährden wir unsere Fruchtbarkeit und Überlebensfähigkeit?* Droemer Knaur, München.
- [2] Fry DM. 1995. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environ Health Perspect* 103: 165-171.
- [3] Guillette LJJ, Gross TS, Mason GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR. 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.
- [4] Guillette LJJ, Pickford DB, Crain DA, Rooney AA, Percival HF. 1996. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *Gen Comp Endocrinol* 101: 32-42.
- [5] Guillette LJJ, Crain DA, Rooney AA, Pickford DB. 1995. Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ Health Perspect* 103 (Suppl 7): 157-164.
- [6] Tyler CR, Jobling S, Sumpter JP. 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit Rev Toxicol* 28: 319-361.
- [7] Jensen S, Kihlström JE, Olsson M, Lundberg C, Örberg J. 1977. Effects of PCB and DDT on mink (*Mustela Vison*) during the reproductive season. *Ambio* 6: 239.
- [8] Cassidy A, Bingham S, Setchell K. 1995. Biological effects of isoflavones in young woman: importance of the chemical composition of soybean products. *Br J Nutr* 74: 587-601.
- [9] Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* 8: 275-285.
- [10] Sumpter JP. 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicol Lett* 82/83: 737-742.
- [11] Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty GC, Sumpter JP. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ Sci Technol* 32: 2498-2506.
- [12] Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluents. 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. *Environ Sci Technol* 32: 1549-1558.
- [13] Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M, Sumpter JP. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluents. 2. *In vivo* responses in trout and roach. *Environ Sci Technol* 32: 1559-1565.
- [14] Munkittrick KR, Portt CB, Van der Kraak GJ, Smith IR, Rokosh DA. 1991. Impact of bleached craft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity and serum

- steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus Commersoni*) population. *Can J Fish Aquat Sci* 48: 1371-1380.
- [15] McMaster ME, Van der Kraak GJ, Portt CB, Munkittrick KR, Sibley PK, Smith IR, Dixon DG. 1991. Changes in hepatic mixed-function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker (*Catostomus Commersoni*) population exposed to bleached craft pulp mill effluent. *Aquat Toxicol* 21: 199-218.
- [16] Parkin DM, Läärä E, Muir CS. 1988. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer* 41: 184-197.
- [17] Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J, Powell J. 1992. *Cancer incidence in five continents*, Vol VI IARC Sci Publ No 120. IARC, Lyon, France.
- [18] Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101: 378-384.
- [19] Carlsen B, Giwerman A, Keiding N, Skakkebaek NE. 1992. Evidence for decreasing quality of semen during the past 50 years. *Br Med J* 305: 609-613.
- [20] Sharpe RM, Skakkebaek NE. 1993. Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract. *Lancet* 341: 1392-1395.
- [21] Jensen TK, Toppari J, Keiding N, Skakkebaek NE. 1995. Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? *Clin Chem* 41: 1896-1901.
- [22] EU-Kommision DG XII, European Environmental Agency, European Center for Environmental Health (WHO). 1996. European Workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife. Weybridge, UK, zitiert in [93].
- [23] Harries JE, Sheahan DA, Jobling S, Matthiessen P, Neall P, Sumpter JP, Tylor T, Zaman N. 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ Toxicol Chem* 16: 534-542.
- [24] Knudsen FR, Schou AE, Wiborg ML, Mona E, Tollefsen KE, Stenersen J, Sumpter JP. 1997. Increase of plasma vitellogenin concentration in rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) exposed to effluents from oil refinery treatment works and municipal sewage. *Bull Environ Contam Toxicol* 59: 802-806.
- [25] Hylland K, Haux C. 1997. Effects of environmental estrogens on marine fish species. *Trends Anal Chem* 16: 606-612.
- [26] Rivas A, Olea N, Olea-Serrano F. 1997. Human exposure to endocrine-disrupting chemicals: assessing the total estrogenic xenobiotic burden. *Trends Anal Chem* 16: 613-619.
- [27] Gagné F, Blaise C. 1998. Estrogenic properties of municipal and industrial wastewaters evaluated with a rapid and sensitive chemoluminescent in situ hybridization assay (CISH) in rainbow trout hepatocytes. *Aquat Toxicol* 44: 83-91.

- [28] Wahli T, Meier W, Segner H, Burkhardt-Holm P. 1998. Immunohistochemical detection of vitellogenin in male brown trout from Swiss rivers. *Histochem J* 30: 753-758.
- [29] Gagné F, Pardos M, Blaise C. 1999. Estrogenic effects of organic environmental extracts with the trout hepatocyte vitellogenin assay. *Bull Environ Contam Toxicol* 62: 723-730.
- [30] Hansen PD, Dizer H, Hock B, Marx A, Sherry J, McMaster M, Blaise C. 1998. Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. *Trends Anal Chem* 17: 448-451.
- [31] Körner W, Bolz U, Süßmuth W, Hiller G, Hanf V, Hagenmaier H. 1998. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Organohalogen Compd* 37: 269-272.
- [32] Gibbons WN, Munkittrick KR, McMaster ME, Taylor WD. 1998. Monitoring aquatic environments receiving industrial effluents using small fish species: 2. Comparison between responses of trout-perch (*Percopsis Omiscomaycus*) and white sucker (*Catostomus Commersoni*) downstream of a pulp mill. *Environ Toxicol Chem* 17: 2238-2245.
- [33] Hutchinson TH, Pounds NA, Hampel M, Williams TD. 1999. Impact of natural and synthetic steroids on the survival, development and reproduction of marine copepods (*Tisbe Battagliai*). *Sci Total Environ* 233: 167-179.
- [34] Nichols KM, Miles-Richardson SR, Snyder EM, Giesy JP: Effects of exposure to municipal wastewater in situ on the reproductive physiology of the fathead minnow (*Pimephales Promelas*). *Environ Toxicol Chem* 18: 2001-2012.
- [35] Papoulias DM, Noltie DB, Tillitt DE. 1999. An *in vivo* model fish system to test chemical effects on sexual differentiation and development: exposure to ethinylestradiol. *Aquat Toxicol* 48: 37-50.
- [36] Brown RJ, Conradi M, Depledge MH. 1999. Long-term exposure to 4-nonylphenol affects sexual differentiation and growth of the amphipod *Corophium Volutator* (Pallas, 1766). *Sci Total Environ* 233: 77-88.
- [37] Christensen LJ, Korsgaard B, Bjerregaard P. 1999. The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys Flesus*. *Aquat Toxicol* 46: 211-219.
- [38] Lehtinen KL, Mattsson K, Tana J, Engstrom C, Lerche O, Hemming J. 1999. Effects of wood-related sterols on the reproduction, egg survival, and offspring of brown trout (*Salmo Trutta Lacustris L.*). *Environ Res, Section B* 42: 40-49.
- [39] Arukwe A, Grotmol T, Haugen TB, Knudsen FR, Goksøyr A. 1999. Fish model for assessing the *in vivo* estrogenic potency of the mycotoxin zearalenone and its metabolites. *Sci Total Environ* 236: 153-161.
- [40] Tanghe T, Devriese G, Verstraete W. 1999. Nonylphenol and estrogenic activity in aquatic environmental samples. *J Environ Qual* 28: 702-709.

- [41] Körner W, Hanf V, Schuller W, Kempter C, Metzger JW, Hagenmaier H. 1999. Development of a sensitive E-screen for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Sci Total Environ* 225: 33-48.
- [42] Monteverdi GH, Di Giulio RT. 1999. An enzyme-linked immunosorbent assay for estrogenicity using primary hepatocyte cultures from the channel catfish (*Ictalurus Punctatus*). *Arch Environ Contam Toxicol* 37: 62-69.
- [43] Harries JE, Janbakhsh A, Jobling S, Matthiessen P, Sumpter JP, Tyler CR. 1999. Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom. *Environ Toxicol Chem* 18: 932-937.
- [44] Rehmann K, Schramm KW, Kettrup AA. 1999. Applicability of a yeast estrogen screen for the detection of estrogen-like activities in environmental samples. *Chemosphere* 38: 3303-3312.
- [45] Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales Promelas*). *Aquat Toxicol* 47: 129-145.
- [46] Ashfield LA, Pottinger TG, Sumpter JP. 1998. Exposure of female juvenile rainbow trout to alkylphenolic compounds results in modifications to growth and ovosomatic index. *Environ Toxicol Chem* 17: 679-686.
- [47] Baker VA, Hepburn PA, Kennedy SJ, Jones PA, Lea LJ, Sumpter JP, Ashby J. 1999. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 1: Assessment of estrogenicity using a combination of *in vivo* and *in vitro* assays. *Food Chem Toxicol* 37: 13-22.
- [48] Graumann K, Breithofer A, Jungbauer A. 1999. Monitoring of estrogen mimics by a recombinant yeast assay: synergy between natural and synthetic compounds? *Sci Total Environ* 225: 69-79.
- [49] Folmar LC, Hemmer M, Hemmer R, Bowman C, Kroll K, Denslow ND. 2000. Comparative estrogenicity of estradiol, ethynylestradiol and diethylstilbestrol in an *in vivo*, male sheepshead minnow (*Cyprinodon Variegatus*), vitellogenin bioassay. *Aquat Toxicol* 49: 77-88.
- [50] Kinnberg K, Korsgaard B, Bjerregaard P, Jespersen A. 2000. Effects of nonylphenol and 17beta-estradiol on vitellogenin synthesis and tests morphology in male platyfish *Xiphophorus Maculatus*. *J Exp Biol* 203: 171-181.
- [51] Arukwe A, Thibaut R, Ingebrigtsen K, Celius T, Goksøyr A, Cravedi JP. 1999. *In vivo* and *in vitro* metabolism and organ distribution of nonylphenol in atlantic salmon. *Aquat Toxicol* 49: 289-304.
- [52] Panter GH, Thompson RS, Sumpter JP. 2000. Intermittent exposure of fish to estradiol. *Environ Sci Technol* 34: 2756-2760.

- [53] Rodgers-Gray TP, Jobling S, Morris S, Kelly C, Kirby S, Janbakhsh A, Harries JE, Waldock MJ, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Long-term changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. *Environ Sci Technol* 34: 1521-1528.
- [54] White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135: 175-182.
- [55] Arcand-Hoy LD, Nimrod AC, Benson WH. 1998. Endocrine-modulating substances in the environment: estrogenic effects of pharmaceutical products. *Int J Toxicol* 17: 139-158.
- [56] Taylor MR, Harrison PTC. 1999. Ecological effects of endocrine disruption: current evidence and research priorities. *Chemosphere* 39: 1237-1248.
- [57] Sonnenschein C, Soto AM. 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65: 143-150.
- [58] Bjerregaard P, Korsgaard B, Christiansen LB, Pedersen KL, Christensen LJ, Pedersen SN, Horn P. 1998. Monitoring and risk assessment for endocrine disruptors in the aquatic environment: a biomarkers approach. *Arch Toxicol, Suppl* 20: 97-107.
- [59] Sumpter JP. 1998. Xenoendocrine disrupters - environmental impacts. *Toxicol Lett* 102/103: 337-342.
- [60] Jobling S, Reynolds T, White R, Parker M, Sumpter JP. 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect* 103: 582-587.
- [61] Lindholst C, Pedersen KL, Pedersen SN. 2000. Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Aquat Toxicol* 48: 87-94.
- [62] Servos MR. 1999. Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Water Qual Res J Can* 34: 123-177.
- [63] MacLatchy D, Peters L, Nickle J, van der Kraak G. 1997. Exposure to beta-sitosterol alters the endocrine status of goldfish differently than 17beta-estradiol. *Environ Toxicol Chem* 16: 1895-1904.
- [64] Tremblay L, van der Kraak G. 1999. Comparison between the effects of the phytosterol beta-sitosterol and pulp and paper mill effluents on sexually immature rainbow trout. *Environ Toxicol Chem* 18: 329-336.
- [65] Hock B, Seifert M. 1998. Monitoring-Strategien für östrogene Wirkstoffe. *Bioforum* 11: 690-696.
- [66] Bruhn T, Gülden M, Ludewig S, Seibert H. 1999. Einstufung von Schadstoffen als endokrin wirksame Substanzen. UBA-Text 65/99. Forschungsbericht 297 61 001/08. Umweltbundesamt, Berlin.

- [67] Koolmann J, Röhm KH. 1994. *Taschenatlas der Biochemie*. Thieme, Stuttgart.
- [68] Stryer L. 1978. *Biochemie*. Vieweg, Braunschweig.
- [69] Bätischer R, Studer C, Fent K. 1999. Stoffe mit endokriner Wirkung in der Umwelt. Schriftenreihe Umwelt Nr 308. Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz (EAWAG) und Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL), Bern, Schweiz.
- [70] Henderson BE, Ross RK, Pike MC. 1991. Towards the primary prevention of cancer. *Science* 254: 1131-1138.
- [71] Fent K. 2000. Hormonaktive Stoffe in Gewässern: Auch eine Gefahr fürs Trinkwasser? *Mitt Lebensmittelunters Hyg* 91: 11-25.
- [72] Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR. 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36: 2149-2173.
- [73] Billinghamurst Z, Clare AS, Fileman T, McEvoy J, Readman J, Depledge MH. 1998. Inhibition of barnacle settlement by the environmental estrogen 4-nonylphenol and the natural estrogen 17beta-estradiol. *Mar Pollut Bull* 36: 833-839.
- [74] Körner W, Bolz U, Süßmuth W, Hiller G, Schuller W, Hanf V, Hagenmaier H. 2000. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere* 40: 1131-1142.
- [75] Thiele B, Günther K, Schwuger MJ. 1997. Alkylphenol ethoxylates: trace analysis and environmental behaviour. *Chem Rev* 97: 3247-3272.
- [76] Tyler CR, Routledge EJ. 1998. Natural and anthropogenic environmental estrogens: the scientific basis for risk assessment. Estrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure Appl Chem* 70: 1795-1804.
- [77] Coldham NG, Sivapathasundaram S, Dave M, Ashfield LA, Pottinger TG, Goodall C, Sauer MJ. 1998. Biotransformation, tissue distribution, and persistence of 4-nonylphenol residues in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Drug Metab Dispos* 26: 347-354.
- [78] McLeese DW, Zitko V, Sergeant DB, Burrige L, Metcalfe CD. 1981. Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. *Chemosphere* 10: 723-730.
- [79] Antonious GF, Byers ME. 1997. Fate and movement of endosulfan under field conditions. *Environ Toxicol Chem* 16: 644-649.
- [80] Maki H, Fujita M, Fujiwara Y. 1996. Identification of final biodegradation product of nonylphenol ethoxylate (NPE) by river microbial consortia. *Bull Environ Contam Toxicol* 57: 881-887.
- [81] Tschui M, Brunner PH. 1985. The formation of 4-nonylphenol from 4-nonylphenol-mono- and -diethoxylate during anaerobic sludge digestion. *Vom Wasser* 65: 9-19.

- [82] John DM, White GF. 1998. Mechanism for biotransformation of nonylphenol polyethoxylates to xenoestrogens in *Pseudomonas Putida*. *J Bacteriol* 180: 4332-4338.
- [83] Manzano MA, Perales JA, Sales D, Quiroga JM. 1999. The effect of temperature on the biodegradation of a nonylphenol polyethoxylate in river water. *Water Res* 33: 2593-2600.
- [84] Staples CA, Williams JB, Blessing RL, Varineau PT. 1999. Measuring the biodegradability of nonylphenol ether carboxylates, octylphenol ether carboxylates, and nonylphenol. *Chemosphere* 38: 2029-2039.
- [85] Topp E, Starrat A. 2000. Rapid mineralization of the endocrine-disrupting chemical 4-nonylphenol in soil. *Environ Toxicol Chem* 19: 313-318.
- [86] Ternes TA, Kreckel P, Mueller J. 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. *Aerobic* batch experiments with activated sludge. *Sci Total Environ* 225: 91-99.
- [87] Wegener G, Persin J, Karrenbrock F, Rörden O, Hübner I. 1999. Presence and behaviour of natural and synthetic estrogens and their conjugates in the aquatic environment. *Vom Wasser* 92: 347-360.
- [88] Markey CM, Luque E, Munoz de Toro M, Sonnenschein C, Soto AM. 2000. Proliferative effects of in utero exposure to bisphenol A on mammary gland development. *Poster presentation, Gordon Research Conference on Environmental Endocrine Disruptors, Plymouth, NH, USA, July 2000.*
- [89] Stumpf M, Ternes TA, Haberer K, Baumann W. 1996. Determination of natural and synthetic estrogens in sewage plants and river water. *Vom Wasser* 87: 251-261.
- [90] Kempter C, Jenkins E, Merz W, Metzger JW. 1998. Untersuchungen zum Eintrag, Verhalten und Verbleib von Sexualhormonen im Abwasser und Klärschlamm. Abschlussbericht. Ministerium für Umwelt und Verkehr Baden-Württemberg, Stuttgart.
- [91] Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M. 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Total Environ* 225: 81-90.
- [92] Guengerich FP. 1990. Minireview – Metabolism of 17 α -Ethinylestradiol in humans. *Life Sci* 47: 1981-1988.
- [93] Kuch H, Ballschmiter K. 1999. Hormonell wirksame Verbindungen in der Umwelt Baden-Württembergs. Arbeitsbericht Nr 151. Akademie für Technikfolgenabschätzung in Baden-Württemberg, Stuttgart.
- [94] Gülden M, Turan A, Seibert H. 1998. Endocrinally active chemicals and their occurrence in surface waters. UBA-Text 66/98. Research report 102 04 279. Federal Environmental Agency, Berlin.

- [95] Soto AM, Chung KL, Sonnenschein C. 1994. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ Health Perspect* 102: 380-383.
- [96] Soto AM, Lin TM, Justicia H, Silvia RM, Sonnenschein C. 1992. An „in culture“ bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics. In Colborn T, Clement C, eds, *Chemically induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/ human connection*. Princeton Scientific Publishing, Princeton, NJ, USA, pp 295-309.
- [97] Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Olea-Serrano MF. 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 103: 113-122.
- [98] Eroschenko VP, Palmiter RD. 1980. Estrogenicity of kepone in birds and mammals. In McLachlan JA, ed, *Estrogens in the Environment*. Elsevier, NY, USA, pp 305-325.
- [99] Fürhacker M, Scharf S, Weber H. 2000. Bisphenol A: emission from point sources. *Chemosphere* 41: 751-756.
- [100] Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. 1995. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect* 103: 608-612.
- [101] Olea N, Pulgar R, Pérez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novello-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. 1996. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 104: 298-305.
- [102] Reid EE, Wilson E. 1944. *J Am Chem Soc* 66: 967, zitiert in [93].
- [103] Dodds EC, Lawson W. 1936. *Nature* 137: 996, zitiert in [93].
- [104] Dodds EC, Goldberg L, Lawson W, Robinson R. 1938. *Nature* 141: 247, zitiert in [93].
- [105] Dodds EC, Goldberg L, Lawson W, Robinson R. 1939. Part I. *Proc Roy Soc B* 127: 140, zitiert in [93].
- [106] Bitman J, Cecil HC. 1970. *J Agric Food Chem* 18: 1108, zitiert in [93].
- [107] Bindal RD, Katzenellenbogen JA. 1998. *J Med Chem* 31: 1978, zitiert in [93].
- [108] Cook JW, Dodds EC, Hewett CL, Lawson W. 1934. *Proc Roy Soc B* 114: 272, zitiert in [93].
- [109] Schneider SL, Alks V, Morreal CE, Sinha DK, Dao TL. 1976. *J Natl Cancer Inst* 57: 1351, zitiert in [93].
- [110] Mueller GC, Kim UH. 1978. *Endocrinology* 102: 1429, zitiert in [93].
- [111] Meyers C, Kolb VM, Gass GH, Rao BR, Ross CF. 1998. *J Steroid Biochem* 31: 393, zitiert in [93].
- [112] Coldham NG, Dave M, Sivapathasundaram S, McDonnell DP, Conner C, Sauer MJ. 1997. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environ Health Perspect* 105: 734-742.

- [113] Soto AM, Fernandez MF, Guizzi MF, Oles-Karasko AS, Sonnenschein C. 1997. Developing a marker of exposure to xenoestrogen mixtures in human serum. *Environ Health Perspect* 105 (Suppl 3): 647-654.
- [114] Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP. 1997. The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ Health Perspect* 105: 802-811.
- [115] Sonnenschein C, Soto AM, Fernandez MF, Olea MF, Olea-Serrano MF, Ruiz-Lopez MD. 1995. *Clin Chem* 41: 1888, zitiert in [69].
- [116] Field JA, Reed RL. 1996. Nonylphenol polyethoxy carboxylate metabolites of nonionic surfactants in U.S. paper mill effluents, municipal sewage treatment plant effluents, and river waters. *Environ Sci Technol* 30: 3544-3550.
- [117] Verdeal K, Brown RR, Richardson T, Ryan DS. 1980. *J Natl Cancer Inst* 64: 285, zitiert in [93].
- [118] Wilcox ML, Wahlqvist ML, Burger HG, Medley G. 1996. *Br Med J* 301: 905, zitiert in [93].
- [119] Mellanen P, Petanen T, Lehtimäki J, Mäkelä S, Bylund G, Holmbom B, Mannila E, Oikari A, 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.
- [120] MacLachy D, van der Kraak G. 1995. The phytoestrogen β -sitosterol alters the reproductive endocrine status of goldfish. *Toxicol Appl Pharmacol* 134: 305-312.
- [121] Karlson P. 1984. *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Thieme, Stuttgart.
- [122] Ozers MS, Hill JJ, Ervin K, Wood JR, Nardulli AM, Royer CA, Gorski J. 1997. Equilibrium binding of estrogen receptor with DNA using fluorescence anisotropy. *J Biol Chem* 272: 30405-30411.
- [123] Brzozowski AM, Pike ACW, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, Öhman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M. 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389: 753-758.
- [124] Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138: 863-870.
- [125] Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. 1996. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93: 5925, zitiert in [124].
- [126] Mosselman S, Polman J, Dijkema R. 1996. ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392: 49-53.
- [127] Delaunay F, Petterson K, Tujague M, Gustafsson JA. 2000. Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptor α and β . *Mol Pharmacol* 58: 584-590.

- [128] Schultis T. 2000. Rezeptorbindungsstudien von Östrogenen und östrogenartig wirkenden Substanzen in Umweltproben mittels Fluoreszenzpolarimetrie. Diplomarbeit. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- [129] Allen E, Doisy EA. 1923. *J Am Med Assoc* 81: 819, zitiert in [94].
- [130] Cook JW, Dodds EC. 1933. *Nature* 131: 205, zitiert in [93].
- [131] Bülbring E, Burn JH. 1935. *J Physiol* 85: 320, zitiert in [94].
- [132] Gellert RJ, Heinrichs WL, Swerdloff R. 1974. *Neuroendocrinology* 16: 84, zitiert in [94].
- [133] Gellert RJ. 1978. *Environ Res* 16: 131, zitiert in [94].
- [134] Dorfman RI, Dorfman AS. 1953. *Endocrinology* 53: 301, zitiert in [94].
- [135] Bitman J, Cecil HC, Harris SJ, Fries GF. 1968. *Science* 162: 371, zitiert in [94].
- [136] Fry DM, Toone CK. 1981. *Science* 213: 922, zitiert in [94].
- [137] Wibbels T, Crews D. 1992. *J Endocrinol* 133: 121, zitiert in [94].
- [138] Bergeron JM, Crews D, McLachlan JA. 1994. *Environ Health Perspect* 102: 780, zitiert in [94].
- [139] Stifani S, George R, Schneider WJ. 1988. Solubilization and characterization of the chicken oocyte vitellogenin receptor. *Biochem J* 250: 467-475.
- [140] Falbe J, Regitz M. 1995. Römpp Chemie Lexikon. Thieme, publ, Stuttgart.
- [141] Hock B, Rothe S, Seifert M. 2000. Hormone in der Umwelt - die Tests im Überblick. *Nachr Chem* 48: 918-924.
- [142] Nelson JA. 1974. *Biochem Pharmacol* 23: 447, zitiert in [94].
- [143] Mueller GC, Kim UH. 1978. *Endocrinology* 102: 1429, zitiert in [94].
- [144] Korach KS, Sarver P, Chae K, McLachlan JA, McKinney JD. 1988. *Mol Pharmacol* 33: 120, zitiert in [94].
- [145] Thomas P, Smith J. 1993. *Mar Environ Res* 35: 147, zitiert in [94].
- [146] Krishnan V, Safe S. 1993. *Toxicol Appl Pharmacol* 120: 55, zitiert in [94].
- [147] Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. 1991. *Environ Health Perspect* 92: 167, zitiert in [94].
- [148] Jobling S, Sumpter JP. 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic to fish: an *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Aquat Toxicol* 27: 661-672.
- [149] Oosterkamp AJ, Hock B, Seifert M, Irth H. 1997. Novel monitoring strategies for xenoestrogens. *Trends Anal Chem* 16: 544-553.
- [150] Brenner-Weiß G, Nusser M, Obst U, Seifert M, Haindl S, Hock B. 1999. Wirkungsbezogene Analytik am Beispiel der Östrogene. *GewWAbw* 172: 44/1-44/3.
- [151] Cheskis BJ, Karathanasis S, Lyttle CR. 1997. *J Biol Chem* 272: 11384, zitiert in [65].
- [152] Checovich WJ, Bolger RE, Burke T. 1995. Fluorescence polarization – a new tool for cell and molecular biology. *Nature* 375: 254-256.

- [153] Bolger RE, Wiese TE, Ervin K, Nestich S, Checovich WJ. 1998. Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ Health Perspect* 106: 551-557.
- [154] Stephanou E, Giger W. 1982. Persistent organic chemicals in sewage effluents. 2. Quantitative determinations of nonylphenols and nonylphenol ethoxylates by glass capillary gas chromatography. *Environ Sci Technol* 16: 800-805.
- [155] Ahel M, Giger W. 1985. Determination of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in environmental samples by high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* 57: 1577-1583.
- [156] Ahel M, Giger W, Schaffner C. 1994. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment – II. Occurrence and transformation in rivers. *Water Res* 28: 1143-1152.
- [157] Ahel M, Giger W, Koch M. 1994. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment – I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res* 28: 1131-1142.
- [158] Bennie DT, Sullivan CA, Lee HB, Peart TE, Maguire RJ. 1997. Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St Lawrence River. *Sci Total Environ* 193: 263-275.
- [159] Lee HB, Peart TE. 1998. Determination of 17beta-estradiol and its metabolites in sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Int* 81: 1209-1216.
- [160] Snyder SA, Keith TL, Verbrugge DA, Snyder EM, Gross TS, Kannan K, Giesy JP. 1999. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environ Sci Technol* 33: 2814-2820.
- [161] Belfroid AC, van der Horst A, Vethhak AD, Schäfer AJ, Rijs GBJ, Wegener J, Cofino WP. 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Sci Total Environ* 225: 101-108.
- [162] Kuch HM, Ballschmitter K. 2000. Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng / L-level. *Fresenius' J Anal Chem* 366: 392-395.
- [163] Johnson AC, Belfroid A, Di Corcia A. 2000. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci Total Environ* 256: 163-173.
- [164] Rudel RA, Melly SJ, Geno PW, Sun G, Brody JG. 1998. Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, septage, and groundwater on Cape Cod, Massachusetts. *Environ Sci Technol* 32: 861-869.

- [165] Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Branson DR, Harris LR. 2000. Bisphenol A concentrations in receiving waters near US manufacturing and processing facilities. *Chemosphere* 40: 521-525.
- [166] Lee HB, Peart TE. 2000. Determination of Bisphenol A in sewage effluent and sludge by solid-phase- and supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Int* 83: 290-297.
- [167] Lee HB, Peart TE. 2000. Bisphenol A contamination in Canadian municipal and industrial wastewater and sludge samples. *Water Qual Res J Can* 35: 283-298.
- [168] Quemeneur M, Marty Y. 1994. Fatty acids and sterols in domestic wastewaters. *Water Res* 28: 1217-1226.
- [169] Peñalver A, Pocurull E, Borrull F, Marcé RM. 2000. Determination of phthalate esters in water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr, A* 872: 191-201.
- [170] Hyötyläinen T, Grob K, Biedermann M, Riekkola ML. 1997. Reversed-phase HPLC coupled on-line to GC by the vaporizer/precolumn solvent split/gas discharge interface; analysis of phthalates in water. *J High Resolut Chromatogr* 20: 410-416.
- [171] Paxeus N, Robinson P, Balmer P. 1992. Study of organic pollutants in municipal wastewater in Goeteborg, Sweden. *Water Sci Technol* 25: 249-256.
- [172] Lee HB, Peart TE. 1995. Determination of 4-nonylphenol in effluent and sludge from sewage treatment plants. *Anal Chem* 67: 1976-1980.
- [173] Bennett ER, Metcalfe CD. 1998. Distribution of alkylphenol compounds in Great Lakes sediments, United States and Canada. *Environ Toxicol Chem* 17: 1230-1235.
- [174] Ding WH, Tzing SH. 1998. Analysis of nonylphenol polyethoxylates and their degradation products in river water and sewage effluent by gas chromatography-ion trap (tandem) mass spectrometry with electron impact and chemical ionization. *J Chromatogr, A* 824: 79-90.
- [175] Ding WH, Tzing SH, Lo JH. 1999. Occurrence and concentrations of aromatic surfactants and their degradation products in river water of Taiwan. *Chemosphere* 38: 2597-2606.
- [176] Sekela M, Brewer R, Moyle G, Tuominen T. 1999. Occurrence of an environmental estrogen (4-nonylphenol) in sewage treatment plant effluent and the aquatic receiving environment. *Water Sci Technol* 39: 217-220.
- [177] Bennie DT, Sullivan CA, Lee HB, Maguire RJ. 1998. Alkylphenol polyethoxylate metabolites in Canadian sewage treatment plant waste streams. *Water Qual Res J Can* 33: 231-252.
- [178] Blackburn MA, Kirby SJ, Waldock MJ. 1999. Concentrations of alkylphenol polyethoxylates entering UK estuaries. *Mar Pollut Bull* 38: 109-118.

- [179] Ahel M, Giger W, Molnar E, Ibric S. 2000. Determination of nonylphenol polyethoxylates and their lipophilic metabolites in sewage effluents by normal-phase high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Croat Chem Acta* 73: 209-227.
- [180] Bennie DT. 1999. Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. *Water Qual Res J Can* 34: 79-122.
- [181] Spengler P, Körner W, Metzger JW. 1999. Hardly degradable substances with estrogenic activity in effluents of municipal and industrial sewage plants. *Vom Wasser* 93: 141-157.
- [182] Montagnani DB, Puddefoot J, Davie TJA, Vinson GP. 1996. Environmentally persistent estrogen-like substances in UK river systems. *Water Environ Manage* 10: 399-406.
- [183] de Voogt P, de Beer K, van der Wielen F. 1997. Determination of alkylphenol ethoxylates in industrial and environmental samples. *Trends Anal Chem* 16: 584-595.
- [184] Mazur W, Adlercreutz H. 1998. Natural and anthropogenic environmental estrogens: the scientific basis for risk assessment. Naturally occurring estrogens in food. *Pure Appl Chem* 70: 1759-1776.
- [185] Breinholt V, Hossaini A, Svendsen GW, Brouwer C, Nielsen E. 2000. Estrogenic activity of flavonoids in mice. The importance of estrogen receptor - distribution, metabolism and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 38: 555-564.
- [186] Petit F, Le Goff P, Cravédi JP, Valoitaire Y, Pakdel F. 1997. *Mol Endocrinol* 19: 321, zitiert in [69].
- [187] Shelby MD, Newbold RR, Tully DB, Chae K, Davis VL. 1996. *Environ Health Perspect* 104: 1296, zitiert in [69].
- [188] Danzo BJ. 1997. *Environ Health Perspect* 105: 294, zitiert in [69].
- [189] Kelly C. 2000. Analysis of steroids in environmental water samples using solid-phase extraction and ion-trap gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr, A* 872: 309-314.
- [190] Lagana A, Bacaloni A, Fago G, Marino A. 2000. Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14: 401-407.
- [191] López de Alda M, Barceló D. 2000. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disruptors in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. *J Chromatogr, A* 892: 391-406.
- [192] Schlett C, Pfeifer B. 1996. Determination of steroidal hormones in drinking and surface water samples. *Vom Wasser* 87: 327-333.

- [193] Giger W, Brunner PH, Schaffner C. 1984. 4-Nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* 225: 623-625.
- [194] Giger W, Ahel M, Schaffner C. 1984. In Angeletti G, Bjoerseth A, eds, *Analysis of organic micropollutants in water*. D Reidel, Dordrecht, The Netherlands, p 91, zitiert in [75].
- [195] Jobst H. 1987. Determination of 4-nonylphenol isomers in soils. *Fresenius' Z Anal Chem* 328: 644-647.
- [196] Di Corcia A, Samperi R, Marcomini R. 1994. *Environ Sci Technol* 28: 850, zitiert in [75].
- [197] Kubeck E, Naylor CG. 1990. *J Am Oil Chem Soc* 67: 400, zitiert in [75].
- [198] Marcomini A, Di Corcia A, Samperi R, Capri S. 1993. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of linear alkylbenzene sulphonates, nonylphenol polyethoxylates and their carboxylic biotransformation products. *J Chromatogr, A* 644: 59-71.
- [199] Marcomini A, Stelluto S, Pavoni B. 1989. *Int J Environ Anal Chem* 35: 207, zitiert in [75].
- [200] Jungclaus GA, Lopez-Avila V, Hites RA. 1978. *Environ Sci Technol* 12: 88, zitiert in [75].
- [201] Valls M, Bayona JM, Allbeiges J. 1990. *Int J Environ Anal Chem* 39: 329, zitiert in [75].
- [202] Crathorne B, Fielding M, Steel CP, Watts CD. 1984. *Environ Sci Technol* 18: 797, zitiert in [75].
- [203] Ventura F, Figueras A, Caixach J, Espadaler I, Romero J, Guardiola J, Rivera J. 1988. *Water Res* 22: 1211, zitiert in [75].
- [204] Ventura F, Caixach J, Figueras A, Espadaler I, Fraisse D, Rivera J. 1989. *Water Res* 23: 1191, zitiert in [75].
- [205] Rivera J, Ventura F, Caixach J, De Torres M, Figueras A, Guardiola J. 1987. *Int J Environ Anal Chem* 29: 15, zitiert in [75].
- [206] Marcomini A, Pavoni B, Sfriso A, Orio AA. 1990. *Mar Chem* 29: 307, zitiert in [75].
- [207] Marcomini A, Capri S, Giger W. 1987. Determination of linear alkylbenzenesulphonates, alkylphenol polyethoxylates and nonylphenol in waste water by high-performance liquid chromatography after enrichment on octadecylsilica. *J Chromatogr, A* 403: 243-252.
- [208] Blackburn MA, Waldock MJ. 1995. *Water Res* 29: 1623, zitiert in [75].
- [209] Stephanou E. 1985. *Int J Environ Anal Chem* 20: 41, zitiert in [75].
- [210] Shiraishi H, Otsuki A, Fuwa K. 1985. *Biomed Mass Spectrom* 12: 86, zitiert in [75].
- [211] Veith GD, Kiwus LM. 1977. *Bull Environ Contam Toxicol* 17: 631, zitiert in [75].
- [212] Yasuhara A, Shiraishi H, Tsugi M, Okuno T. 1981. *Environ Sci Technol* 15: 570, zitiert in [75].

- [213] Jobst H. 1995. *Acta Hydrochim Hydrobiol* 23: 20, zitiert in [75].
- [214] Marcomini A, Giger W. 1987. *Anal Chem* 59: 1709, zitiert in [75].
- [215] Marcomini A, Tortato C, Capri S, Liberatori A. 1993. *Ann Chem* 83: 461, zitiert in [75].
- [216] Marcomini A, Capel PD, Giger W, Haeni H. 1988. *Naturwissenschaften* 75: 460, zitiert in [75].
- [217] Diercxsens P, Tarradellas J. 1987. *Int J Environ Anal Chem* 28: 143, zitiert in [75].
- [218] Ahel M, Giger W. 1985. *Anal Chem* 57: 2584, zitiert in [75].
- [219] Ahel M, Giger W, Molnar-Kubica E, Schaffner C. 1984. In Angeletti G, Bjoerseth A, eds, *Analysis of organic micropollutants in water*. D Reidel, Dordrecht, The Netherlands, p 330, zitiert in [75].
- [220] Brown D, DeHenau H, Garrigan JT, Gerike P, Holt M, Kunkel E, Matthijs E, Waters J, Watkinson RJ. 1987. *Tenside Surf Det* 24: 14, zitiert in [75].
- [221] Holt MS, McKerrel EH, Perry J, Watkinson RJ. 1986. *J Chromatogr, A* 362: 419, zitiert in [75].
- [222] Crescenzi C, Di Corcia A, Samperi R, Marcomini A. 1995. *Anal Chem* 67: 1797, zitiert in [75].
- [223] Ahel M, Conrad T, Giger W. 1987. *Environ Sci Technol* 21: 697, zitiert in [75].
- [224] Reinhard M, Goodman N, Mortelmans KE. 1982. *Environ Sci Technol* 16: 351, zitiert in [75].
- [225] Stephanou E. 1986. In Bjoerseth A, Angeletti G, eds, *Organic micropollutants in the aquatic environment*. D Reidel, Dordrecht, The Netherlands, p 155, zitiert in [75].
- [226] Bolz U, Körner W, Hagenmaier H. 1998. Development and validation of a GC/MS-method for determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples. *Organohalogen Compd* 35: 93-96.
- [227] Del Olmo M, Gonzáles-Casado A, Navas NA, Vilchez JL. 1997. Determination of Bisphenol A in water by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 346: 87-92.
- [228] Viana E, Moltó JC, Mānes J, Font G. 1993. *J Chromatogr, A* 655: 285, zitiert in [232].
- [229] Chapman RA. 1983. *J Chromatogr, A* 258: 175, zitiert in [232].
- [230] Oi N, Kitahara H. 1990. *J Chromatogr, A* 515: 441, zitiert in [232].
- [231] Kutter JP, Class TJ. 1992. *Chromatographia* 33: 103, zitiert in [232].
- [232] Fernández-Gutiérrez A, Martínez-Vidal JL, Arrebola-Liébanas FJ, Gonzales-Casado A, Vilchez JL. 1998. Determination of endosulfan and some pyrethroids in waters by micro liquid-liquid extraction and GC-MS. *Fresenius' J Anal Chem* 360: 568-572.
- [233] Siegel MM, Hildebrand BE, Hall DR. 1980. *Int J Environ Anal Chem* 8: 107, zitiert in [232].

- [234] Maguire RJ, Carey JH, Hart JH, Tkacz RJ, Lee H. 1989. *J Agric Food Chem* 37: 1153, zitiert in [232].
- [235] Swineford DM, Belisle AA. 1989. *Environ Toxicol Chem* 8: 465, zitiert in [232].
- [236] Hale JR, Walla MD, Bryson TA. 1989. *J Agric Food Chem* 37: 70, zitiert in [232].
- [237] Peñula GA, Barceló D. 1998. Application of C₁₈ disks followed by gas chromatography techniques to degradation kinetics, stability and monitoring of endosulfan in water. *J Chromatogr, A* 795: 93-104.
- [238] Franke AA, Custer LJ, Cerna CM, Narala KK. 1995. *Proc Soc Exp Biol Med* 208: 18, zitiert in [249].
- [239] Wang HJ, Murphy PA. 1994. *J Am Chem Soc* 116: 1666, zitiert in [249].
- [240] Coward I, Barne NC, Setchell KDR, Barnes S. 1993. *J Agric Food Chem* 41: 1961, zitiert in [249].
- [241] Adlercreutz H, Fotsis T, Bannwart C, Wähälä K, Brunow G, Hase T. 1991. *Clin Chim Acta* 199: 263, zitiert in [249].
- [242] Schwadorf K, Müller HM. 1992. *J Chromatogr, A* 595: 259, zitiert in [249].
- [243] Liu MT, Ram BP, Hart LP, Pestka JJ. 1985. *Appl Environ Microbiol* 50: 332, zitiert in [249].
- [244] Warner R, Ram BP, Hart LP, Pestka JJ. 1986. *J Agric Food Chem* 34: 714, zitiert in [249].
- [245] Careri M, Mangia A, Musci M. 1998. *J Chromatogr, A* 794: 263, zitiert in [249].
- [246] Watson DG, Pitt AR. 1998. *Rapid Commun Mass Spectrom* 12: 153, zitiert in [249].
- [247] Justesen U, Knuthsen P, Leth T. 1998. *J Chromatogr, A* 799: 101, zitiert in [249].
- [248] He X, Lian L, Lin I, Bernart M. 1997. *J Chromatogr, A* **1997**, 791: 127, zitiert in [249].
- [249] Ternes TA, Brenner-Weiß G, Eggert T, Müller J, Kirschhöfer F, Nusser M, Wilken RD, Obst U. 1999. Analysis of phytoestrogens and mycoestrogens in water using liquid chromatography-electrospray ionisation/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Vom Wasser* 93: 255-263.
- [250] Franke AA, Custer LJ, Cerna CM, Narala KK. 1994. Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *J Agric Food Chem* 42: 1905-1913.
- [251] Barnes S, Coward L, Kirk M, Sfakianos J. 1998. HPLC-mass spectrometry analysis of isoflavones. *Proc Soc Exp Biol Med* 217: 254-262.
- [252] Mudge SM, Bebianno MJAF, East JA, Barreira LA. 1999. Sterols in the Ria Formosa lagoon, Portugal. *Water Res* 33: 1038-1048.
- [253] Fattore E, Benfenati E, Marelli R, Cools E, Fanelli R. 1996. Sterols in sediment samples from Venice lagoon, Italy. *Chemosphere* 33: 2383-2393.
- [254] Zöllner P, Jodlbauer J, Lindner W. 1999. Determination of zearalenone in grains by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid phase

- extraction with RP-C18 columns or immunoaffinity columns. *J Chromatogr, A* 858: 167-174.
- [255] Krska R. 1999. Analytik von Fusarium-Mykotoxinen in Europa. *Nachr Chem* 47: 553-556.
- [256] Brüll U, Alberti J, Furtmann K. 2000. Phthalatanalytik in Wasser und Sediment. *Vortrag Umweltanalytiktag NRW, Duisburg, August 2000*, pp 1-9.
- [257] Mol HGJ, Sunarto S, Steijger OM. 2000. Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with *N*-Methyl-*N*-(*tert*-butyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr, A* 879: 97-112.
- [258] Holtey-Weber RI, Färber HA, Schöler HF. 1999. On-line silylation for the determination of endocrine disruptors in water using GC-MS/MS. *Vom Wasser* 92: 1-9.
- [259] Körner W, Hanf V, Schuller W, Bartsch H, Zwirner M, 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.
- [260] Körner W. 2000. Nachweis von estrogen- und androgenartig wirkenden Substanzen in der Umwelt durch Kombination von chemischer und biologischer Analytik. Habilitationsschrift. Universität Tübingen, Tübingen.
- [261] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anti-cancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82: 1107-1112.
- [262] Stanley ER, Palmer RE, Sohn U. 1977. Development of methods for the quantitative *in vitro* analysis of androgen-dependant and autonomous *Shionogi carcinomka* 115 cells. *Cell* 10: 35-44.
- [263] Abwassertechnische Vereinigung eV. 1998. *Kläranlagen- und Kläranlagennachbarschaften Baden-Württemberg*. Abwassertechnische Vereinigung eV, Landesgruppe Baden-Württemberg, Stuttgart.
- [264] Ternes TA, Stumpf M, Schuppert B, Haberer K. 1998. Simultaneous determination of antiseptics and acidic drugs in sewage and river water. *Vom Wasser* 90: 295-309.
- [265] Dutta PC, Normen L. 1998. Capillary column gas-liquid chromatographic separation of delta 5-unsaturated and saturated phytosterols. *J Chromatogr, A* 816: 177-184.
- [266] Franke AA, Custer LJ. 1994. High-performance liquid chromatographic assay of isoflavonoids and coumestrol from human urine. *J Chromatogr, Biomed Appl* 662: 47-60.
- [267] Lye CM, Frid CLJ, Gill ME, Cooper DW, Jones DM. 1999. Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and waters from the U.K. tyne and tees estuaries. *Environ Sci Technol* 33: 1009-1014.
- [268] Deutsches Institut für Normung eV. 1998. Verfahren der Standardaddition nach DIN 32633. DIN-Norm. Berlin.

- [269] Michaelis C, Heinzow B, Rümger G, Oostendorp G. 1999. GC-MS-determination of alkylphenols in water after derivatization with triethylsulfonium hydroxid. *Vom Wasser* 93: 59-66.
- [270] Huber W. 1993. Detection limit, identification limit and determination limit by DIN 32645. *Vom Wasser* 80: 7-13.
- [271] Krauth K, Stotz G. 1992. Belastung der Gewässer durch Kläranlagenabläufe und Regenwasserbehandlungsanlagen der Mischkanalisation. In Zielke W, ed, *Steuerung in der Wasserwirtschaft - Ergebnisse eines fünfjährigen Schwerpunktprogramms der DFG Deutsche Forschungsgemeinschaft*. VCH, Weinheim, pp 109-120.
- [272] Norpoth K, Nehr Korn A, Kirchner M, Holsen H, Teipel H. 1973. Investigations on the problem of solubility and stability of steroid ovulation inhibitors in water, waste water and activated sludge. *Zbl Bakt Hyg, I Abt Orig B* 156: 500-511.
- [273] Layton AC, Gregory BW, Seward JR, Schultz TW, Sayler GS. 2000. Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee, USA. *Environ Sci Technol* 34: 3925-3931.
- [274] Schweinfurth H, Länge R. 1998. Umweltverhalten und aquatische Toxizität von Ethinyl-estradiol. In Österreichische Gesellschaft für Toxikologie und andere Veranstalter, eds, *8. Seminar für Toxikologie*. Österreichische Gesellschaft für Toxikologie, Graz, Österreich, pp 48-54.
- [275] Breithofer A, Graumann K, Scicchitano MS, Karathanasis SK, Butt TR, Jungbauer A. 1998. Regulation of human estrogen receptor by phytoestrogens in yeast and human cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67: 421-429.
- [276] Nishikawa J, Saito K, Goto J, Dakeyama F, Matsuo M, Nishihara T. 1999. New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol Appl Pharmacol* 154: 76-83.
- [277] Cummings AM, Laws SC. 2000. Assessment of estrogenicity by using the delayed implanting rat model and examples. *Reprod Toxicol* 14: 111-117.
- [278] Tremblay L, van der Kraak G. 1998. Use of a series of homologous *in vitro* and *in vivo* assays to evaluate the endocrine modulating actions of β -sitosterol in rainbow trout. *Aquat Toxicol* 43: 149-162.
- [279] Needham LL, Blount B, Rogers S, Brock JW, Barr D. 2000. Levels of selected non-persistent endocrine disruptors in humans. *ACS Symp Ser* 747: 147-157.
- [280] Kortenkamp A, Payne JP. 1999. The potential impact of weakly estrogenic environmental pollutants on the effects of endogenous estrogens. *Oral presentation, 9th Annual meeting of SETAC-Europe, Leipzig, May 1999, Abstract 2h/010.*

- [281] Arnold SF, Klotz DM, Collins BM, Vonier PM, Guillette LJJ, McLachlan JA. 1996. Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science* 272: 1489-1492.
- [282] Ramamoorthy K, Wang F, Chen IC, Norris JD, McDonnell DP, Leonard LS, Gaido KW, Bocchinfuso WP, Korach KS, Safe S. 1997. Estrogenic activity of a dieldrin/toxaphene mixture in the mouse uterus, MCF-7 human breast cancer cells, and yeast-based estrogen receptor assays: no apparent synergism. *Endocrinology* 138: 1520-1527.
- [283] McLachlan JA. 1997. Synergistic effect of environmental estrogens: Report withdrawn. *Science* 25: 459-460.
- [284] Kannan K, Yamashita N, Villeneuve DL, Hashimoto S, Miyazaki A, Giesy JP. 1999. Vertical profile of dioxin-like and estrogenic potencies in a sediment core from Tokyo Bay, Japan. *Organohalogen Compd* 42: 33-36.
- [285] Körner W, Bolz U, Triebkorn R, Schwaiger J, Negele RD, Kalbfus W, Marx A, Hagenmaier H. 1999. Multiple monitoring of estrogenic active substances in small streams in South Germany. *Oral presentation*, 9th Annual meeting of SETAC-Europe, Leipzig, May 1999, Abstract 2j/012.
- [286] Harries JE, Sheahan DA, Jobling S, Matthiessen P, Neall P, Routledge EJ, Rycroft R, Sumpter JP, Tylor T. 1996. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ Toxicol Chem* 15: 1993-2002.
- [287] Folmar LC, Denslow ND, Rao V, Chow M, Crain DA, Enblom J, Marcino J, Guillette LJJ. 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.
- [288] Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Matthiessen P, Sumpter JP. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 15: 194-202.
- [289] Jürgens MD, Johnson AC. 1999. Das potentielle Verhalten von Steroidöstrogenen in Flüssen. In Oehlmann J, Markert B, eds, *Ökotoxikologie: ökosystemare Ansätze und Methoden*. Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg, pp 527-537.
- [290] Johnson AC, White C, Besien TJ, Jürgens MD. 1998. The sorption of octylphenol, a xenobiotic oestrogen, to suspended and bed-sediments collected from industrial and rural reaches of three English rivers. *Sci Total Environ* 210/211: 271-282.
- [291] Möhle E. 1999. Identifizierung schwer abbaubarer Stickstoffverbindungen im kommunalen Abwasser. Dissertation. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- [292] Heberer T, Stan HJ. 1995. Polare Umweltkontaminanten im aquatischen System. *GIT Fachz Lab* 39: 718-720.

- [293] Heberer T, Stan HJ. 1996. Occurrence of polar organic contaminants in drinking water of Berlin. *Vom Wasser* 86: 19-31.
- [294] Stenz G, Petrick S, Graf I, Krauß P, Metzger JW. 2000. Ein Summenparameter zur Bestimmung von potentiell bioakkumulierbaren Stoffen (PBS) im Abwasser – ein HPLC-Verfahren. *Posterbeitrag*, Jahrestagung der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Bayreuth, Oktober 2000.
- [295] Hager CD. 1999. Haben Nonylphenoethoxylate in Westeuropa noch eine Zukunft. *Vortrag*, 54. Fachtagung des bayrischen Landesamtes München, München, Juli 1999.
- [296] Risk and Policy Analysts. 1999. Risk Assessment of 4-Nonylphenol (Branched) and Nonylphenol – final draft. Technical Report.
- [297] Shang DY, Ikonomou MG, MacDonald RW. 1999. Quantitative determination of nonylphenol polyethoxylate surfactants in marine sediment using normal-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr, A* 849: 467-482.
- [298] Eichhorn P, Petrovic M, Barceló D, Knepper T. 2000. Fate of surfactants and their metabolites in waste water treatment plants. *Vom Wasser* 95: 245-268.
- [299] Ding WH, Wu CY, Chou CL. 2000. Occurrence and concentrations of nonylphenol polyethoxylates and their degradation products in Taiwanese rivers and industrial effluents. *Poster presentation*, Gordon Research Conference on Environmental Endocrine Disruptors, Plymouth, NH, USA, July 2000.
- [300] Ciba Additives Division. 1999. Safety Data Sheet for Irgacor NPA according to directive 91/155/EEC. Technical report. Basel, Schweiz.
- [301] Holcombe GW, Phipps GL, Knuth ML, Felhaber T. 1984. The acute toxicity of selected substituted phenols, benzenes and benzoic acid esters to fathead minnows *Pimephales Promelas*. *Environ Pollut Ser A* 35: 367-381.
- [302] Yoshimura K. 1986. *J Am Oil Chem Soc* 63: 1590, zitiert in [158].
- [303] Knie VJ, Halke A, Juhnke J, Schiller W. 1983. *Deutsche Gewässerkundliche Mitteilungen* 27: 77, zitiert in [62].
- [304] Dorn PB, Slanitra JP, Evans SH, Kravetz I. 1993. *Toxicol Chem* 12: 1751, zitiert in [62].
- [305] Shimizuu H, Suzuki Y, Takemura N, Goto S, Matsushita H. 1985. *Sangyo Igaku* 27: 400, zitiert in [62].
- [306] Maki H, Okamura H, Aoyama I, Fujita M. 1998. *Environ Toxicol Chem* 17: 650, zitiert in [62].
- [307] Islinger M, Pawlowski S, Hollert H, Volkl A, Braunbeck T. 1999. Measurement of vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNase protection-assay. *Sci Total Environ* 233: 109-122.
- [308] Ahel M, Giger W. 1993. Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere* 26: 1471-1478.

- [309] Potter TL, Simmons K, Wu J, Sanchez-Olivera M, Kostecki P, Calabrese E. 1999. Static die-away of nonylphenol ethoxylate surfactants in estuarine water samples. *Environ Sci Technol* 33: 113-118.
- [310] Brenner PH, Capri S, Marcomini A, Giger W. 1998. *Water Res* 22: 1465, zitiert in [296].
- [311] Varineau PT, Williams JB. 1997. *Oral presentation*, AOCS Conference, Brussels March 1997, zitiert in [296].
- [312] Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart. TSB von Nonylphenolpolyethoxylat, unveröffentlicht.
- [313] Link A. 2000. Estrogenartig wirksame Verbindungen im Abwasser – Nachweis und Eliminationsverhalten am Beispiel von Nonylphenolpolyethoxylaten. Diplomarbeit. Universität Stuttgart, Stuttgart.
- [314] Reemtsma T, Kornmüller A. 1999. *Anwendung der LC-MS in der Wasseranalytik*, Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung 11. Technische Universität Berlin, Berlin.
- [315] Hulpke H, Koch HA, Wagner R. 1993. *Römpf Lexikon Umwelt*. Thieme, Stuttgart.
- [316] Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart. 1998. Temperaturverlauf im Belebungsbecken IV des Lehr- und Forschungsklärwerts Stuttgart-Büsnau, unveröffentlicht.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Peter Spengler
 Geburtsdatum: 2. Juni 1969
 Geburtsort: Pforzheim

Schulbildung

1975 – 1979 Weiherberg Grundschule in Pforzheim
 1979 – 1988 Hebel-Gymnasium in Pforzheim
 1988 Abitur

Studium

Okt. 1988 – Januar 1998 Chemiestudium an der Universität Stuttgart
 Juli 1993 Diplomvorprüfung
 Juni 1997 mündliche Diplomhauptprüfung
 Juli 1997 – Januar 1998 Diplomarbeit bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter Fischer am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart: „Bestimmung der Drehwerte für enantio- und diastereomerenreine 2-Aminobornane und einige Derivate“.
 Mai 1998 – Mai 2001 Promotion bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jörg W. Metzger am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart: „Identifizierung und Quantifizierung von Verbindungen mit östrogenen Wirkung im Abwasser“.