

**Entwicklung einer analytischen Methode zum Nachweis
von ökotoxikologisch relevanten organischen Problemstoffen in
Sedimenten und Biota unter besonderer Berücksichtigung
von Irgarol, synthetischen Moschusduftstoffen und deren
Transformationsprodukten**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Scarlett Biselli

Hamburg 2001

1	EINLEITUNG	13
1.1	Sedimente	13
1.2	Toxizitätsgeleitete Untersuchung von Sedimenten	17
1.3	Organische Spurenanalytik in Sedimenten	19
1.4	Moschusduftstoffe: Verwendung, Umweltrelevanz, toxikologische Bedeutung, Chiralität	20
2	SEDIMENTANALYTIK	25
2.1	Methodenentwicklung	25
2.1.1	Zielsetzung der Methodenentwicklung zur Analyse von Sedimenten	25
2.1.2	Schema der Analysenmethode für Festmatrices	26
2.1.2.1	<i>Probenahme und Lagerung von Sedimenten</i>	27
2.1.2.2	<i>Extraktionsverfahren für die Analyse von Sedimentproben</i>	27
2.1.2.3	<i>Größenausschluß-Chromatographie (GPC)</i>	28
2.1.2.4	<i>Clean-up über die Mini-Kieselgel-Chromatographie</i>	29
2.1.3	Detektion und Quantifizierung von ausgewählten Zielverbindungen	31
2.1.4	Varianten für weitere Probenmatrices	32
2.2	Validierung der analytischen Methode	33
2.2.1	Hintergrundbelastung	33
2.2.2	Präzision der Methode	34
2.2.3	Wiederfindungsraten	35
2.2.3.1	<i>Sedimente</i>	35
2.2.3.2	<i>Biotaprobenn</i>	40
2.2.3.3	<i>Anwendung der Analysenmethode als Multirückstandsmethode für verschiedene Matrices</i>	40
2.2.3.4	<i>Arbeitsbereich, Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Analyse von Sedimentproben</i>	42
2.2.4	Dokumentation und Verwendung von Referenzmaterial	43
2.2.5	Verifizierung der Leistungsfähigkeit	45
2.2.5.1	<i>Belastungsabschätzung durch ECD-, AFID-Messungen</i>	45
2.2.6	Zusammenfassende Fehlerbetrachtung	54
2.2.6.1	<i>Referenzmaterialien</i>	54
2.2.6.2	<i>Sedimentdotierung für WFR-Vesuche</i>	54
2.2.6.3	<i>Einwaage Feuchtgewicht:</i>	55
2.2.6.4	<i>Fehler bei der Volumenbestimmung:</i>	55
2.2.6.5	<i>Fehler bei Detektion und Integration</i>	56

2.2.6.6	<i>Koelutionen bei Verwendung des AFIDs bzw. ECD</i>	56
2.2.7	Diskussion der Ergebnisse	56
2.3	Target-Untersuchung von Sedimentproben	57
2.3.1	Vorkommen und Problematik von Irgarol und TBT in Sedimenten	57
2.3.1.1	<i>Beschreibung der Probenahme-Stationen und Zeitpunkte</i>	59
2.3.1.2	<i>Analysenmethode für die Untersuchung von Wasserproben auf Irgarol</i>	61
2.3.1.3	<i>Irgarolkonzentrationen in ausgewählten Wasserproben der Nord- und Ostsee</i>	63
2.3.1.4	<i>Ergebnisse der Irgarol-Untersuchung von ausgewählten Sedimenten der Nord- und Ostseehäfen</i>	66
2.3.1.5	<i>Saisonale Abhängigkeit der Irgarol-Konzentration</i>	67
2.3.1.6	<i>Irgarol-Verteilung zwischen Wasser und Sediment</i>	69
2.3.1.7	<i>Vergleich der Konzentrationen zinnorganischer Verbindungen und des Irgarols (zweite Probenahmeserie)</i>	72
2.3.2	Zusammenfassende Betrachtung.....	74
2.3.3	Weitere in den Wasser- und Sedimentproben identifizierte Verbindungen.....	77
2.4	Screening-Untersuchung von Nordsee-Sedimenten	82
2.4.1	Identifizierung und Quantifizierung ausgewählter Zielverbindungen.....	84
2.4.1.1	<i>Aniline, Nitroaromaten und Phosphorsäureester</i>	84
2.4.1.2	<i>Moschusduftstoffe</i>	87
2.4.1.3	<i>Nonylphenol, Nonylphenolmonoethoxylat und optische Aufheller</i>	89
2.4.2	Ergebnisse der Screening-Untersuchung.....	90
2.4.2.1	<i>Vorgehensweise bei der Identifizierung</i>	90
2.4.3	Identifizierte Substanzgruppen aus Nordseesedimenten	92
2.4.3.1	<i>Fehlerbetrachtung und Problematik der Identifizierung:</i>	106
3	METHODENENTWICKLUNG ZUR TOXIZITÄTSGELEITETEN	
	UNTERSUCHUNG VON SEDIMENTEN	107
3.1	Vorstellung der verschiedenen Ansätze für die Sedimentqualitätsbewertung:	107
3.1.1	Chemisch-physikalische Verfahren	108
3.1.2	Biologisch/ökotoxikologisch	109
3.1.3	Chemisch/ökotoxikologisch	109
3.1.4	Integrierter Ansatz.....	110
3.2	Bioverfügbarkeit und Gleichgewichtsverteilung von sediment- und schwebstoffgebundenen Substanzen	112
3.3	Beschreibung der verwendeten Testverfahren	114
3.3.1	Aquatische Toxizität (Leuchtbakterien Test)	115
3.3.2	Genotoxizitätstests in Bakterien: Ara-Test, (Ames-Test, <i>Salmonella</i> T98, T100).....	116

3.3.3	Testverfahren zur Untersuchung der Proben auf hormonelle Aktivität : MCF7-Luciferase-Test:	118
3.4	Anwendung der Methode und Überprüfung einzelner Arbeitsschritte anhand zweier Schwebstoffproben.....	121
3.4.1	Probenahme	124
3.4.2	Probenlagerung	124
3.4.3	Prüfung auf potentielle Effekte durch vorhandene Laborbelastungen	125
3.4.4	Prüfung der Lösungsmittel auf ihre Verträglichkeit in den Biotests	126
3.4.5	Vergleich unterschiedlicher Extraktionsmethoden und Extraktionsmittel	127
3.4.5.1	<i>Vergleich polarer Lösungsmittel für die Primärextrakt-Gewinnung:</i>	<i>129</i>
3.4.5.2	<i>Vergleich von lipophilen Extraktionsmitteln für den Sekundärextrakt.....</i>	<i>131</i>
3.4.6	Ergebnisse Leuchtbakterientest	132
3.4.6.1	<i>Untersuchung der Schwebstoffprobe Magdeburg auf akute Toxizität (Stufe 1,2)</i>	<i>133</i>
3.4.7	Ergebnisse der genotoxikologischen Untersuchung ausgewählter Schwebstoffproben	136
3.4.7.1	<i>Vorversuche zum biotestgeleiteten Screening: Schwebstoffprobe der Elbe bei Schmilka.....</i>	<i>136</i>
3.4.7.2	<i>Ergebnisse der biotestgeleiteten Untersuchung der Schwebstoffprobe Magdeburg</i>	<i>142</i>
3.4.7.3	<i>Vergleich der akuten Toxizität des Schwebstoffextraktes und einer SPMD-Probe aus Magdeburg</i>	<i>155</i>
3.4.8	Östrogenes Potential einer schwebstoffbürtigen Sedimentprobe	156
3.4.9	Zusammenfassende Betrachtung aller Ergebnisse des biotestgeleiteten Screening in Sedimenten.....	163
3.4.10	Fehlerbetrachtung.....	165
4	UNTERSUCHUNGEN VON MOSCHUSDUFTSTOFFEN	167
4.1	Untersuchungen zur abiotischen und biotischen Transformation von polycyclischen Moschusverbindungen –Ergebnisse einer Prozeßstudie im „Klärteich Neumünster“-	167
4.1.1	Ergebnisse der Sediment- und Klärschlamm-Untersuchungen	168
4.1.2	Bildung und Konzentrationsverteilung des „HHCB-Lactons“.....	171
4.1.2.1	<i>Klärschlamm-, Sediment- und Wasserproben</i>	<i>173</i>
4.1.2.2	<i>SPMD- und Biotaprobe</i>	<i>174</i>
4.2	Stereoselektive Untersuchungen	179
4.2.1	Darstellung und enantioselektive chromatographische Separation der Stereoisomere des HHCB-Lactons	183
4.2.2	Enantioselektive gaschromatographische Analyse der Biota- und SPMD-Proben	185
4.2.3	Separation der Enantiomere des HHCB und <i>trans</i> -Traseolids [®] über semipräparative HPLC	191

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Untersuchungen im Schöningsteich Neumünster	194
4.4 Toxizität der Nitromoschus-Metabolite.....	195
4.4.1 Synthese der Nitromoschusmetabolite von MX und MK für toxikologische Studien....	195
4.4.2 Ergebnisse der Kooperation zur Untersuchung der Aminometabolite auf Mutagenität	199
4.4.3 Untersuchung des östrogenen Potentials der Aminometabolite	201
4.4.3.1 <i>Ergebnisse aus der Kooperation zur Untersuchung eines östrogenen Wirkpotentials: E-Screen-Assay</i>	<i>202</i>
4.4.3.2 <i>Ergebnisse der Kooperation zu kompetitiven Bindungsstudien mit Hilfe des ER- Rezeptor der Regenbogenforelle und des südafrikanischen Krallenfrosches (Xenopus Laevis)</i>	<i>204</i>
5 ZUSAMMENFASSUNG	207
6 SUMMARY	211
7 EXPERIMENTELLER TEIL.....	213
7.1 Verwendete Geräte.....	213
7.2 Photochemische Umsetzung der Stereoisomere des HHCB zu den reinen Enantiomeren des HHCB-Lactons:	214
7.3 Darstellung von 2-Amino-MK.....	215
7.4 Darstellung von 2-Amino-MX und 4-Amino-MX	215
7.5 Verwendete Chemikalien.....	215
7.6 Reinstwasseranlage.....	216
7.7 Verbleib der Chemikalien	217
8 LITERATURVERZEICHNIS	218
ANHANG	234

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Umweltchemikalien im aquatischen System, Eintrag und Verbleib der Stoffe.....	17
Abbildung 2: Konstitutionsformeln wichtiger synthetischer Moschusverbindungen	20
Abbildung 3: Stereoisomere des HHCB, AHTN und ATII.....	22
Abbildung 4: Sensorische Bewertung von Limonen und α -Terpineol	23
Abbildung 5: Sediment-Analysenschema	26
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Miniatur-Kieselgelchromatographie.....	30
Abbildung 7: Methodenschema Biotaprobe.....	32
Abbildung 8: WFR und prozentuale Standardabweichung ausgewählter Nitroaromaten und Triazine	36
Abbildung 9: Analysenschema für die Bearbeitung von Sediment-, Klärschlamm-, Biota- und SPMD- Proben.....	41
Abbildung 10: ECD-Chromatogramme der Fraktion 1 (Probe KS11):Aceton- und <i>n</i> -Hexan-Extrakt.....	46
Abbildung 11: ECD-Chromatogramme der Fraktion 2 (Probe KS11): Aceton- und <i>n</i> -Hexan-Extrakt	47
Abbildung 12: Vergleich AFID-Bestimmung der Fraktion 1, 2 des Aceton-Extrakts der Probe KS11.....	48
Abbildung 13: ECD-Chromatogramme der Fraktion 3 (Probe KS11): Aceton- und <i>n</i> -Hexan-Extrakt	50
Abbildung 14: AFID-Chromatogramm Fraktion 3 (Probe KS11): Aceton- und <i>n</i> -Hexan-Extrakt	50
Abbildung 15: AFID-Chromatogramm der Fraktion 4 (Probe KS11): Aceton- und <i>n</i> -Hexan-Extrakt	51
Abbildung 16: AFID-Chromatogramm der Fraktion 5a und 5b, die durch Unterfraktionierung aus Fraktion 5 erhalten wurden (Probe KS11).....	52
Abbildung 17: Massenspektrum und Struktur von Irgarol 1051.....	58
Abbildung 18: Probenahmestationen an der deutschen Nord- und Ostseeküste	60
Abbildung 19: Analysen-Schema für die Bestimmung von Irgarol in Wasserproben.....	62
Abbildung 20: Ermittelte Irgarolkonzentrationen im Wasser; Probenahme 2, Stationen 1-13	64
Abbildung 21: Irgarol-Konzentrationen im Sediment der Probenahmeserie 2	67
Abbildung 22: Saisonaler Vergleich der Irgarolkonzentrationen im Wasser und im Sediment	68
Abbildung 23 : Verteilung des TBTs in unterschiedlichen Kompartimenten, basierend auf Messungen im Luzerner See zwischen 1988 und 1994	76
Abbildung 24: Vergleich der Massenspektren der unbekanntes Substanz in Fraktion 3 der Wasserprobe Station 13 (Niendorf Hafen), mit dem Bibliotheksspektrum für Coffein	77
Abbildung 25: Vergleich der Massenspektren des Terbutylazins.....	78
Abbildung 26: Strukturen der Nitromoschus-Transformationsprodukte	79
Abbildung 27: Strukturen der weiteren, in den Sedimentproben untersuchten Verbindungen	81
Abbildung 28: Stationen der Sedimentprobenahme Nordsee	83
Abbildung 29: Charakteristische Chromatogramme (Ionenspuren) der in den Nordseesedimentproben dominierenden PAH (I).....	93
Abbildung 30: Charakteristische Chromatogramme (Ionenspuren) der in den Nordseesedimentproben dominierenden PAH (II).....	94
Abbildung 31:Strukturen der in allen Nordseesediment-Proben analysierten Thiophene und Thiazole, mit unterschiedlichen Alkylresten substituiert	95
Abbildung 32: In den Nordseesediment-Proben gefundene Barbitursäure-Derivate	96
Abbildung 33: Terpenoide Verbindungen die in Nordseesediment-Proben identifiziert wurden	97

Abbildung 34: Chromatogramm und MS-Spektren bromierter Verbindungen der Sedimentprobe 3	98
Abbildung 35: Prozentuale Verteilung der identifizierten Substanzklassen in der Nordseesedimentprobe 2	106
Abbildung 36: Faktoren, die die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen beeinflussen.....	112
Abbildung 37: Exposition eines benthischen Organismus gegen Sedimentschadstoffe.....	113
Abbildung 38: Schematische Darstellung des Testverfahrens zur Bestimmung östrogenen Potentiale. ...	120
Abbildung 39: Analysen-Schema für die Toxizitätsgeleitete Analyse	123
Abbildung 40: Vergleich der erhaltenen Chromatogramme für den A) Ethanol- Extrakt und B) Aceton- Extrakt der Schwebstoffprobe 2 (Schnackenburg); Silica-Fraktion 1.....	130
Abbildung 41: Ergebnisse der Untersuchung der Rohextrakte <i>n</i> -Hexan, Aceton, Wasser (Stufe I) und nach der GPC-Fraktionierung (Stufe II) auf akute Toxizität im Leuchtbakterientest.....	134
Abbildung 42: Ergebnisse der bioanalytischen Untersuchung der Schwebstoffprobe Schmilka, auf mutagene Wirkung im Ara-Test (BA 14, 146, 149)	138
Abbildung 43: Ergebnisse der GC-MS-Analyse für die Fraktionen des Toluol-Extraktes und der entsprechenden Fraktionen des MeOH-Extraktes der Schwebstoffprobe Schmilka	141
Abbildung 44: Ergebnisse der bioanalytischen Prüfung einer Schwebstoffprobe aus der Elbe bei Magdeburg. Darstellung der Ergebnisse (Stufe I, II Ba146) der Prüfung auf Mutagenität. ...	143
Abbildung 45: Ergebnisse des Ara-Tests für die Stufe III nach Silica-Fraktionierung der biotestgeleiteten Analyse für die Schwebstoffprobe Magdeburg.	144
Abbildung 46: Vergleich der beobachteten Effekte für die Bakterienstämme BA 14, 146, 149, ausgelöst durch die "polaren" Fraktionen 4, 5b und c der Schwebstoffprobe Magdeburg ...	146
Abbildung 47: Identifizierte Komponenten in der Elbe-Probe bei Magdeburg sowie die ermittelten Konzentrationen ausgewählter Zielverbindungen, die als Summen der jeweiligen Substanzklasse zusammengefaßt wurden.	147
Abbildung 48: Mögliche Umwandlungswege und Aktivierung des Benzo[<i>a</i>]pyrens zum mutagenen Diol	149
Abbildung 49 : Auswahl der identifizierten Nitro- und Aminoverbindungen im Extrakt der Schwebstoffprobe Magdeburg	154
Abbildung 50: Ergebnisse der Untersuchung auf akute Toxizität der SPMD-Probe aus Magdeburg, Fraktion 1-6 (K = Kontrolle), mit Hilfe des Leuchtbakterien-Tests	155
Abbildung 51: Ergebnisse der Untersuchung der Fraktionen 5, 6 und 7 des Schwebstoffextraktes der Probe Magdeburg im Leuchtbakterientest	156
Abbildung 52: Ergebnisse der bioanalytischen Untersuchung (MCF7- <i>Luc</i> -Test) auf östrogene Wirkung einer Schwebstoffprobe (Schnackenburg, Elbe).....	157
Abbildung 53: Zusammenfassende Darstellung der chemischen Analyse der Aceton-Extraktfraktionen der Schwebstoffprobe Schnackenburg	158
Abbildung 54: Ergebnisse der Auswertung des GC-MS-Chromatogrammes der Fraktion 3 des Aceton- Extraktes, "Schwebstoffprobe Schnackenburg, Elbe"	159
Abbildung 55: Ergebnisse der Auswertung des GC-MS-Chromatogramms der Fraktionen 5b und 5c des Aceton-Extraktes, Schwebstoffprobe Schnackenburg, Elbe.....	160
Abbildung 56: Schematische Darstellung der ermittelten relativen toxischen Wirkungen für den Probenextrakt der Schwebstoffprobe Magdeburg und Schnackenburg.	165

Abbildung 57: Angenommener Reaktionsmechanismus für die Bildung des HHCB-Lactons.....	172
Abbildung 58 : Mögliche Folgeprodukte des HHCB-Lactons als Ergebnis eines weiteren Oxidationsschrittes	173
Abbildung 59: Gemittelte Konzentrationen von HHCB und HHCB-Lacton für die verschiedenenen Fischspezies.....	176
Abbildung 60: Auf den Fettgehalt normierte Bioakkumulationsfaktoren für HHCB und HHCB-ON	178
Abbildung 61: SIM-Chromatogramme für HHCB in der Karausche, Schleie im Vergleich zum Standard	181
Abbildung 62: Separation der Enantiomere des HHCB-Lactons auf der Cyclodextrinphase OV 1701/heptakis (6- <i>O-tert</i> butyldimethylsilyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl)- β -cyclodextrin	184
Abbildung 63: Vergleich der SIM-Chromatogramme der enantioselektiven Analyse von Karauschenproben-Extrakten auf das HHCB-Lacton und HHCB	185
Abbildung 64: Vergleich der SIM-Chromatogramme der weiteren untersuchten Fischproben-Extrakte ..	186
Abbildung 65: Separation der Enantiomere des HHCB-Lactons in der SPMD-Probe des Klärteichs Neumünster.....	186
Abbildung 66: Vergleich der SIM-Chromatogramme der Leberproben-Extrakte für Schleie und Karausche auf das HHCB-Lacton	187
Abbildung 67 : Spektrum des größten Signales der HHCB-Nebenprodukte in Biotaprobe-Extrakten der Klärteichstudie.....	189
Abbildung 68: Strukturvorschläge für die produktionstechnisch bedingten Verunreinigungen des HHCB sowie deren Metabolite	190
Abbildung 69: Enantioselektive gaschromatische Analyse (Ionenspuren 215) des Karauschenproben-Extraktes auf Traseolid®	192
Abbildung 70: Semipräparative enantioselektive HPLC-Trennung von ATII über die stationäre permethyl- β -cyclodextrin-Phase auf 3-Aminopropyl-Kieselgel	193
Abbildung 71: Vergleich der mit Hilfe der HPLC isolierten Enantiomere des ATII mit dem analytischen Referenzmaterial (ATII-Standard)	193
Abbildung 72: Mögliche Transformationsreaktionen von MX in der Umwelt.....	196
Abbildung 73: Biologische Aktivierung von Nitroaromaten und aromatischen Aminen.....	198
Abbildung 74: Ergebnisse der Untersuchung von 2-Amino-MX und 4-Amino-MX im Arabinose-Resistenz-Test (Aus: [196]).....	200
Abbildung 75 : Logarithmische Darstellung der kompetitiven Bindung von 4-Amino-MX (4X), 2-Amino-MX (2X), 2-Amino-MK (2K) Östradiol (E2) und Bisphenol A	205

Tabelleverzeichnis:

Tabelle 1 : Ermittelte Wiederfindungsraten für die Gesamtmethode für vier (Nitro-aromaten) bzw. fünf (Aniline, Triazine) Wiederholungsversuche.....	38
Tabelle 2 : Vergleich der ermittelten Werte für 2 Aalproben und eine Muschelprobe in µg/g FG, die über zwei unterschiedliche Analysenmethoden ermittelt wurden.	41
Tabelle 3: Ausgewählte Ergebnisse der GC-MS-Untersuchung (Aceton- / <i>n</i> -Hexan-Extrakt)	47
Tabelle 4: Ausgewählte Ergebnisse der GC-MS-Untersuchung (Aceton-/ <i>n</i> -Hexan-Extrakt	49
Tabelle 5: Ausgewählte Ergebnisse der Screening-Untersuchung Fraktion 3 (Probe KS11)	51
Tabelle 6: Ausgewählte Ergebnisse Fraktionen 4A und 4H (GC-MS), Probe KS11	52
Tabelle 7: Ausgewählte Ergebnisse der Fraktionen 5a und b (GC-MS), KS11.....	53
Tabelle 8: Literaturvergleich gemessener Irgarol-Konzentrationen.....	59
Tabelle 9: Charakteristische Daten der in dieser Arbeit beprobten Häfen	61
Tabelle 10: Angaben zur Qualitätskontrolle der Sediment- und Wasseranalysen	62
Tabelle 11: Vergleich verschiedener Referenzen bezüglich Extraktionsmethoden und Nachweisempfindlichkeit für Irgarol in Wasser	63
Tabelle 12: Ermittelte Irgarolkonzentration in Wasser [ng/L]; Probenahmeserien 1-3.....	63
Tabelle 13: Literatur-Angaben zur Toxizität des Irgarols.....	65
Tabelle 14: Irgarol-Konzentration im Sediment in ng/g FG der Probenahme 1-3	67
Tabelle 15: Angaben zur Ermittlung des Verteilungskoeffizienten Wasser/Sediment für irgarol in bezug auf den Gehalt an organischem Kohlenstoff.....	71
Tabelle 16: Konzentrationen aller analysierter Organozinnverbindungen in ng/g TG sowie das kalkulierte Verhältnis TBT/Irgarol	71
Tabelle 17: Toxizität des TBT für sensitive aquatische Organismen	75
Tabelle 18: Ergebnisse der GC-MS-Untersuchung ausgewählter Hafensedimente	78
Tabelle 19: Ergebnisse der AFID-Messungen.....	80
Tabelle 20: Ergebnisse der Analyse-Daten in [µg/kg TG] der Arbeitsgruppe Giger.....	81
Tabelle 21: Ergebnisse der Analyse-Daten in [µg/kg TG] der Arbeitsgruppe Schröder.....	82
Tabelle 22: Hydrographische Daten der in die Nordsee mündenden Flüsse.....	84
Tabelle 23: Identifizierte Substanzen dreier ausgewählter Nordsee-Sedimentproben. Konzentrationsangaben in µg/kg Trockengewicht (TG).....	85
Tabelle 24: Konzentrationen ausgewählter Nitroaromaten und des 2,5-Dichloranilins in Nordseewasserproben der Jahre 1990, '93 und '95 in [ng/L]	86
Tabelle 25 :Konzentrationen von HHCB und AHTN in Nordseewasserproben	88
Tabelle 26: Galaxolid- und Tonalidkonzentrationen in µg/kg, analysiert in Nordsee-Sedimenten	88
Tabelle 27: Polycyclische Moschusverbindungen in Sediment.....	89
Tabelle 28: NP und NP1EO in µg/kg TG in Sedimenten aus der Deutschen Bucht	90
Tabelle 29 :Ergebnisse der Screening-Untersuchung dreier Nordseesedimente	100
Tabelle 30: Kriterien, die bei der Auswahl der Biotests zur Bestimmung von Toxizitäten in Sedimenten zu berücksichtigen sind	110
Tabelle 31: Vor- und Nachteile eines chemisch-physikalischen Verfahrensansatz	111

Tabelle 32: Übersicht der in dieser Arbeit eingesetzten Ara-Stämme.....	118
Tabelle 33 :Durchgeführte Überprüfungen auf Hintergrundbelastungen	125
Tabelle 34: Durchgeführte Prüfungen auf Lösungsmittelverträglichkeit der Biotests, jeweils nach Überführung in DMSO.....	126
Tabelle 35: EC ₅₀ -Werte verschiedener Lösungsmittel im Leuchtbakterien-Test (übernommen aus	127
Tabelle 36: Für Vergleichsuntersuchungen ausgewählte Extraktionsmittel und -verfahren	129
Tabelle 37: Zusammenfassende Bewertung der unterschiedlichen Lösungsmittel für die Sedimentextraktion.....	132
Tabelle 38 : Ergebnisse (Leuchtbakterientest) für die unterschiedlichen Verfahren zur Überführung von Lösungsmittelkontrollproben in Wasser.	135
Tabelle 39 : Auswahl in der Schwebstoffprobe Magdeburg identifizierter Alkylbenzole	148
Tabelle 40 : Eine Auswahl der in der Elbe-Schwebstoffprobe bei Magdeburg verifizierten PAH	151
Tabelle 41 : Chlororganische Verbindungen, identifiziert in der Schwebstoffprobe Magdeburg.....	152
Tabelle 42 :Ergebnisse der Untersuchung auf Nitro- und Aminoverbindungen in den Extraktfraktionen für die Probe Magdeburg.....	153
Tabelle 43 : Ermittelte Konzentrationen für die synthetischen Duftstoffe gemessen in der Schwebstoffprobe Magdeburg, im Vergleich zu den Daten einer SPMD-Probe von 1997..	155
Tabelle 44 : Vergleich ermittelter Konzentrationen verschiedener Phthalsäureester in der Schwebstoffprobe Schnackenburg im Vergleich zu einem Extraktionsblindwert	162
Tabelle 45 : Übersicht über die im Klärteich-Experiment insgesamt entnommenen Proben	168
Tabelle 46: Konzentrationen der Moschusverbindungen in einer Klärschlamm- sowie zwei Sedimentproben in [µg/kg] FG	170
Tabelle 47: Konzentrationen der Moschusverbindungen im Klärteichwasser und in SPMD [□]	171
Tabelle 48 : Konzentration des HHCB-Lactons in Sediment-, Klärschlamm- und Wasserproben im Vergleich zu den Gehalten von HHCB	174
Tabelle 49 : Konzentrationen und BAF _{Lipid} von HHCB und HHCB-Lacton in den untersuchten Fischproben des Klärteichexperiments im Vergleich zu den aus SPMD ermittelten Werten.....	175
Tabelle 50 Aus Modellgleichungen ermittelte BAF _{FG} im Vergleich zu den experimentell ermittelten Werten.....	177
Tabelle 51: Konzentrationen und Enantiomeren-Verhältnis für HHCB, gemessen in den unterschiedlichen Fischproben des Klärteichs Neumünster.	182
Tabelle 52: Konzentrationen und Enantiomeren-Verhältnis für das <i>cis/trans</i> -Lacton, gemessen in den unterschiedlichen Fischproben-Extrakten und einer SPMD-Probe des Klärteichs Neumünster.....	187
Tabelle 53 : Fragmentationen der möglicherweise chiralen Nebenprodukte des HHCB in Biotaprobe der Klärteichstudie.....	189
Tabelle 54: Akute Toxizität (EC ₅₀ <i>Daphnia magna</i>) der Amino-Transformationsprodukte des MX (durchgeführt nach OECD Guideline 202)	199
Tabelle 55 : Kalkulierte PEC/PNEC-Daten der Studien von Behechti et al. ^[29] und des RIFM.....	199
Tabelle 56 : Proliferations-Effekt (PE, in %) der untersuchten Moschusduftstoffe (Mittelwerte).....	203

Tabelle 57 : Kompetitive Bindung der Nitromoschusmetabolite sowie Östradiol und Bisphenol A am ER-Rezeptor der Regenbogenforelle und des Krallenfrosches unter Verwendung von ^3H - E ₂	204
Tabelle 58: Verwendete Chemikalien unter Angabe der CAS-Nr., des Herstellers sowie der Gefahrensymbole	215

Abkürzungsverzeichnis:

In dieser Arbeit sind zum Teil die Verbindungen unter Verwendung von Gebrauchs- und Handelsnamen wiedergegeben, es handelt sich hierbei häufig um gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen ®, dieses gilt auch, wenn sie nicht besonders als solche gekennzeichnet sein sollten.

AFID	Alkali-Flammen-Ionisationsdetektor
ADBI	Phantholid®
AHTN	Tonalid®
ATII	Traseolid®
BAF	Bioakkumulationsfaktor
BCF	Biokonzentrationsfaktor
BG	Bestimmungsgrenze
BBP	Benzylbutylphthalat
BW	Blindwert
CA	Chloranilin
CI	Chemische Ionisation
CNA	Chlornitroanilin
CNB	Chlornitrobenzol
CRM	Certified reference material; Zertifiziertes Referenzmaterial
CKW	Chlorkohlenwasserstoffe
DBT	Dibutylzinn
DCA	Dichloranilin
DCM	Dichlormethan
DDD	1,1-Dichlor-2,2-bis(<i>p</i> -chlorphenyl)ethan
DDE	1,1-Dichlor-2,2-bis(<i>p</i> -chlorphenyl)ethen
DDMU	1-Chlor-2,2-bis(<i>p</i> -chlorphenyl)ethen
DDT	1,1,1-Trichlor-2,2-bis(<i>p</i> -chlorphenyl)ethan
DEA	Desethylatrazin
DET	Desethylterbutylatrazin
DEHP	Diethylhexylphthalat
DiA	Di- <i>iso</i> -propylatrazin
DOP	Di-octylphthalat
DPT	Diphenylzinn
ECD	Elektronen-Einfang-Detektor
EC ₅₀	Konzentration mit Effekt bei 50 % der Versuchstiere
EE	Essigsäureethylester
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EINECS	European Inventory of Existing Chemical Commercial Substances
ER	Estrogenrezeptor (α , β)
GC	Gaschromatograph
GPC	Gelpermeations-Chromatographie
HCH	Hexachlorcyclohexan

HPLC	High performance liquid chromatography
HHCB	Galaxolid®
K _{OW}	Octanol / Wasser-Verteilungskoeffizient
K _{TW}	Triolein / Wasser-Verteilungskoeffizient
KW	Kohlenwasserstoffe
LC	Letale Konzentration
LD ₅₀	Letaldosis (50 % Mortalität)
LOEC	Lowest observable effect concentration
m/z	Masse geteilt durch Ladung (Massenspektrometrie)
MA	Moschus-Ambrett
MBT	Monobutylzinn
MK	Moschus-Keton
MPT	Monophenylzinn
MS	Massenspektrometer
MX	Moschus-Xylol
NB	Nitrobenzol
NG	Nachweisgrenze
nn	nicht nachweisbar
nq	nicht quantifizierbar
NOEC	No observable effect concentration
NP	Nonylphenol
NP1EO	Nonylphenolmonoethoxylat
NT	Nitrotoluol
OSPAR	Oslo-Paris-Minister-Konferenz zum Schutz der Nordsee und des Nordost-Atlantiks
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbons
PB	Phenobarbital
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCM	Polycyclische Moschusduftstoffe
PE	Proliferationseffekt
PNEC	Predicted no effect concentration
POPs	Persistent organic pollutants
QC	Quality control; Qualitätslenkung
QS	Qualitätssicherung
SOP	Standard operation procedure - Standard-Arbeitsanweisung
SPMD	Semipermeable membrane device
TBA	Terbutylazin
TBT	Tributylzinn
TIC	Totalionenstrom
TMDTP	O,O,S-Trimethyldithiophosphat
TMTP	O,O,O-Trimethylthiophosphat

1 Einleitung

1.1 Sedimente

Oberflächengewässer sind mit einer Vielzahl an anorganischen und organischen Umweltchemikalien belastet. Es sind mittlerweile zwischen 70.000 und 100.000 organische Substanzen im täglichen Gebrauch, 100.106 existierende Chemikalien sind bereits in den „European-Inventory-of Existing-Chemical-Commercial-Substances“ (EINECS)-Listen enthalten, zwischen 200-1000 synthetische Komponenten kommen jedes Jahr neu auf den Markt.^[1,2] Durch Produktion, Transport, Verwendung oder auch Förderung von Rohstoffen (z.B. Mineralöle) gelangen Schadstoffe in die Gewässer. Direkte Einträge in das aquatische Ökosystem erfolgen u.a. durch den Schiffsverkehr, z.B. Biozide aus Antifoulinganstrichen, Leckagen und nicht zuletzt Verklappung auf See. Ferner gelangt ein Großteil an Kontaminanten über Verbrennungsprozesse und atmosphärische Deposition (Emissionen des KFZ-Verkehrs, Verbrennung von Heizöl etc.) in die Gewässer. Schadstoffe, welche sich in der Wasserphase nur schwer lösen, adsorbieren als lipophile Kontaminanten an Partikeln und sedimentieren mit diesen zum Boden des Gewässers. Geoakkumulative Prozesse verringern kurzzeitig die Belastung der Wasserphase, bilden allerdings in temporären Sedimentsenken Schadstoffreservoirs, die jederzeit durch bestimmte Milieuveränderungen und mikrobiologische Aktivität remobilisiert werden können. Sowohl die Veränderung von pH-Wert, Redoxpotential, Ionenstärke, der Eintrag von Komplexbildnern oder Tensiden als auch biologische Wechselwirkungen und Ausbaggerungen kontaminierter Sedimentschichten können im Sediment reversibel festgelegte Schadstoffe für das Ökosystem wieder verfügbar machen.

Unterschiedliche Transportpfade und Verteilungsmechanismen gebundener und gelöster Schadstoffe im aquatischen System resultieren in einer unterschiedlichen Aufnahme durch Organismen (Bioakkumulation). Ferner verlaufen der enzymatische Abbau im Organismus bzw. biotische oder abiotische Transformation im Sediment in Abhängigkeit von der Persistenz sowie der physikalisch-chemischen Stoffeigenschaften (Wasserlöslichkeit, Polarität etc.) der Substanzen. Idealerweise erfolgt enzymatisch und/oder photochemisch ein vollständiger Abbau (Mineralisierung, Veratmung) zu Kohlendioxid, Wasser, Nitrat, Phosphat, Ammoniak und Methan.

Sedimentgebundene Schadstoffe vermögen zahlreiche biologische Wirkungen ausüben. Bis heute existieren noch erhebliche Wissensdefizite bezüglich des Anreicherungsverhaltens der unterschiedlichen Kontaminanten, so daß für die jeweiligen Schadstoffklassen kaum pauschale Aussagen getroffen werden können, sondern immer noch die Notwendigkeit für spezifische Untersuchungen besteht. Geologisch stellen Sedimente vorläufige oder endgültige Senken natürlicher und anthropogener Materialien dar, gleichzeitig bilden sie biologisch aber auch Habitate für unzählige Organismen und Biozönosen, welche sich in oder auf den Sedimenten befinden.

Aufbau von Sedimenten

Sedimente umfassen detritisches, anorganisches und organisches partikuläres Material. Der Anteil der drei Hauptkomponenten variiert zwischen den Sedimenten, setzt sich aber im allgemeinen wie folgt zusammen:

- Partikuläres anorganisches Material ca. 30 % (70-99% der Trockensubstanz)
- Partikuläres organisches Material ca. 0,2-20 %
- Porenwasser ca. 50-70 %

Die für Wechselwirkungen mit Schadstoffen zur Verfügung stehenden Partikel-Oberflächen werden durch unterschiedliche Korngrößen charakterisiert. Kornfraktionen bzw. Partikelgrößen spielen daher neben dem Gehalt an organischem Kohlenstoff für die Sorption und Verteilung von Schadstoffen, aber auch für die Bioakkumulation in Organismen eine wichtige Rolle.^[3] Dabei vermögen Sedimentfraktionen kleiner Partikelgröße aufgrund ihrer größeren Oberfläche verstärkt Schadstoffe anzureichern. Die Feinstkornfraktionen bilden tonhaltige und schluffhaltige Materialien (2 bis <63 µm), des weiteren unterscheidet man die Fraktion Sand (< 2000 µm). Nicht nur allein lipophile Kontaminanten reichern sich in Sedimenten und Böden an, vielmehr existieren sehr komplexe und unterschiedliche Bindungsarten in Abhängigkeit zu vorherrschenden physikalischen und chemischen Eigenschaften. Tonminerale weisen z.B. durch Kationenaustausch-Prozesse negative oder positive Überschußladungen auf, wodurch sie die Möglichkeit für ionische Bindungen bieten. Ebenso können über freie Cavitäten der mineralischen Oberflächen Ionen eingelagert werden. Abbau und Transformation der Schadstoffe werden durch Einlagerungen stark limitiert, und daher sind Adsorptions-/Desorptionsverhalten entscheidend für die Bioverfügbarkeit der Kontaminanten für Bodenorganismen.^[4,5] Neben van der Waals-Wechselwirkungen (Physisorption) sind weitere intermolekulare Wechselwirkungen für die Adsorption von gelösten und ungelösten Wasserinhaltsstoffen möglich:

- Wasserstoffbrückenbindungen
- Charge-Transfer-Wechselwirkungen
- Ligand-Austausch und Ionen-Bindung
- Direkte und induzierte Ion-Dipol- und Dipol-Dipol-Wechselwirkung
- Sowie kovalente Bindungen (Chemisorption)

Entscheidend für den Transport von Schadstoffen innerhalb der Sedimente ist das Porenwasser. Im Porenwasser gelöste Schadstoffe sind überdies direkt für Organismen verfügbar. Es stellt für die benthische Fauna den Hauptexpositionspfad dar. Der natürliche Wassergehalt des Sedimentes variiert entsprechend der mineralischen Zusammensetzung. Quarzhaltige Sedimente beinhalten geringe Volumenanteile, feinporige Tonminerale, Schlick etc. weisen vielfach Wasser-Gehalte zwischen 50 und 80 Vol. % auf.

Den größten Anteil organischen Materials bilden Biopolymere. Huminstoffe, terpenoide Verbindungen, Steroide, aber auch Kohlenwasserstoffe, Fettsäuren, Fettsäureester und natürliche Stoffwechselprodukte sind neben den Pigmenten (Chlorophyllderivate und Carotinoide) im organischen Material enthalten. Ferner treten die natürlichen organischen Komponenten je nach geologischen und hydrologischen Bedingungen in den unterschiedlichsten Konzentrationen auf, so daß es für gelöste suspendierte oder an Partikel gebundene Stoffe lokal zu erheblichen Variationen kommen kann.

Insgesamt wird der ökologisch aktive Teil der Sedimente aus wenigen Zentimetern der Oberfläche (ca. 2 cm) gebildet, während die tiefer gelegenen Schichten in dieser Hinsicht eher passiv sind. Die Mikroorganismen und auch der größte Teil der organischen Bestandteile sind in den

obersten Schichten lokalisiert. Die unteren Lagen des Sedimentes ermöglichen über das Maß der Tiefe eine Korrelation zur Depositionszeit, sofern keine Durchmischung über Bioturbationsprozesse oder Strömungen und Aufschwemmungen vorliegen. Sedimentbohrkerne erlauben daher auch eine Analyse lipophiler Stoffe integrativ über längere Zeitabschnitte.

Verteilung organischer Stoffe im Sediment:

Um die Dynamik von Chemikalien im Ökosystem zu erfassen und vorhersagen zu können, benötigt man experimentelle Daten zur Verteilung, Persistenz, zum Dispersionsverhalten und zu den Umwandlungsraten unter biotischen und abiotischen Bedingungen. Für Vorhersage und Aufklärung von Biokonzentrationsfaktoren werden inzwischen Strukturanalysen in Form der „Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR)“ neben chemischen und biochemischen Methoden herangezogen. Bei der hohen Zahl neu eingeführter Chemikalien erscheint es unmöglich, alle Langzeit-Toxizitätsprüfungen zu unterwerfen.

Verschiedene Modelle beschreiben mathematisch die möglichen Austauschprozesse der Kontaminanten zwischen wäßriger und partikulärer Phase bzw. den Organismen (Biota) und charakterisieren darüber das Verhalten der Chemikalien in der Umwelt. Unter der Annahme (Voraussetzung), daß sich die Konzentrationen der gelösten Schadstoffe und der adsorbierten/akkumulierten Schadstoffe im dynamischen Gleichgewicht befinden, werden nach dem Nernstschen Verteilungsgesetz Verteilungskoeffizienten (K) formuliert:

Der Biokonzentrationsfaktor beschreibt die Verteilung zwischen den in Lipiden biologischer Matrix enthaltenen und den in wäßriger Phase gelösten Kontaminanten. Als Modell der Konzentrationsverteilung dient vielfach ein in Laborstudien ermittelter Octanol-Wasser Verteilungskoeffizient (log K_{OW}).

$$\boxed{K_{OW} = \frac{C_{n-Octanol}}{C_{Wasser}}} \qquad \boxed{BCF = a \cdot \log K_{OW} + b} \qquad (1), (2)$$

$C_{n-Octanol}$ = Konzentration der Verbindung in *n*-Octanol

C_{Wasser} = Konzentration der Verbindung in Wasser [pro L]

Das Adsorptionsvermögen am partikulären Material wird durch den K_d -Wert (Distributionskoeffizient partikuläres Material/wäßrige Phase) angegeben. Für nichtionische Verbindungen, hoher log K_{OW} -Werte (>5), wurde eine lineare Abhängigkeit zum Gehalt an organischem Kohlenstoff über weite Konzentrationsbereiche im Sediment festgestellt.^[6,3,7] Dieses ermöglicht die Normierung für hydrophobe Verbindungen auf den TOC-Gehalt. Man spricht dann vom K_{OC} .

$$\boxed{K_d = \frac{C_{sorb}}{C_{Wasser}}} \qquad \boxed{K_{OC} = \frac{K_d \cdot 100\%}{TOC}} \qquad (3), (4)$$

C_{sorb} = Konzentration partikulär gebunden [pro kg]

Die Affinität und das Bindungsverhalten ändert sich durch die Polarität des Sorbens und des Adsorbens. Für unterschiedlich hydrophobe Verbindungen wurde eine Erweiterung der Gleichung 4

etabliert, wobei die Regressionskoeffizienten a und b häufig stark zwischen den untersuchten Verbindungen variieren.

$$\log K_{OC} = a \cdot \log K_{OW} + b \quad (5)$$

Die Modelle sind in einfacher Form geeignet, die unterschiedlichen Affinitäten aufzuzeigen. Es bietet aber keine Möglichkeit, in einem System gemessene Koeffizienten auf ein anderes System zu übertragen, da die Einflüsse bestimmter Lösungs- oder Feststoffparameter wie pH-Wert, Salzgehalt und Temperatur nicht berücksichtigt sind. Erweiterte Modelle unter Berücksichtigung der Sorptionskinetik sind das Isothermenmodell nach Langmuir oder auch Freundlich und Tempkin. Sie interpretieren die Abhängigkeit der Sorption von der Konzentration des sorbierten Stoffes.

Für ionische organische Verbindungen reduziert sich die Affinität zum partikulären Material häufig stark, während die Transportgeschwindigkeit über das im Sediment enthaltene Porenwasser hingegen steigt. Saure Verbindungen wie Phenole oder organische Säuren gehen durch Abgabe eines Protons in Lösung. Durch Bildung des Anions erhöht sich die Wasserlöslichkeit, und gleichzeitig reduziert sich damit dessen Sorptionsmöglichkeit.

Alle genannten Formen können auf die Natur nur eingeschränkt übertragen werden. Die Lage des Gleichgewichts ist von unterschiedlichen Stoffparametern abhängig, wobei neben dem Verteilungskoeffizienten und der Wasserlöslichkeit auch der Sättigungsdampfdruck, Salzgehalt und die Henry-Konstante zu berücksichtigen sind. Vor allem für hydrophobe Verbindungen erweist sich jedoch der Octanol/Wasser-Koeffizient als hinreichend exakte Näherung.

Bioakkumulation:

Die biologische Anreicherung (Bioakkumulation) erfolgt über unterschiedliche Wege. Der Hauptaufnahmepfad für Organismen wird in erster Linie durch Gleichung 2 wiedergegeben. Ferner ist die Aufnahme über die Nahrung für Kleinstorganismen nicht ungewöhnlich. Die Anreicherung organischer Kontaminanten in Bodenlebewesen erklärt letztendlich auch die Akkumulation über die Nahrungsnetze in höchster trophischer Stufe. Entscheidend für den Verbleib der Substanzen ist die Persistenz der Schadstoffe. Für viele Anwendungen wurde aber gerade die Beständigkeit organischer Chemikalien angestrebt, was sie doch Voraussetzung für ihren technologischen Einsatz. Diesen vermeintlichen Vorteil erkaufte man sich durch sehr geringe biotische und abiotische Umwandlungen der Substanzen. Abbildung 1 zeigt im Modell die unterschiedlichen Quellen des Schadstoffeintrages in die Gewässer, verknüpft mit Verbleib und Transformation der Kontaminanten im Ökosystem.

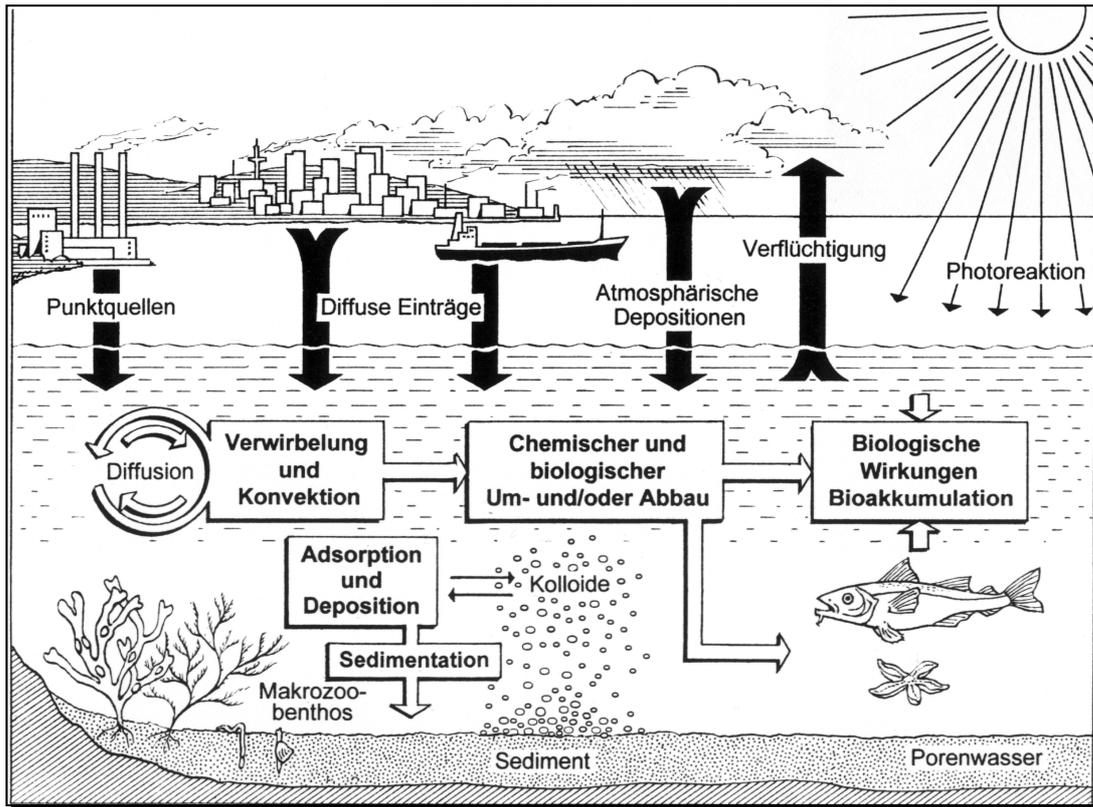


Abbildung 1: Umweltchemikalien im aquatischen System, Eintrag und Verbleib der Stoffe

1.2 Toxizitätsgeleitete Untersuchung von Sedimenten

Für die Erfassung des Gewässerzustandes und die Entwicklung von Maßnahmen zur Verbesserung der Sedimentqualität der Gewässer sind spurenanalytische Untersuchungen von grundlegender Bedeutung. Abhängig von der jeweiligen Fragestellung wurden mittlerweile zahlreiche Analyseverfahren zur Untersuchung von Sedimenten auf organische Rückstände entwickelt.^[8] Eine Analyse kann für das Gesamtsediment erfolgen, entsprechend der jeweiligen Zielsetzung sind ebenso partielle Untersuchungen üblich (Porenwasser, partikuläres Material). Grundsätzlich ist zwischen Methoden zu unterscheiden, welche zur Ermittlung ausgewählter Umweltchemikalien konzipiert wurden (Target-Untersuchungen) und Untersuchungen, deren Ziel eine Bestandsaufnahme von organischen Schadstoffen in Sedimenten ist („Screening“). Letzterem kommt im Zusammenhang mit ökotoxikologischen Verfahren zentrale Bedeutung zu, wobei eine Gesamtcharakterisierung der komplexen chemischen und biologischen Belastung angestrebt wird.

Ist eine Substanzgruppe oder ein Einzelstoff aufgrund von hoher Persistenz und Bioakkumulation auffällig geworden, erfolgt eine zielgerichtete Analytik zur Erfassung der Belastung in der Umwelt. Die Analyse von chlorierten Kohlenwasserstoffen, PAK, Pestiziden oder auch der immer noch aktuellen Organometallverbindungen, wie z.B. Tributylzinn, ist bereits in Routine-Untersuchungen der Überwachungsanstalten integriert. Sogenannte klassische Untersuchungen liefern Informationen über Konzentrationen und Schadstoffmuster in den verschiedenen Kompartimenten und unterschiedlichen trophischen Ebenen der marinen und terrestrischen Ökosysteme. Darüber hinaus ist es Ziel erweiterter Untersuchungen, mögliche Transformationsprodukte der Umweltchemikalien zu erfassen,

da diese nicht selten im Vergleich zu ihren Stammverbindungen eine höhere Stabilität, ein größeres Anreicherungspotential und eine stärkere Toxizität aufweisen.

Durch die quantitativen Daten allein läßt sich jedoch keine Beziehung im Hinblick auf reale Belastung, d.h. bioverfügbare Schadstoffgehalte und daraus resultierende Gefahren für Lebensgemeinschaften, ableiten.

Die Frage, welche Stoffe in welchen Konzentrationen überhaupt als Schadstoffe oder Gifte und damit als gefährlich für die Umwelt zu bezeichnen sind, ist Gegenstand der Ökotoxikologie. Für die Bewertung und Einteilung des Gewässersedimentes existieren mittlerweile verschiedene Ansätze. Im Prinzip sind die Konzepte biologischen und chemischen Prozessen im Ökosystem nachempfunden, um schließlich die Belastungsschwerpunkte aufzuspüren und in den verschiedenen Kompartimenten zu berücksichtigen. Viele biologische Testsysteme wurden ursprünglich für wäßrige Phasen entwickelt und können nicht ohne weiteres auf Sedimente übertragen werden. Toxizitätstest mit Sediment bzw. für in den Sedimenten lebende Organismen existieren bis heute in nicht ausreichendem Maße, betrachtet man das breite Spektrum an organischen Kontaminanten. Die Berechnungen für eine Risikoabschätzung bzw. ein Chemikalien-Ranking-Verfahren für Sedimente basieren daher vielfach auf Daten, die für die aquatische Phase ermittelt wurden. Es erfolgt dann eine Transformation der Werte analog der in den Technical Guidance Documents (TGD) beschriebenen Gleichgewichtsverteilungs-Methoden.^[9] Einfließende Parameter sind die Konzentrationen der Kontaminanten im Wasser und im Sediment, die Dichte, Feststoffanteil und der Wassergehalt des Sediments sowie eine Reihe verschiedener Verteilungskoeffizienten der jeweiligen Chemikalie zwischen den verschiedenen Phasen. Eine Anwendung dieses Ansatzes wird allerdings nur für Verbindungen mit einem $\log K_{ow}$ über 5 empfohlen und dieser ist damit für viele Stoffe unbrauchbar.

Qualitätskriterien für Sedimente erfordern neben einer chemischen Analyse und einer ortsspezifischen biologischen Untersuchung auch eine ökotoxikologische Bewertung. Die Bioverfügbarkeit von Stoffen kann infolge wechselnder Sedimentcharakteristiken und organismischer Eigenschaften (Ernährungs-, Respirationsarten, Verhaltenseigenschaften) auf einem Raum von wenigen Zentimetern stark variieren. Da es sich bei Sedimenten um äußerst komplexe und heterogene Systeme handelt, ist eine Vorgehensweise, wie sie für die Wasserqualität etabliert wurde, hier ungeeignet.

Durch Kombination chemischer, ökotoxikologischer und biologischer Untersuchungsmethoden wird seit den achtziger Jahren versucht, die Vorteile der chemischen Analyse und der biologischen Untersuchungsverfahren zu verbinden und eine einheitliche Vorgehensweise zur Sediment-Bewertung zu finden.

Sediment-toxikologische Untersuchungen können zum einen im Labor unter Berücksichtigung des Gesamtsediments erfolgen, zum anderen sind auch Felduntersuchungen möglich. Neben dem Gesamtsediment werden Porenwasser, Eluate und organische Extrakte geprüft. Für die ökotoxikologische Bewertung werden allgemein unterschiedliche Testorganismen und toxikologische Endpunkte vorgeschlagen.^[10]

Als Beispiele für integrative Konzepte zur Untersuchung kontaminierter Sedimente sind der bereits erwähnte Gleichgewichtsverteilungs-Ansatz nach di Toro^[11] zu nennen, welcher sich vor allem

für Belastungen mit hydrophoben Verbindungen eignet. Zur Beurteilung von Einflüssen ionischer Chemikalien ist nach Adams et al. der Hydrophobie-Index über die kritische Mizellenkonzentration (CMC-Ansatz) geeignet.^[12] Im weiteren erlangten der Schwellenwert-Ansatz (Apparent-Effect-Threshold, AET) und der Acid-Volatile Sulfide-Ansatz (AVS) für Metalle neben reinen biologisch-ökotoxikologischen Konzepten der Untersuchung von Biozönosen besondere Bedeutung.^[12,13,14] Mit der Sediment-Triade von Chapman ist das bisher umfangreichste Konzept für eine Qualitätsbewertung von Sedimenten erarbeitet worden, worin verschiedene biologisch-toxikologische Untersuchungen (Biotests), chemische Analysen anorganischer und organischer Inhaltsstoffe und ökologische *in situ*-Untersuchungen kombiniert sind.^[15] Ein etwas modifizierter integrierter Ansatz wurde von van der Guchte als sogenannte „hot spots-Untersuchungen“ vorgeschlagen und zur ortsspezifischen Bewertung hochkontaminierter Sedimente in den Niederlanden angewendet.^[16]

Verunreinigte Sedimente aus Fließ- und Stillgewässern sowie Schlämme aus Kläranlagen fallen in Deutschland und weltweit in großen Mengen an. Angesichts der Tatsache, daß jährlich Millionenbeträge für Sanierung, Ausbaggerung und Deponierung hochkontaminierter Sedimente der Fahrrinnen und Küstengewässer investiert werden müssen, werden mittlerweile vermehrt Anstrengungen unternommen, eine Risikoabschätzung für Sedimente durchzuführen.

1.3 Organische Spurenanalytik in Sedimenten

Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit war die Belastung mariner Sedimente der Nordsee mit organischen Kontaminanten. Durch die Entwicklung neuer Analyseverfahren sollte die Erfassung verschiedener organischer Schadstoffklassen, mit einer großen Bandbreite von chemischen Eigenschaften, ermöglicht werden. Ferner galt es durch Integration von Sediment und Schwebstoffanalysen vorhandene Datensätze der Substanzklassen synthetischer Moschusduftstoffe, ökosystemrelevanter Triazine, chlorierter Aniline, Nitroaromaten sowie Organophosphorsäureester zu erweitern. Hierbei ist die Verbindungsklasse der Moschusduftstoffe durch höhere Belastungen in der Wasserphase und Anreicherung in aquatischen Organismen auffällig geworden.^[17-20] Des weiteren sollte der Verbleib hydrophiler Kontaminanten, wie es z.B. Irgarol als Triazinderivat darstellt, eingehend untersucht werden. Irgarol 1051 gilt als Ersatzstoff für die im Sportbootbereich (Länge < 25 m) mittlerweile nicht mehr verwendeten giftigen Tributylzinn(TBT)-Verbindungen. Antifoulingmittel werden als Biozide allgemein in Schiffsanstrichen gegen den Bewuchs von aquatischen Organismen eingesetzt.

Nicht nur die entwicklungsmethodischen Aspekte standen bei diesem Target-Analytik-Teil der vorliegenden Arbeit im Vordergrund, vielmehr erschien es zwingend notwendig, über Verbleib, Verteilung, mögliche Transformation und biologische Wirkung der genannten Verbindungen neue Erkenntnisse zu erlangen.

1.4 Moschusduftstoffe: Verwendung, Umweltrelevanz, toxikologische Bedeutung, Chiralität

Verwendung

Als Moschusduftstoffe (MD) werden die synthetischen Geruchsstoffe bezeichnet, welche in ihren Geruchseigenschaften dem natürlichen Moschus, Moschus-Muscon, nachempfunden sind. Als Geruchsverbesserer werden sie Haushaltsreinigern, Waschmitteln und Kosmetika in erheblichen Mengen zugesetzt. Das Bukett eines Parfüms ist Resultat komplexer Mischungen von Duftstoffen in Duftessenzen. Parfümmixturen enthalten zumeist verschiedenste Moschusduftstoffe, neben bis zu 200 weiteren Geruchsstoffen. Der Chemiker Baur entdeckte 1891 die erste synthetische Nitromoschusverbindung, noch bevor der Naturstoff endgültig isoliert und aufgeklärt war. In den fünfziger Jahren wurden mit den polycyclischen Moschusverbindungen (PCM) weitere Verbindungen moschusartiger Geruchseigenschaften gefunden. Seit Anfang der neunziger Jahre kam es in Europa im Zusammenhang mit der Diskussion um die Schädlichkeit der Nitromoschusverbindungen (Moschus-Xylol) und vor allem aufgrund des hohen Bioakkumulationspotentials der Verbindungen zunehmend zur Umstellung auf die PCM, wodurch diese besondere kommerzielle Bedeutung erlangt haben. Beide synthetischen Substanzgruppen und die sogenannte 3. Generation der MD, die Makrocyclen, welche dem Naturstoff (Muscon) strukturell am ähnlichsten sind, wurden in den letzten Jahren aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des Naturstoffes in großen Mengen produziert. Weltweit werden derzeit etwa 8000 t/a der Verbindungen hergestellt, hiervon fallen über 70 % auf die PCM Galaxolid (HHCB) und Tonalid (AHTN), den Rest bilden hauptsächlich Nitromoschusverbindungen (NM). Abbildung 2 zeigt die bedeutendsten Substanzen der polycyclischen und Nitromoschus-Duftstoffe^[20,22].

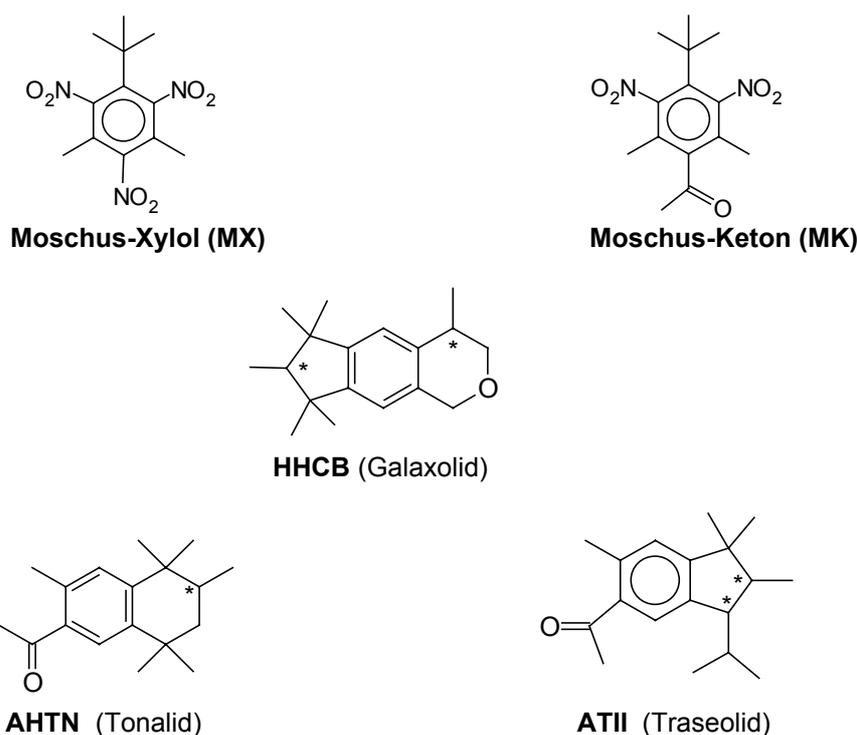


Abbildung 2: Konstitutionsformeln wichtiger synthetischer Moschusverbindungen

Umweltrelevanz und Toxizität synthetischer Moschusverbindungen

- Mittlerweile wurden Moschusduftstoffe in nahezu allen Umweltkompartimenten nachgewiesen, Konzentrationen und Vorkommen sind ausführlich von Rimkus et al.^[17], Eschke et al.^[21], Balk und Ford^[22] beschrieben.
- Die Verbindungen wurden in hohen Konzentrationen in aquatischen Systemen in Abhängigkeit von ihren Eintragsquellen (Kläranlagen) analysiert^[17-22]. Synthetische Moschusverbindungen können damit als typische Bioindikatorsubstanzen für die Belastung von Gewässern mit kommunalen Abwässern oder Einträgen von ungeklärten Abwässern verwendet werden.
- Die Substanzen gelten als persistent und lipophil, vor allem MX und MK zeigen ein hohes Bioakkumulationspotential. Ihre chemischen Eigenschaften machen sie zu schwer ersetzbaren Parfümbestandteilen, denn gerade die relative Persistenz ist für die Anwendung der Duftstoffe, beispielsweise als Parfümbestandteile und Waschmittelzusätze, unabdingbar. Ideale Charakteristiken sind eine hohe Stabilität während der Lebenszeit des Produktes sowie ein rascher Bioabbau nach Verwendung.
- Lipophilie und fixative Eigenschaften der Produkte führten zur Anreicherung/Aufnahme im menschlichen Organismus (Muttermilch, Humanfett) als Folge von intensivem Hautkontakt bei Gebrauch von Reinigungsmitteln bzw. Kosmetikprodukten.^[23]
- In jüngster Zeit wird als weiterer Aufnahmepfad die Inhalation über die Innenraumluft diskutiert, nachdem vor allem PCM durch hohe Luftgehalte auffällig wurden.^[24]
- Für die Nitromoschusverbindungen MX und MK wurde die Transformation zu Nitroaminoverbindungen (potentiell krebserzeugend) und deren Anreicherung in verschiedenen Umweltkompartimenten nachgewiesen.
- Im bezug auf Untersuchungen zur aquatischen Toxizität und ökotoxikologischen Wirkung soll an dieser Stelle auf eine umfangreiche niederländische Studie zur Umweltrisikoaabschätzung für MX und MK verwiesen werden.^[25]
- Von Balk und Ford wurden 1999 Daten zur aquatischen und Ökotoxizität veröffentlicht und eine Risikoabschätzung für die PCM verfaßt.^[26] Sie ermittelten für AHTN und HHCB „Predicted no Effect Concentrations“ (PNEC) von 3,5 und 7 µg/L und „No Observable Effect Concentration (NOEC) für Fische, Algen und Daphnien zwischen 35 und 280 µg/L (AHTN) und 70-280 µg/L (HHCB).

Für zwei der synthetischen Duftstoffe ist eine signifikante Toxizität für den Menschen nachgewiesen worden. Es handelt sich dabei einmal um den Nitromoschusduftstoff Moschus Ambrette (kanzerogene, phototoxische und neurotoxische Eigenschaften) und zum anderen um die PCM-Verbindung Versalid. Versalid hat sich als stark neurotoxisch erwiesen und wurde daraufhin 1980 aus dem Handel gezogen. Gleiches galt wenig später auch für Moschus-Ambrette. Die akute Toxizität der häufiger verwendeten Nitromoschus- und polycyclischen Moschusverbindungen ist nicht hoch. Ihre chemische Stabilität, biologische Resistenz und lipophilen Eigenschaften führen jedoch zur Anreicherung im Fettgewebe ähnlich den PCB. Für MX wurde eine erhöhte Tumorbildungsrate in Mäusen nach oraler Applikation nachgewiesen^[27]. MX und MK sind als Co-Mutagene für eine große Zahl PAK und aromatischer Amine identifiziert worden.^[28] Lediglich eine Studie von 1998 existiert zur

Toxizität der Transformationsprodukte, wobei für das 4-Amino-Moschusxylool eine sehr hohe zelltoxische Wirkung festgestellt wurde.^[29] Da der Nachweis und allgemein die Analytik der Verbindungen im aquatischen Ökosystem die Grundlage der hier präsentierten Untersuchungen bilden, waren nähere Untersuchungen zu dieser Problematik in der vorliegenden Arbeit von hohem Interesse. Die Fragestellung zu möglichen mutagenen Wirkungen und der endokrinen Effekte werden im Kapitel 4.4 ausführlich diskutiert. In der aktuellen Diskussion um den Einsatz der Moschusverbindungen (PCM und NM) und eine damit verbundene mögliche Gesundheitsgefährdung steht vor allem ihre hohe Lipophilie und die damit verbundene Anreicherung auch im menschlichen Fettgewebe und der Muttermilch im Vordergrund. Bei Substanzen mit langen biologischen Halbwertszeiten können auch geringe Toxizitäten akkumulativ eine wichtige Rolle spielen, zumal über Langzeitwirkung und Transformationswege der synthetischen PCM bis heute wenig bekannt ist.

Chiralität:

Bei den mittlerweile produktionstechnisch bedeutendsten synthetischen PCM handelt es sich um chirale Substanzen mit zumeist einem oder zwei chiralen Zentren. Die Verbindungen werden als Enantiomeren- und Diastereomere gemischt hergestellt und in den jeweiligen Handelsprodukten eingesetzt. Eine Auftrennung in die einzelnen Stereoisomere bzw. deren selektive Synthese erweist sich generell als kosten- und zeitaufwendig und spielt daher industriell für diese Verbindungsklasse bisher keine Rolle.

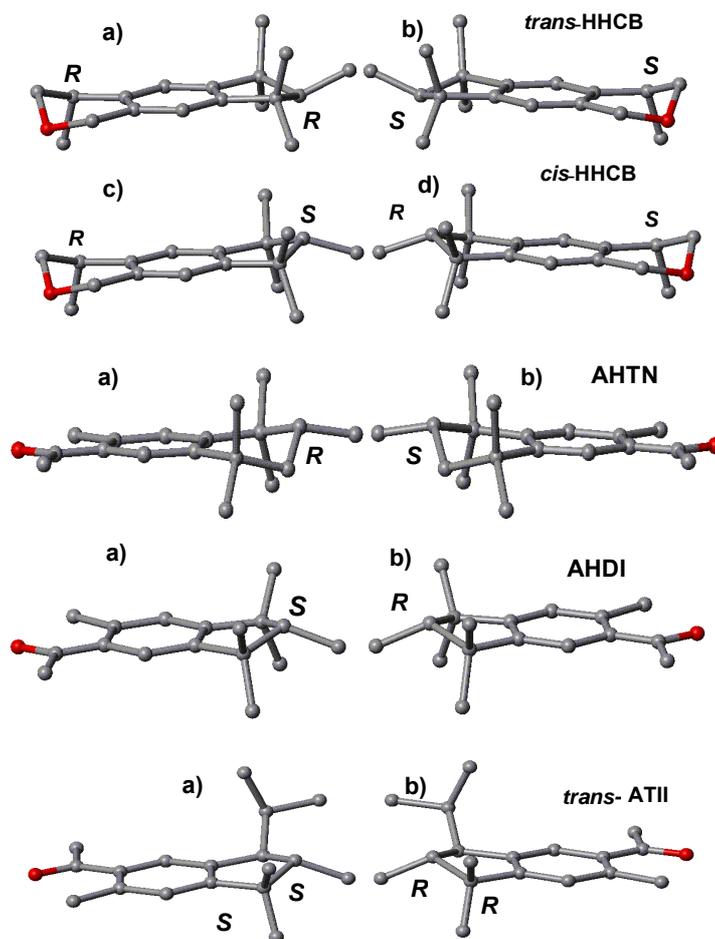


Abbildung 3: Stereoisomere des HHCB, AHTN und ATII.

Enantiomere vieler Duft- und Aromastoffe weisen charakteristische sensorische Eigenschaften auf. Die Physiologie des menschlichen Geruchssinn ist außerordentlich komplex und weist wie viele biologische Systeme eine enantioselektive Erkennung auf. Über den Geruch ist der Mensch in der Lage, diese wie Bild und Spiegelbild aufgebauten Stereoisomere zu unterscheiden. Auch wenn Beschreibungen des Duftes ihrem Wesen nach subjektiv sind und nur als bildhafte Umschreibungen gelten können, läßt sich daraus bereits die Bedeutung der Chiralität für geruchsaktive Stoffe ableiten. Wie verschieden der Geruch der Enantiomere sein kann, läßt sich beispielhaft anhand der folgenden Abbildung 4 über die Beispiele Limonen und α -Terpineol aufzeigen.

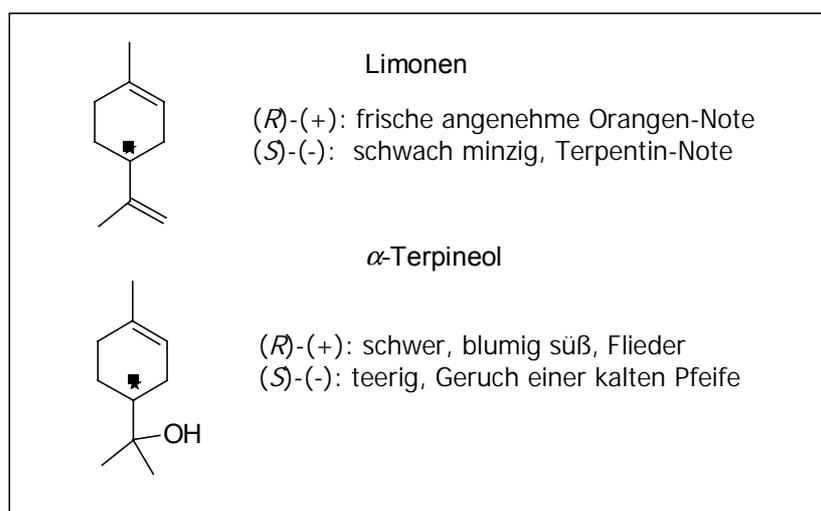


Abbildung 4: Sensorische Bewertung von Limonen und α -Terpineol

Frater et al. verdeutlichten über die enantioselektive Synthese des HHCB eindrucksvoll die unterschiedlichen Dufteigenschaften der 4 Stereoisomere.^[30] Die Autoren konnten für jeweils ein Enantiomer der beiden Diastereomere den typischen Moschusduft erkennen, während die beiden weiteren Enantiomere einen wesentlich schwächeren Duft aufweisen.

Chirales Erkennen ist schon häufig als wichtiges Wirkprinzip der belebten Natur beschrieben worden. Angenehme Düfte sind für das Wohlbefinden des Menschen von großer Bedeutung, auch ihre mögliche Wirkung als Pheromone ist hier zu erwähnen. Pheromone zeichnen sich ebenso häufig durch stereochemische Eigenschaften aus. So ist für einige Verbindungen bekannt, daß nur ein Enantiomer biologisch aktiv ist, andere zeigen lediglich im Zusammenwirken aller Stereoisomere einen Effekt. Nicht selten werden die tierischen Lockstoffe den Parfüm-Essenzen in geringen Mengen beigemischt.^[31]

Enantioselektive Prozesse wie Transformation oder auch stereoselektive Anreicherung sind bereits für viele Umweltchemikalien wie zum Beispiel α -HCH, Bromocyclen, Chlordan und auch PCB beobachtet worden. Zum Teil werden nach erfolgter Biotransformation chirale Produkte erhalten, so daß auch in zweiter Generation enantioselektive Prozesse beobachtet werden. Dies konnte beispielsweise jüngst für die Methylsulfonyl-PCB nachgewiesen werden.^[32,33]

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage nach selektiven Methoden zur analytischen Differenzierung der synthetischen Duftstoffe und ihrem möglicherweise enantioselektiven Auftreten in Umweltkompartimenten. Da ein potentieller Unterschied der jeweiligen Enantiomere nicht nur in ihrem Duftverhalten, sondern vielmehr in unterschiedlicher Toxizität denkbar ist, waren u.a. auch stereoselektive Untersuchungen der populärsten PCM Gegenstand der hier präsentierten Arbeiten.

2 Sedimentanalytik

2.1 Methodenentwicklung

Die Methodenentwicklung hatte verschiedene Anwendungsgebiete zu berücksichtigen, wobei folgendermaßen vorgegangen wurde: Zunächst wurde mit Hilfe von ausgewählten Standardsubstanzen eine Multimethode für hydrophile Stoffe in Sedimenten erarbeitet, welche aber auch lipophile Stoffe mit erfassen sollte. Als Hauptkriterium sollte ein möglichst breites Spektrum unterschiedlich polarer organischer Stoffe berücksichtigt werden, damit die Methode auch für Screening-Untersuchungen eingesetzt werden kann. Ein weiteres Ziel war die Anwendbarkeit als Multi-Rückstands-Analysemethode für unterschiedliche Feststoffproben. Durch geringe methodische Modifizierung wurde versucht, die Analytik auf Klärschlämme und Biotaprobe zu übertragen. Diese Strategie ist vor dem Hintergrund zu sehen, mit einer Methode möglichst viele unterschiedliche Anwendungen zu realisieren, da hierdurch Ergebnisse besser miteinander vergleichbar werden. Als zentralen Bestandteil enthalten diese Anwendungsbeispiele immer eine Lösungsmittelextraktion nach dem Soxhlet-Verfahren, eine säulenchromatographische Aufreinigung unter Verwendung von Aluminiumoxid und/oder Kieselgel bzw. Bio-Bead-Gel für die Größenausschlußchromatographie. Bei Screeninganalysen und Multimethoden liegt der Schwerpunkt auf einer erschöpfenden Extraktion und einem schonenden Clean-up-Verfahren. Zudem gilt ein Hauptaugenmerk der Abtrennung von elementarem Schwefel und Fettsäureestern.

Ein weiterer Abschnitt dieser Arbeit befaßt sich mit der Methodenentwicklung und Modifikation für biotestgeleitete Anwendungen, für die biotestkompatible organische Probenextrakte benötigt werden, und damit zusammenhängend die biotestgeleitete chemische Screening-Analyse.

2.1.1 Zielsetzung der Methodenentwicklung zur Analyse von Sedimenten

- ⇒ Erfassung einer möglichst hohen Anzahl organischer Schadstoffe aus dem Gesamtsediment.
- ⇒ Quantitative Erfassung ausgewählter N- und P-haltiger Verbindungen mit besonderer Berücksichtigung von Irgarol 1051, sowie der Moschusverbindungen.
- ⇒ Durch geringe Modifikation der Methode soll es möglich sein, gleichermaßen Proben variierender Belastung und unterschiedliche Feststoffproben zu analysieren.
- ⇒ Der Kenntnisstand zur Stoffchemie der Sedimente bzw. von Biotaprobe soll für den polaren Bereich erweitert werden.
- ⇒ Um die für eine Spurenanalyse notwendigen niedrigen Nachweisgrenzen zu erreichen, ist eine gute Abtrennung der Matrix von den Analyten notwendig.
- ⇒ Die Methode sollte zusätzliche Aussagen über die Verteilung der Schadstoffe auf die verschiedenen Phasen (Porenwasser, partikuläres Material) ermöglichen.
- ⇒ In Kombination mit Biotests sollen Substanz-Wirkungs-Beziehungen hergestellt werden.

2.1.2 Schema der Analysenmethode für Festmatrices

Eine genaue Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte ist in den Standard-Arbeitsanweisungen im Anhang, im Kapitel der „Standard Operation Procedure“ (SOPs), enthalten und wurde daher an dieser Stelle nicht aufgenommen. Anhand der SOP-Codierung rechtsseitig der Analyse-Schemata können die einzelnen Schritte und Handlungsanweisungen zugeordnet werden. In der Erarbeitung der SOPs wurde eine maximale Modul-Kompatibilität angestrebt, um so die einzelnen SOPs für übereinstimmende Arbeitsschritte in unterschiedlichen Methoden zu verwenden.

Im Laufe der Methodenentwicklungsphase wurde festgestellt, daß unterschiedlich verfeinerte Clean-up-Verfahren sinnvoll waren. Daher existieren verschiedene Analyse-Schemata für schwächer bzw. stark belastete Sediment Proben. In Abbildung 5 wird die maximale Aufsplittung gezeigt, im weiteren wird erläutert, welche Arbeitsschritte sich minimieren bzw. rekombinieren lassen.

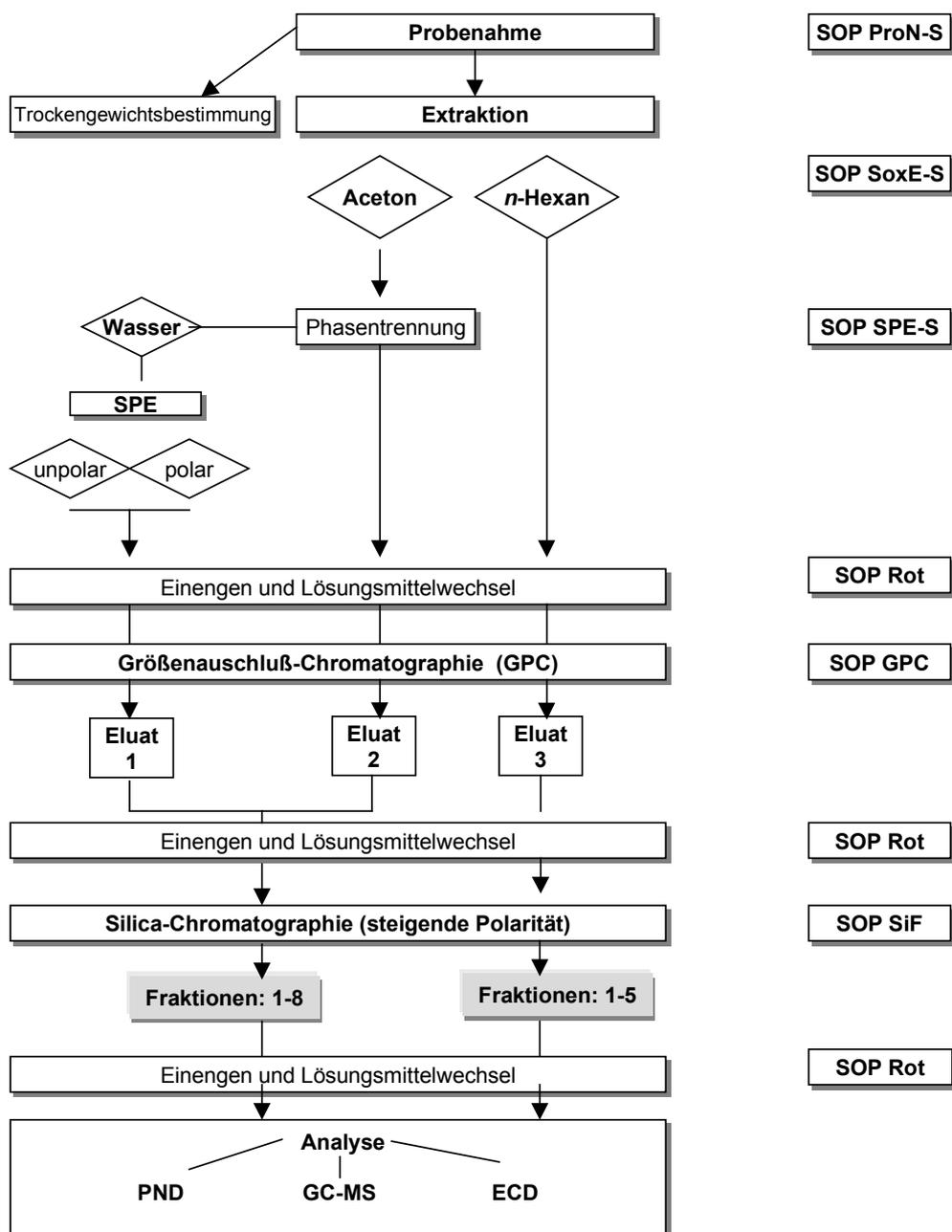


Abbildung 5: Sediment-Analysenschema

2.1.2.1 Probenahme und Lagerung von Sedimenten

Probenahmetechniken:

Für die unterschiedlichen Probenahmeverfahren sind jeweils SOPs im Anhang enthalten, aus denen eine genaue Beschreibung hervorgeht. Je nach Ort- und Zielsetzung standen unterschiedliche Sammeltechniken zur Verfügung:

- a) Backengreifer: Vor allem geeignet für den mobilen Feldeinsatz, wurde z.B. bei der Hafens-Probenahme eingesetzt.
- b) Miniatur-Stechrohr: Entwicklung ebenfalls für kleinere Sedimentkerne im limnischen Bereich.
- c) Kastengreifer: 1. Großvolumig (1 m³); 2. Kleinvolumig (150 x 150 mm).
- d) Geminicorer: Einsatz nur in sehr ton- und schlickhaltigem Untergrund möglich.

Im folgenden ist für die Probenahmetechnik zu beachten, daß der natürliche Wassergehalt des Sediments, wenn möglich, unverändert bis zur Extraktion erhalten bleibt.

Probenlagerung:

Am besten geeignet ist eine Lagerung bei etwa 253 K (-20 °C). Die Proben wurden sofort nach der Probenahme gekühlt, um mögliche Alterungsprozesse zu vermeiden. Zeitpunkt der Probenahme, Beginn und Zeitraum der Probenlagerung wurden in sogenannten Probenahmeprotokollen aufgezeichnet. Ein Beispielexemplar hierzu ist im Anhang enthalten.

2.1.2.2 Extraktionsverfahren für die Analyse von Sedimentproben

Für die Sedimentextraktion stehen unterschiedliche technische Geräte und organische Extraktionsmittel zur Auswahl. Aus Literaturdaten ließ sich ableiten, daß die heutzutage bereits weit verbreiteten automatisierten Extraktionsmöglichkeiten, wie z.B. die „Supercritical-Fluid-Extraction“ (SFE) und die Weiterentwicklung zur „Accelerated Solvent Extraction“ (beschleunigte Lösungsmittelextraktion, ASE), für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angestrebten methodischen Ziele nur sehr eingeschränkt eingesetzt werden könnten. Begrenzungen werden vorwiegend bei den erforderlichen Probenvolumina deutlich, aber auch der Anspruch, eine getrennte Analyse der vorhandenen wäßrigen Phase und der Feststoffe durchzuführen, wird häufig nicht erfüllt. Andererseits werden bei der SFE und ASE durch Automatisierung und Druckminderung wesentlich kürzere Extraktionszeiten als beim Soxhlet-Verfahren erreicht, wodurch gleichzeitig auch ein geringeres Kontaminationsrisiko vorhanden ist. Ferner werden in den meisten Fällen deutlich geringere Lösungsmittelmengen benötigt, wodurch wiederum die Verwendung von Dichlormethan als vertretbar angesehen werden kann. Allerdings erfordern diese Geräte im Vorfeld bei Anschaffung und Etablierung der Verfahren einen wesentlich höheren zeitlichen und finanziellen Aufwand. In einer Voruntersuchung erwies sich das Verfahren der Soxhlet-Extraktion im Hinblick auf die diskutierte Zielsetzung und unter Berücksichtigung vorhandener technischer Möglichkeiten als die Methode der Wahl.^[8,34] Hierauf aufbauend galt es durch die Auswahl geeigneter Extraktionsmittel die Grundlage für eine vielseitige Anwendung und hohe Leistungsfähigkeit der Analysemethode zu schaffen:

- ⇒ Erfassung von Substanzen unterschiedlicher Polarität und Flüchtigkeit.
- ⇒ Verwendung von Matrices mit natürlichem Wasseranteil.
- ⇒ Die Extraktionsmittel und das Verfahren sollten eine Trennung in verschiedene Testphasen (Wasser, partikuläres Material und Lipidgehalt) ermöglichen.
- ⇒ Über die Extraktion sollen Inhaltsstoffe möglichst vollständig erfaßt werden. Dabei sollen bestimmte Zielverbindungen mit hohen Wiederfindungsraten extrahiert werden.
- ⇒ Um die Nachweisgrenzen zu senken, ist der Einsatz möglichst großvolumiger Proben notwendig.

Eine Trocknung der Sedimente wurde durch die umfassenden Zielvorgaben ausgeschlossen, denn das Trocknen ist aus unterschiedlichen Gründen sehr bedenklich: Während der Trocknung können vor allem bei höheren Temperaturen Verluste von Analyten durch Verdampfung auftreten. Außerdem kann dadurch ebenso eine Alterung des Sediments auftreten, die mit Umlagerungen in den interlamellaren Zwischenräumen erklärt wird. Es kann dadurch zur Bildung von Einschlußverbindungen einzelner Analyten kommen, die letztendlich die Extrahierbarkeit erschweren. Die Vorgabe, das Feuchtsediment direkt zu extrahieren, wird am ehesten durch die Technik des Soxhlet-Verfahrens gewährleistet, des weiteren konnte Schwarzbauer gute Resultate über ein Kaltextraktionsverfahren mit Hilfe eines Ultra-Turrax-Gerätes erzielen.^[35] Hierbei wurden die Lösungsmittel Aceton und *n*-Hexan in einer sequenziellen Extraktion eingesetzt. Für die Extraktion feuchter Proben stehen nur begrenzt Lösungsmittel zur Auswahl, welche die geforderten Eigenschaften erfüllen (frei mischbar mit Wasser). Zudem sollte sich die Verwendung innerhalb einer „Routine-Analytik“ (hoher Probendurchsatz) möglichst unkompliziert gestalten. Aceton zeigte sich im Hinblick auf die genannten Anforderungen als am besten geeignet. Im Abschnitt 3.4.5 werden unterschiedliche Extraktionsmittel verglichen und die entsprechenden Vor- und Nachteile diskutiert.

2.1.2.3 Größenausschluß-Chromatographie (GPC)

Zur weiteren Aufreinigung und Abtrennung störender makromolekularer Begleitstoffe (elementarer Schwefel S₈, Huminsäuren, Chlorophyll, Fette) der einzelnen Extrakte erwies sich die Größenausschlußchromatographie über Permeations-Gel (Bio Bead SX-3) als sehr universell.^[36,37] Durch dieses Verfahren, automatisiert und beschleunigt durch den erhöhten Druck per HPLC-Pumpe, werden sehr scharfe Trennungen zwischen Begleitmatrix und Analyten erhalten.^[38,39] Die Anwendung von GPC-Verfahren ist u.a. auch sehr gebräuchlich in der PAH und PCB/Toxaphen-Analytik. Zusätzlich zur Kieselgel-Säulenchromatographie wird hierbei eine Fraktionierung über Dextrangel (z.B. Sephadex 20) als stationäre Phase vorgenommen. Hierdurch wird eine spezifische Auftrennung der PAK entsprechend dem Kondensierungsgrad erzielt und zudem coeluiierende, polyungesättigte aliphatische Kohlenwasserstoffe von den PAKs abgetrennt oder auch eine Trennung zwischen den eigentlich sehr ähnlichen Substanzklassen der Toxaphene und PCB erreicht.^[8,40]

Je nach Belastungssituation der Proben in dieser Arbeit konnten Säulen mit unterschiedlichen Trennvolumina eingesetzt werden. In Fällen maximaler Belastung mußten die Proben-Extrakte geteilt

und der Clean-up-Schritt drei- bzw. vierfach mit den Extrakt-Aliquoten durchgeführt werden. Als ideale Mischung, mit deren Hilfe die Analyten vollständig eluierbar waren, erwies sich Cyclohexan/Essigsäureethylester im Verhältnis 1:1. In einer vergleichenden Studie für die Chromatographie mit Bio Beads SX-3 erzielten Puig et al.^[39] allerdings für die Mischung Dichlormethan/Cyclohexan (1:3) etwas bessere Resultate als für Essigsäureethylester/Cyclohexan als Elutionsmittel. Von der Verwendung größerer Mengen Dichlormethan (DCM) sollte aber aufgrund des gesundheitlichen Risikos abgesehen werden. Für eine Sedimentprobe würden zwischen 50 und 70 mL DCM eingesetzt werden.

2.1.2.4 Clean-up über die Mini-Kieselgel-Chromatographie

Organische Extrakte von Sediment- oder Schwebstoffproben sind sehr komplexe Stoffgemische, mit einer hohen Anzahl von Einzelverbindungen, die in ihren Konzentrationen sehr stark variieren können. So enthalten Sedimente die sehr lipophilen Schadstoffklassen (Hauptkomponenten) zum Teil im ppm-Konzentrationsbereich (mg/kg), während hydrophilere Komponenten als Spurenstoffe häufig mit einigen ppt (ng/kg) an der unteren Grenze der zu erfassenden Mengen liegen. Auch wenn sich die Verbindungen in sehr niedrigen Konzentrationen in Schwebstoffen und Sedimenten befinden, ist ihr Vorkommen aufgrund der vielfältigen toxikologischen Wirkungen von besonderem Interesse. Ein Ziel der vorliegenden Methodenentwicklung ist daher die Erfassung „neuer“ Verbindungen höherer Polarität. Hierfür sind besonders selektive Fraktionierungs- und Detektionstechniken für die Analyse von Spurenkomponenten aufgrund der schon erwähnten starken Konzentrationsdifferenzen und daraus resultierenden Überlagerungen unerlässlich. Die Auftrennung von Rohextrakten kann durch die vorgeschaltete Größenausschlusschromatographie erfolgen, häufig werden weitere Trennschritte wie z.B. adsorptions-chromatographische Verfahren angewandt, wobei die Zielverbindungen der Extrakte nach steigender Polarität getrennt eluiert werden. Der methodische Aufwand des Clean-up orientiert sich an der Belastungsstärke der Probe und der notwendigen Nachweisgrenze der analytischen Untersuchung. Die wichtigsten Trennverfahren sind neben der „High-Performance-Liquid-Chromatographie“ (HPLC) säulenchromatographische Verfahren unter Verwendung von Silica-, Florisil- oder Aluminiumoxidphasen.^[41] Die hohe Variabilität der Elutionsmittel und eine mittlerweile breite Auswahl an festen Phasen erhöhen die Möglichkeiten selektiver Anreicherung und Trennungen annähernd bis zur Isolierung von Einzelstoffen.^[42]

Die Auftrennung der Zielverbindungen in den komplexen Rohextrakten darf nicht zur Diskriminierung von Komponenten führen. Es sollte vielmehr eine möglichst hohe Zahl an Schadstoffen zuverlässig erfaßt werden. Schnell werden durch Clean-up-Schritte Limitierungen und Schwankungen vor allem in polaren Bereichen durch unregelmäßige adsorptive Eigenschaften/Effekte unterschiedlich aktivierter Chromatographie-Phasen festgestellt. Für unsere Zwecke erwies sich die Miniatur-Kieselgelfraktionierung in Kombination mit vorheriger Matrixabtrennung durch die GPC, den Zielvorgaben entsprechend, als am geeignetsten.

Hierfür wurden in der ersten Phase der vorliegenden Untersuchungen Wiederfindungsraten mit einer Auswahl an Referenz-Substanzen durchgeführt und die Elutionsvolumina und Lösungsmittel-Mischverhältnisse so festgesetzt, daß eine Aufteilung verschiedener Schadstoffklassen in die einzelnen Fraktionen erreicht wurde. In Kapitel 2.2 wird die Verteilung einer Auswahl an

Zielverbindungen aufgeführt, wobei die Elution mit der in Abbildung 6 angegebenen Lösungsmittelzusammensetzung erfolgte. Der Vorteil der „Normaldruck“-Chromatographie, im Gegensatz zu HPLC-Methoden, liegt vor allem in höheren Aufgabevolumina der zuvor eingeeengten GPC-Probeneluate. Durch Verwendung von Probenvolumina bis zu 1 mL konnten größere Verluste, bedingt durch Ausbildung fester Rückstände, bei zu hoher Aufkonzentrierung vermindert werden. Bei der alternativ zur Verfügung stehenden RP-HPLC ergab sich mit einem Injektionsvolumen von max. 150 µL eine zu starke Begrenzung. Selbst 1 mL bedeutet eine hohe Anreicherung der komplexen Mischungen, wodurch zum Teil ebenso geringe Mengen fester Rückstände in verwendeten Glasgeräten und Pipettierhilfen vorkamen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieses Aufreinigungsverfahrens lag in der zusätzlichen Separation des elementaren Schwefels (S₈), der aufgrund lipophiler Eigenschaften gemeinsam mit den sehr unpolaren Analyten bereits in der *n*-Hexan Fraktion eluierte. Den lipophilen Komponenten kam in dieser Arbeit allerdings nur geringe Bedeutung zu, so daß mögliche Schwefelrückstände in den entsprechenden Fraktionen die Analysen nicht beeinflussten.

	Prinzipiell mögliche Inhaltsstoffe	log K _{ow}	Elutionsmittel (je 8 mL)	
I	Aliphaten, halogenierte KW	6,0-8,0	<i>n</i> -Hexan	
II	PCB, Mono-, dicyclische Aromaten Alkylbenzole	4,5-7,5	<i>n</i> -Hexan / DCM (9:1)	
III	Nitroaromaten, Aniline, Benzo- thiazole, PAH (R≥3), hetero. Arom.	2,5-7,0	<i>n</i> -Hexan / DCM (4:6)	
IV	Moschusduftstoffe, Moschus- metabolite, chlorierte Nitroaniline, Carbazole, Phthalate	2,0-4,5	DCM	
V	Triazine, org. Phosphate, Schwefelorganika, Ketone, Carbonsäureester, Amine, Lactone, Aldehyde	1,5-4,0	DCM / Ethylacetat (1:1)	
VI	Triazinmetabolite, org. Phosphate, Thiophene, Nitrile, Alkylphenole	< 1,5	Ethylacetat	
VII/VIII	Alkylphenole, Pharmazeutika, Stickstoffheterocyclen, aromat. Alkohole, org. Phosphate	< 1,5	Methanol	

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Miniatur-Kieselgelchromatographie

Die Möglichkeit, eine Unterfraktionierung entsprechend der sichtbaren „optischen-Belastung“ spontan durchzuführen, stellte sich als ein weiterer großer Vorteil der manuellen Fraktionierung mit Miniaturglas-Säulen heraus. Für hoch belastete Sedimentproben (z.B. Hafenschlick) erwies sich die Unterfraktionierung, im besonderen der Fraktion 5, in bis zu 3 weitere Fraktionen (5a-c) als sinnvoll. Besonders eindrucksvoll war die scharfe Trennung für eine ca. 400 µL große, mit 5b bezeichnete Fraktion, welche dunkelgrün bis schwarz gefärbt war (siehe auch Abschnitt 3.4).

In der Graphik Abbildung 6 sind den einzelnen Fraktionen bestimmte log K_{OW}-Bereiche zugeordnet. Innerhalb der Arbeit konnte immer wieder festgestellt werden, daß die Bezeichnungen „polar“ und „lipophil“ im bezug auf die Silica-Chromatographie recht unterschiedliche Bedeutung haben. Bezieht man sich zum Vergleich auf vorhandene log K_{OW}-Werte der Literatur, so werden

beispielsweise für Verbindungen wie DDT und dessen Metabolite log K_{OW} -Werte im Bereich von 5,2 bis hin zu 7,5 aufgeführt. DDT wird damit zu Recht als lipophil bezeichnet. Innerhalb der hier angewendeten Silica-Chromatographie eluiert diese Verbindung allerdings in der 3. Fraktion, zusammen mit Komponenten wie z.B. Nitrobenzol, das einen log K_{OW} von 2,0 aufweist und damit eher als polar (hydrophil) bezeichnet wird. Umgekehrt verhält es sich auch für die polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, welche mit zunehmendem Kondensationsgrad allgemein eine höhere Lipophilie zeigen, diese Komponenten eluieren jedoch bei der verwendeten Kieselgel-Chromatographie ebenso erst in der mittelpolaren Fraktion 3. Hier war eine primäre Elution der C1- und C2-Ringe festzustellen und anschließend, ab der 3. Fraktion, eluierten die C3-C5-Ringaromaten. Ein weiteres Beispiel ist durch Tonalid gegeben, die Verbindung wird trotz eines log K_{OW} von 5,9 erst in Fraktion 5, d.h. in einer „polaren Silica-Fraktion“, eluiert.

Es wird angenommen, daß in einem derartigen Fall unterschiedliche Adsorptions-Eigenschaften der Verbindungen eine größere Rolle spielen als Verteilungsgleichgewichte zwischen lipophilen und polaren Phasen. Diese Beispiele sollen verdeutlichen, daß klar differenziert werden muß zwischen „polarer Verbindung“ und „polarer Silica-Fraktion“. Da allerdings auch die Daten für die Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten auf unterschiedliche Arten ermittelt werden, streuen bereits diese Angaben außerordentlich.

2.1.3 Detektion und Quantifizierung von ausgewählten Zielverbindungen

Für die Analyse von Sedimentproben-Extrakten mit komplexer Matrix und Zusammensetzung eignen sich generell gaschromatographische Systeme, die mit Massenspektrometern gekoppelt sind, so daß nach chromatographischer Trennung zusätzlich strukturelle Information über die Inhaltsstoffe erzielt werden. Hinzu kommt für die meisten Massenspektrometer (Quadrupol, Sektorfeld) die Möglichkeit, Spektren im Selected Ion Modus (SIM) aufzunehmen und darüber eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit sowie eine hohe Selektivität zu erreichen. Mit dem Alkali-Flammenionisationsdetektor (AFID) - auch als Phosphor-Nitrogen-Detektor (PND) bezeichnet - stand zusätzlich ein sehr selektiver und empfindlicher Detektor zur Bestimmung von stickstoff- und phosphorhaltigen Verbindungen zur Verfügung. Für einen methodischen Vergleich wurden einzelne Fraktionen eines Extraktes mit einem Elektronen-Einfang-Detektor (ECD) vermessen. Über die jeweils spezifische Sensitivität der unterschiedlichen Detektoren sollten zusätzlich zu den GC-MS-Messungen Informationen über die Belastung der Proben mit chlororganischen oder allgemein elektronegativen Substanzen (ECD) bzw. N- und P-haltigen Verbindungen (AFID) erhalten werden.

Die Einzelheiten zur instrumentellen Analytik sind im experimentellen Teil enthalten, während die unterschiedlichen Funktionsweisen in der einführenden Literatur zur Gaschromatographie beschrieben sind.^[43-45]

In den folgenden Kapiteln zur Methoden-Validierung werden am Beispiel einer Nordsee-Sedimentprobe Vor- und Nachteile, aber auch die Besonderheiten für die stickstoff- phosphorselektive Detektion und des ECDs zusätzlich zur GC-MS-Kopplung erarbeitet. Die Detektoren ECD und AFID

können die GC-MS-Messungen sinnvoll ergänzen, sind jedoch aufgrund der hohen Anzahl möglicher Koelutionen allein unzureichend für eine Analyse komplexer Gemische.

2.1.4 Varianten für weitere Probenmatrices

In der Abbildung 7 ist das leicht modifizierte Analyseschema für die Aufarbeitung der Biotaprobe dargestellt. Im Vergleich zur Aufarbeitung von Sedimentproben (vergl. Abbildung 5) unterscheidet sich insbesondere die Extraktionsphase: Statt einer sequentiellen Extraktion mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität wurde die Soxhlet-Extraktion mit einem Gemisch von Aceton/*n*-Hexan im Verhältnis 1:1 durchgeführt. Ein zusätzlicher Schritt ist die Homogenisierung bei der Probenvorbehandlung. Auch für die Analyse der Biotaprobe wurde das Frischgewebe verwendet, d.h. ohne Trocknungsverfahren wie z.B. durch Zugabe von Natriumsulfat (s.a. Kapitel 2.2.3.3, Seite 40). In Einzelfällen ließ sich eine Trocknung aufgrund zu hoher Wasseranteile allerdings nicht umgehen.

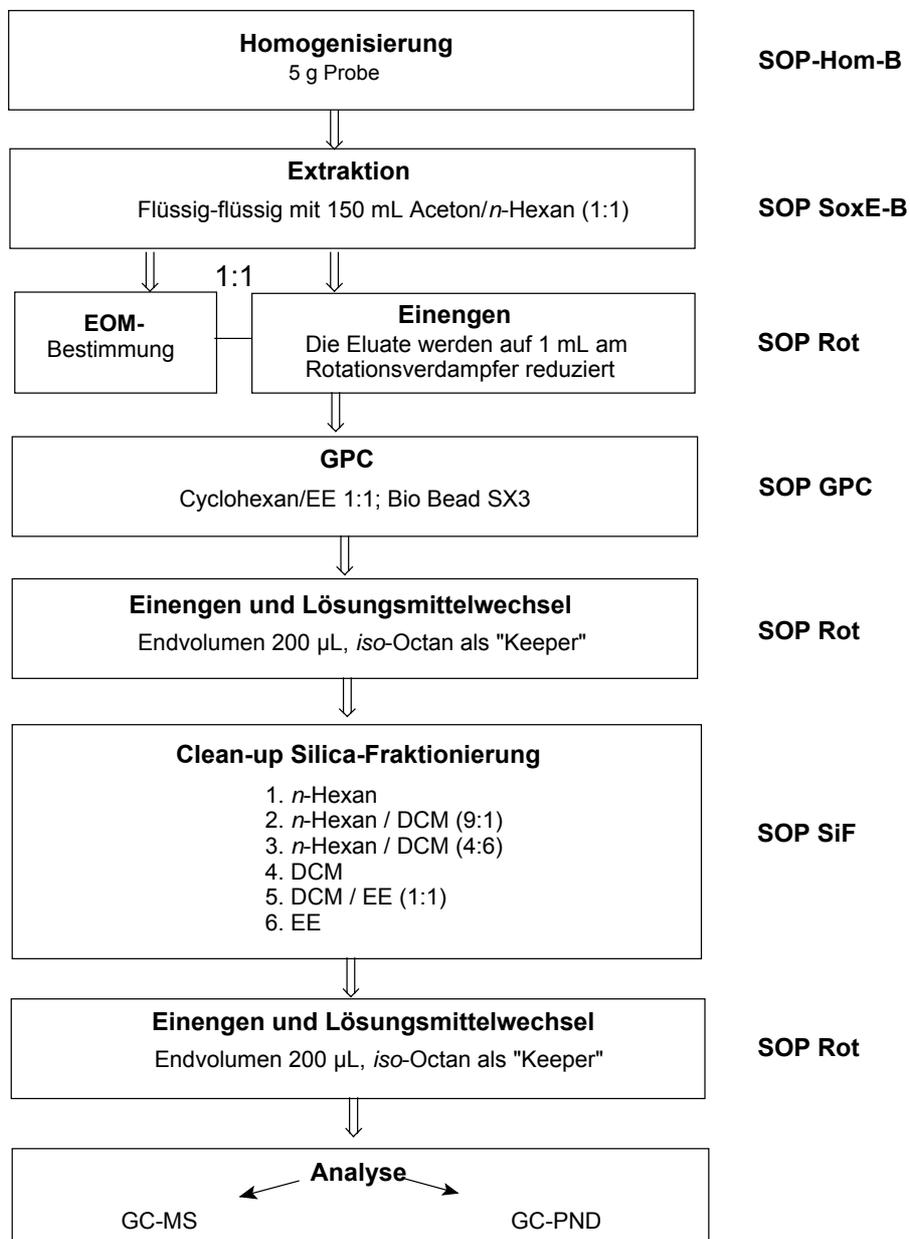


Abbildung 7: Methodenschema Biotaprobe

2.2 Validierung der analytischen Methode

Durch Qualitätssicherungsmaßnahmen (QS), nicht nur in der Auftragsanalytik von Handelslaboratorien, sondern auch in der universitären Forschung, sollen exakte und vor allem vergleichbare Ergebnisse produziert werden. Die universitären Möglichkeiten sind im Vergleich mit gut ausgestatteten kommerziellen Laboren zumeist sehr begrenzt (Personal, Geräte, Finanzsituation). Dennoch sind Grundkonzepte der Qualitätssicherung auch auf universitäre Forschung übertragbar. Die Entwicklung der analytischen Methoden endet mit der Validierung, d.h. es wird sichergestellt, daß die Methode für die beabsichtigte Anwendung geeignet ist. Spätestens ab diesem Schritt sind qualitätssichernde Maßnahmen unabdingbar. Diese beinhalten eine ausführliche und nachvollziehbare Beschreibung der Leistungsfähigkeit und die Ermittlung der Meßunsicherheiten. Folgende Kenndaten sollten dokumentiert sein:

- ⇒ Arbeitsbereich
- ⇒ Linearität
- ⇒ Empfindlichkeit
- ⇒ Nachweis- und Bestimmungsgrenzen
- ⇒ Präzision und Richtigkeit
- ⇒ Selektivität und Spezifität

Ferner sind die Verwendung von zertifizierten Referenzmaterialien, Rückführbarkeit und Rückverfolgbarkeit der Proben, eine systematische interne Qualitätskontrolle sowie externe Kontrollen durch Laborleistungstests Bestandteile einer umfassenden Qualitätssicherung. Aber gerade in Hinsicht auf den hohen finanziellen und zeitlichen Aufwand, der hierfür benötigt wird, ergeben sich starke Limitierungen z.B. in der Anwendung von zertifizierten Referenzmaterialien.

In der hier präsentierten Arbeit stand eine Optimierung der Methode im Vordergrund. Dies erforderte laufende Veränderungen, wodurch eine Validierung der Gesamtmethode nur eingeschränkt erfolgen konnte. In den folgenden Abschnitten wird die Validierung der Analyseverfahren für hochbelastete Feuchtsedimente für die aufgeführten Zielverbindungen, unter besonderer Berücksichtigung von Irgarol 1051, dargestellt .

2.2.1 Hintergrundbelastung

Zur Vermeidung falsch positiver Befunde bei Untersuchungen von Probenextrakten auf ihren Gehalt an organischen Schadstoffen ist die Bestimmung eines Blindwerts parallel zu jeder Extraktionsreihe unverzichtbar. Dies ist besonders wichtig im Rahmen von sogenannten Screening-Untersuchungen, in denen die Analyse einer Probe ohne vorherige Begrenzung auf bestimmte Zielverbindungen durchgeführt werden soll. Durch zunehmend komplexere und zeitaufwendigere Methoden verstärken sich die Kontaminationsmöglichkeiten. Gerade Arbeitsschritte, in denen Probenextrakte unverschlossen der Umgebungsluft ausgesetzt sind, sind für die Aufnahme von Kontaminanten aus besonders anfällig:

- ⇒ Ablasen von Lösungsmitteln in offenen Gefäßen mit N₂-Strom

- ⇒ Soxhlet-Extraktion
- ⇒ Rotationsverdampfer, Belüftung
- ⇒ Miniatur-Kieselgel-Fraktionierung

Die Quantifizierung von Target-Verbindungen muß in bezug auf Kontaminationen abgesichert sein. Gerade für die Analytik der Moschusverbindungen ist eine ständige Kontrolle während der Aufarbeitung von Proben notwendig. Schon in einer 1982 erschienenen Arbeit wurde gezeigt, das MX in einer Reihe von Produkten enthalten ist, die im täglichen Laboralltag verwendet werden.^[46] Helbing et al. untersuchten die Belastung von menschlichen Blutproben auf MX und stellten dabei fest, daß in Haushaltspapier, Gummihandschuhen und bei der Spülung der Hand eines Analytikers bereits MX-Mengen von 650, 1875 bzw. 8843 pg gefunden wurden.^[47] Es konnte zudem gezeigt werden, daß eine Begrenzung der Laborstandzeit von organischen Lösungsmitteln in Schliffflaschen auf höchstens einen Tag den Methodenblindwert deutlich herabsetzt. Diese Befunde veranschaulichen, daß am Anfang einer Methodvalidierung zur Bestimmung der Moschusverbindung die Kontrolle von Blindwerten stehen muß. Entsprechendes gilt für die weiteren untersuchten Zielverbindungen, also für die Nitroaromaten, chlorierten Aniline und Irgarol 1051. Die Gefahren einer Kontamination sind dabei aber eher in unreinen Glasgeräten oder beispielsweise in einer Verschleppung der Substanzen während der Aufarbeitung als durch Belastungen aus der Laborluft zu sehen.

Besonders schwierig gestaltet sich u.a. auch die Analyse der Phosphorsäureester (TBP, TnBP und TCEP) sowie der Phthalate. Sie sind in den Laboren massiv durch Ausgasungen vorhandener Plastikmaterialien und Baustoffe enthalten. Im Laufe dieser Arbeit wurde mehrfach versucht, eine Hintergrundbelastung dieser Verbindungen zu quantifizieren: In bezug auf *iso*-Butylphthalat und *n*-Butylphthalat wurden Schwankungen der gemessenen Konzentrationen um den Faktor 20 festgestellt. Daher mußte von einer Quantifizierung dieser Verbindungen in Umweltproben abgesehen werden.

2.2.2 Präzision der Methode

Die Präzision wird als die Güte der Übereinstimmung von unabhängigen Testergebnissen definiert und beschreibt den zufälligen Fehler bzw. die statistische Streuung der Resultate. Die Präzision charakterisiert eine Datenserie. Zur Charakterisierung einer Methode dienen die Wiederhol- und Vergleichspräzision. Hierbei beschreibt die Wiederholpräzision die Güte der Übereinstimmung von unabhängigen Bestimmungen, die mit einer Methode, in einem kurzen Zeitraum aufeinanderfolgend von einer Person, mit denselben Geräten durchgeführt wurden. Die Standardabweichungen der in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Versuche zur WFR (Tabelle 1, Seite 38) werden als die aussagekräftigsten Werte zur Wiederholpräzision der Methode angesehen. Alle Daten werden in prozentualen und absoluten Werten angegeben, wobei die Einheiten dem Ergebnis einer Sedimentuntersuchung entsprechen.

2.2.3 Wiederfindungsraten

2.2.3.1 Sedimente

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit und Leistungsfähigkeit der Methode wurden für ausgewählte Zielverbindungen durch Sedimentdotierungsversuche Wiederfindungsraten ermittelt. Durch die Zusammensetzung der Modellmischung sollen ein breiter Polaritätsbereich abgedeckt sowie Verbindungen sehr unterschiedlicher Strukturen erfaßt werden. Für eine höhere Nachweisempfindlichkeit der untersuchten Phosphorsäureester wurden alle Messungen mit dem AFID durchgeführt, da dieser sich bis zu einem Faktor von 100 empfindlicher zeigte als das GC-MS-System. Die untersuchten Substanzen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Nachdem bereits die Anwendbarkeit der Methode durch Addition von Standardverbindungen zu einer hochbelasteten Elbsedimentprobe verifiziert wurde, sollte zusätzlich ihre Anwendbarkeit auf Nordseesedimentproben im unteren Konzentrationsbereich überprüft werden.^[34] Für diese Versuche wurde ein Referenzsediment geringer Eigenbelastung ausgewählt, welches mit einem in Aceton gelösten Standardgemisch entsprechend den in Nordseesedimenten erwarteten Belastungen dotiert und analog dem in Abbildung 5 gezeigten Schema aufgearbeitet wurde. Generell ist an dieser Stelle anzumerken, daß das angewendete Verfahren zur Bestimmung von Wiederfindungsraten für Sedimente stark umstritten ist, da sich Gleichgewichtszustände zwischen den Zielverbindungen und dem partikulären Material im Sediment wesentlich langsamer als in Wasserproben bzw. nur unvollständig einstellen (s.a.hierzu Abschnitt 2.2.6.1). Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war jedoch kein Referenzmaterial für die Untersuchung von Sedimenten auf N- und P-haltige Pestizide verfügbar, so daß das hier geschilderte Dotierungsverfahren angewendet werden mußte.

Im Unterschied zum Schema in Abbildung 5 wurden hierbei die Eluate 1-3 nach der GPC rekombiniert, wodurch sich die anschließende Silica-Fraktionierung auf 6 anstelle der abgebildeten maximalen Anzahl von 13 Fraktionen verminderte.

Die mit Hilfe von Gleichung 6 berechneten prozentualen Werte der Wiederfindungsrate (WFR) sind in der Abbildung 8 dargestellt. Die absoluten Konzentrationen, die Verteilung der Inhaltstoffe auf die einzelnen Silica-Fractionen sowie aus der Literatur entnommene log K_{OW} -Werte sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

$$\text{WFR} = \frac{\text{gemessene Konzentration}}{\text{eingesetzte Konzentration}} \times 100$$

(6)

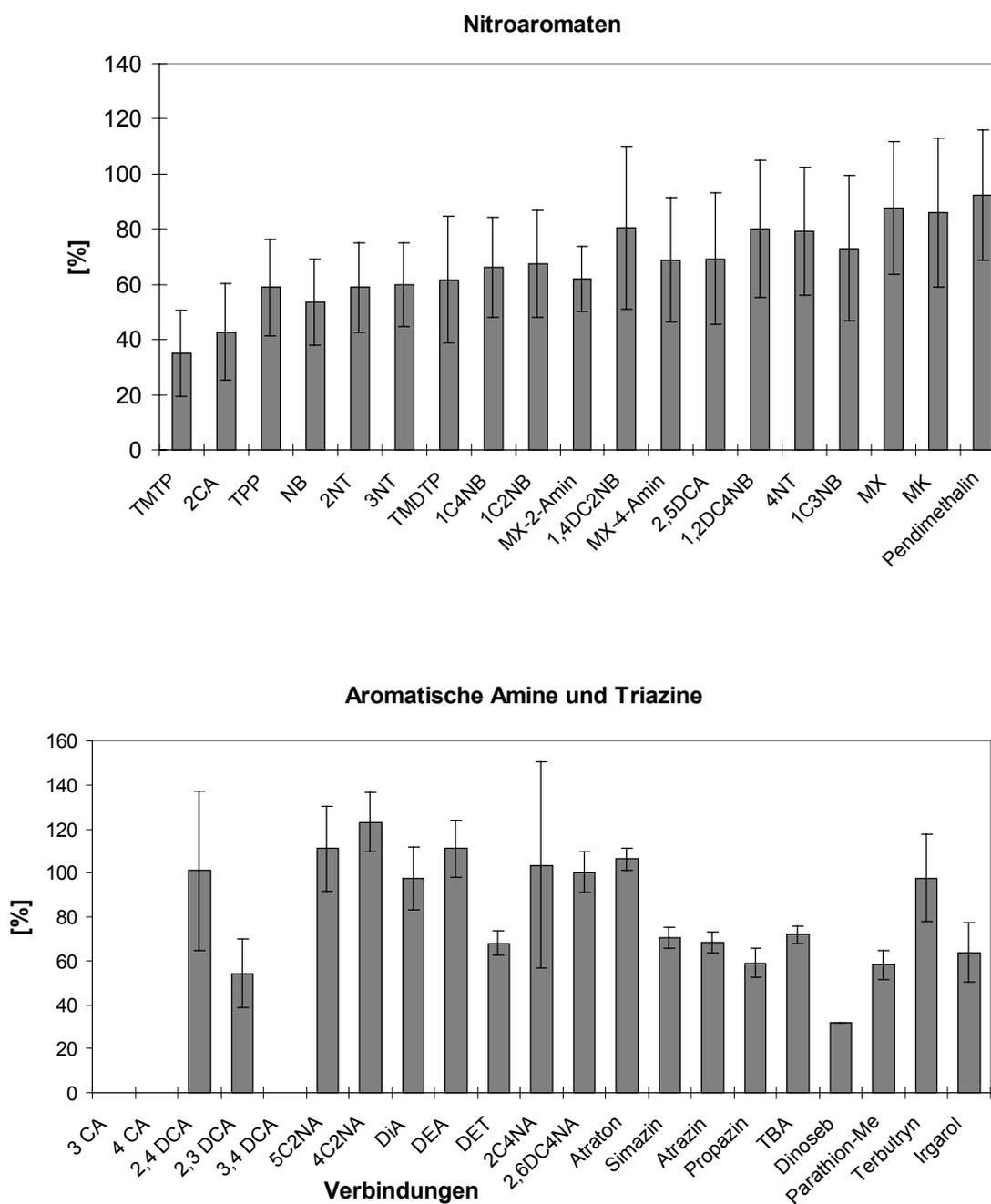


Abbildung 8: WFR und prozentuale Standardabweichung ausgewählter Nitroaromaten (oben) sowie ausgewählter Aniline und Triazine (unten); Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis Seite XI

Die Wiederfindungsversuche wurden in 3 unterschiedlichen Konzentrationsbereichen (1. 12,5 ng – 50 µg/kg; 2. 125 ng- 500 µg/kg; 3. 1,25 ng – 5 µg/kg) durchgeführt. In Abbildung 8 wurden jedoch nur die Ergebnisse der Doppelbestimmung für den Konzentrationsbereich 12,5 ng – 50 µg/kg und 125 ng – 500 µg/kg dargestellt, da im besonderen die nitroaromatischen Verbindungen bei einer Konzentration von 100 ng/kg nicht mehr fehlerfrei quantifizierbar waren. Für die leichter flüchtigen Substanzen mit einer durchschnittlichen Wiederfindung unterhalb 50 % spielte unter anderem auch

die Verwendung eines matrixbelasteten Referenzsedimentes eine Rolle, da bei diesen Konzentrationen durch ein verringertes Signal/Rausch-Verhältnis die Nachweisgrenze unterschritten war. Genaue Angaben zu den Bestimmungsgrenzen sind im folgenden Kapitel 2.2.3.4 aufgeführt.

Insgesamt waren bei der Methodvalidierung drei Zielgruppen der Target-Verbindungen von besonderem Interesse:

- a) Irgarol 1051 **64 % ± 13**
- b) Nitromoschusverbindungen und deren Metabolite **62 % - 88 %**
- c) Chlorierte Aniline, Nitroaromaten und Nitroaniline **≥ 60 %**

Für fast alle untersuchten Verbindungen konnten im Mittel gute bis sehr gute Wiederfindungsraten von 50 % bis 100 % ermittelt werden. Bei 3- und 4-Chloranilin (3CA, 4CA) gab es chromatographische Trennprobleme, so daß für die Verbindungen keine Werte bestimmt werden konnten. Ferner wurde 3,4-Dichloranilin (3,4-DCA) nur unzureichend bzw. gar nicht wiedergefunden. Eine Erklärung hierfür könnten die zu gering gewählten, eingesetzten Konzentrationen (7,25 µg/kg) sein. Des weiteren unterscheidet sich 3,4-DCA eventuell aufgrund elektronischer Eigenschaften deutlich von den übrigen Isomeren, wodurch die Erfassung über die angewandte Methode grundlegend geringer ist.

Für Irgarol wurde innerhalb der Versuche zur Bestimmung der WFR zusätzlich die wäßrige und partikuläre Phase getrennt analysiert, um die Verteilung zwischen den Phasen zu erfassen. Einschränkend muß erwähnt werden, daß ein Gleichgewicht nach der Homogenisierung vorausgesetzt wurde, was allerdings wie bereits diskutiert, für Spike-Verfahren nicht unbedingt gewährleistet ist. Das Ergebnis zeigte mit einer mittleren Wiederfindungsrate von 39 % für die wäßrige Phase, einen deutlich höheren Anteil im Verhältnis zur organischen Phase.

Insgesamt verdeutlicht auch dieses Ergebnis, daß die Analyse des Gesamtsediments einschließlich des Porenwassers für die Bestimmung von Irgarol und weiterer Triazine von hoher Relevanz ist.

Bis auf 2-Chloranilin (2CA) und Trimethylthiophosphat (TMTP) wurden WFR von über 50 % für alle Verbindungen erhalten. Damit wird die Methode für die ausgewählten Zielverbindungen als geeignet angesehen.

Die oben beschriebenen Versuche zur WFR waren im Hinblick auf das Extraktionsmittel auf Aceton beschränkt. Um die Vollständigkeit der Extraktion zu überprüfen, wurde lediglich ein Versuch durchgeführt, in dem das Feuchtsediment nacheinander sowohl mit Aceton als auch mit *n*-Hexan extrahiert wurde. Anschließend erfolgte eine getrennte Aufarbeitung und Analyse der Extrakte. Im *n*-Hexan-Extrakt der Fraktion 3 konnten einzelne Verbindungen zu 0,5-2 % wiedergefunden werden, in allen weiteren Fraktionen wurden keine Übereinstimmungen zu den Verbindungen der Modellmischungen gefunden. Es läßt sich zusammenfassen, daß alle hier untersuchten Verbindungen nahezu vollständig mit Aceton extrahiert werden. Eine *n*-Hexan-Nachextraktion ist damit für die zu untersuchenden Zielverbindungen nicht notwendig.

Tabelle 1 : Wiederfindungsraten (WFR), Mittelwerte der WFR (= MW) und Standardabweichungen (= Stdbw.) der Methode für vier (Nitro-aromaten) bzw. fünf (Aniline, Triazine) Wiederholungsversuche. Die jeweiligen Konzentrationsbereiche sind der Tabelle zu entnehmen

Verbindung Konzentrationen FG	Fraktion	Polarität [log K _{ow}]	WFR [%]				MW [%]	Stdbw. [%]
			1 (12,5 ng-50 µg/kg)	2 (12,5 ng-50 µg/kg)	3 125 ng-500 µg/kg	4 125 ng-500 µg/kg		
Duftstoffe								
Moschusxylol (MX)	3	4,9 - 5,2	69	65	91	126	88	± 24
Moschusketon (MK)	4	4,2	70	56	92	127	86	± 27
MX-4-Amin	4	3,8	32	93	80	71	69	± 23
MX-2-Amin	4	3,5	49	65	80	53	62	± 12
(Thio) Phosphate								
Tri- <i>iso</i> -butylphosphat	4,5,6	3,5						
Tri- <i>n</i> -butylphosphat	4,5,7	3,7						
Triphenylphosphat	4,5	(< 3.0)	51	34	74	76	59	± 17
Trimethylthiophosphat	4		22	22	60	36	35	± 15
Trimethyldithiophosphat	4		39	42	95	72	62	± 23
Nitroaromaten								
1,2-Dichlor-4-nitrobenzol	4	3,0 - 3,29	60	103	106	51	80	± 25
1-Chlor-3-nitrobenzol	3	2,41 - 2,6	47	110	86	49	73	± 26
1-Chlor-2-nitrobenzol	3	2,41 - 2,6	48	87	86	48	67	± 19
3-Nitrotoluol	3	2,4 - 2,6	43	76	74	46	60	± 15
4-Nitrotoluol	3	2,4 - 2,6	45	79	110	82	79	± 23
1-Chlor-4-nitrobenzol	3	2,39 - 2,58	48	87	81	48	66	± 18
2-Nitrotoluol	3	2,25 - 2,4	40	78	71	46	59	± 16
Nitrobenzol	3	1,85 - 2,0	34	68	69	43	54	± 15
1,4-Dichlor-2-nitrobenzol	4	?	58	93	122	49	81	± 29
Pendimethalin	4,5	1,52	80	59	116	114	92	± 24

Fortsetzung Tabelle 1: Modellmischung 2

Verbindung	Fraktion	Polarität [log K _{ow}]	WFR [%]					MW [%] ± Stdbw.	Konzentrations- bereich (µg/kg) FG					
			1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	
Triazine														
Terbutryn	5	3,48	128	77	114	82	87	98 ± 20	41,8	38,2	45,8	45,2	44,8	
Irgarol	5	3,0 - 3,65	75	65	45	53	81	64 ± 13	30,9	28,3	33,9	33,3	33,2	
Terbutylazin	5	3,04	77	76	67	71	68	72 ± 4	16,5	15,1	18,1	17,8	17,7	
Propazin	5	2,91 - 3,0	68	51	62	62	52	59 ± 7	12,9	11,8	14,1	13,9	13,8	
Atrazin	5	2,23 - 2,68	60	72	68	74	68	68 ± 5	12,9	11,8	14,1	13,9	13,8	
Atraton	5,6	1,98 - 2,69		102	101	112	110	106 ± 5	18,1	16,5	19,8	19,5	19,4	
Simazin	5	1,5 - 2,34	überlagert	überlagert	64	75	73	71 ± 5	14,9	13,6	16,3	16	15,9	
Desethylatrazin	6	1,51	133	überlagert	100	106	105	111 ± 13	10,8	9,9	11,9	11,7	11,6	
Desethylterbutylazin	6	?	73	75	60	68	64	68 ± 6	11,6	10,7	12,8	12,6	12,5	
Desisopropylatrazin	6	?	118		78	94	100	98 ± 14	8,8	8,1	9,7	9,5	9,4	
Aniline														
2,6-Dichlor-4-nitroanilin	4,5	3	92	110	98	112	89	100 ± 9	9,6	8,8	10,6	10,4	10,3	
2,5-Dichloranilin	3	2,8	50	42	89	96		69 ± 24						
2,4-Dichloranilin	4	2,6	156	126	82	90	51	101 ± 36	10,4	9,6	11,5	11,3	11,2	
2,3-Dichloranilin	4	2,6	47	77	54	63	30	54 ± 16	22,1	20,2	24,2	23,8	23,7	
2-Chloranilin	3,4	2,2	32	23	69	46		43 ± 18						
2-Chlor-4-nitroanilin	4	2,12 - 2,2	118		108		159	104 ± 47	17,7	16,2	19,4	19	18,9	
5-Chlor-2-nitroanilin	4			135	83	105	121	111 ± 19	8,8	8,1	10,5	9,5	9,4	
4-Chlor-2-nitroanilin	4		126	136	111	104	138	123 ± 13	9,6	8,8	9,7	10,4	10,3	
3-Chloranilin	4	1,88							26,9	24,6	29,5	29	28,9	
4-Chloranilin	4	1,83							32	29,4	35,2	34,6	34,5	
Phosphorsäureester														
Parathionethyl	4	3,81												
Parathionmethyl	4	3	49	52	62	61	67	58 ± 7	1,25					
Malathion	4,5	2,89												

2.2.3.2 *Biotaprobren*

Um die Anwendbarkeit (Leistungsfähigkeit, Reproduzierbarkeit, Ermittlung des Arbeitsbereiches, Präzision) der Methode für Biotaprobren zu prüfen, respektive eine Vereinheitlichung für verschiedene Probenmatrices zu erreichen, wurden Versuche zur WFR in einem Konzentrationsbereich zwischen 5 ng und 500 ng/0,5 g Butterfett vorgenommen, und zwar wurden aufgrund fehlender Referenzmaterialien je 0,5 g Butter mit Standardverbindungen dotiert und nach Zugabe von 15 g Natriumsulfat homogenisiert. Für einzelne Substanzen, und hier vor allem die Gruppe der synthetischen Moschusverbindungen, wurden zusätzlich Versuche ohne Zugabe von Natriumsulfat durchgeführt, um mögliche Nebeneffekte, wie z.B. eine reaktive Zersetzung, auszuschließen (s.a. Abschnitt 2.2.3.3). Im Rahmen eines Projektes zu non-target-Untersuchungen von Biotaprobren^[48], wurden Wiederfindungsversuche mit Hilfe der vorgestellten Aufarbeitungsmethode für eine Reihe weiterer organischer Schadstoffe durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte aufgrund möglicher Koelutionen mit Hilfe des GC-MS. Die Einzelergebnisse sind tabellarisch im Anhang wiedergegeben und auch im Projekt-Abschlußbericht ALOSON ausführlich dokumentiert.^[48] Als Resultat dieser Versuche wurde bei der Homogenisierung weiteren biologischen Probenmaterials zum Teil ebenfalls auf die Verwendung von Natriumsulfat verzichtet. Zum Beispiel wurden für Irgarol 1051 sehr schlechte WFR bei Verwendung des Trocknungsmittels erhalten, wobei Detektionsprobleme des eingesetzten GC-MS mit Hilfe von zusätzlichen AFID-Messungen ausgeschlossen werden konnten.

2.2.3.3 *Anwendung der Analysenmethode als Multirückstandsmethode für verschiedene Matrices*

Über die Beteiligung an einer 1997 durchgeführten Prozeßstudie zu Vorkommen und Anreicherung der synthetischen Moschusverbindungen bot sich die Möglichkeit, das erarbeitete Analyseverfahren in Form einer Multirückstands-Analyse oder auch Multikompartment-Analyse über einen sogenannten Laborleistungstest zu validieren. Alle zu dieser Problematik hier aufgeführten Ergebnisse sind ebenso als Teil der Dissertationsschrift von R. Gatermann ausführlich diskutiert und beschrieben.^[49] Hierfür wurde die Anwendung der analytischen Methode für Biota in Form einer vergleichenden Analyse eines Muschelhomogenats und eines Fettextrakts einer Aalprobe gewählt. Während bei der Analyse der Muschelproben die gesamte Analysenmethode verglichen wurde, spiegelt die Untersuchung der Aalproben nur die Aufarbeitung ab dem GPC-Schritt wider.

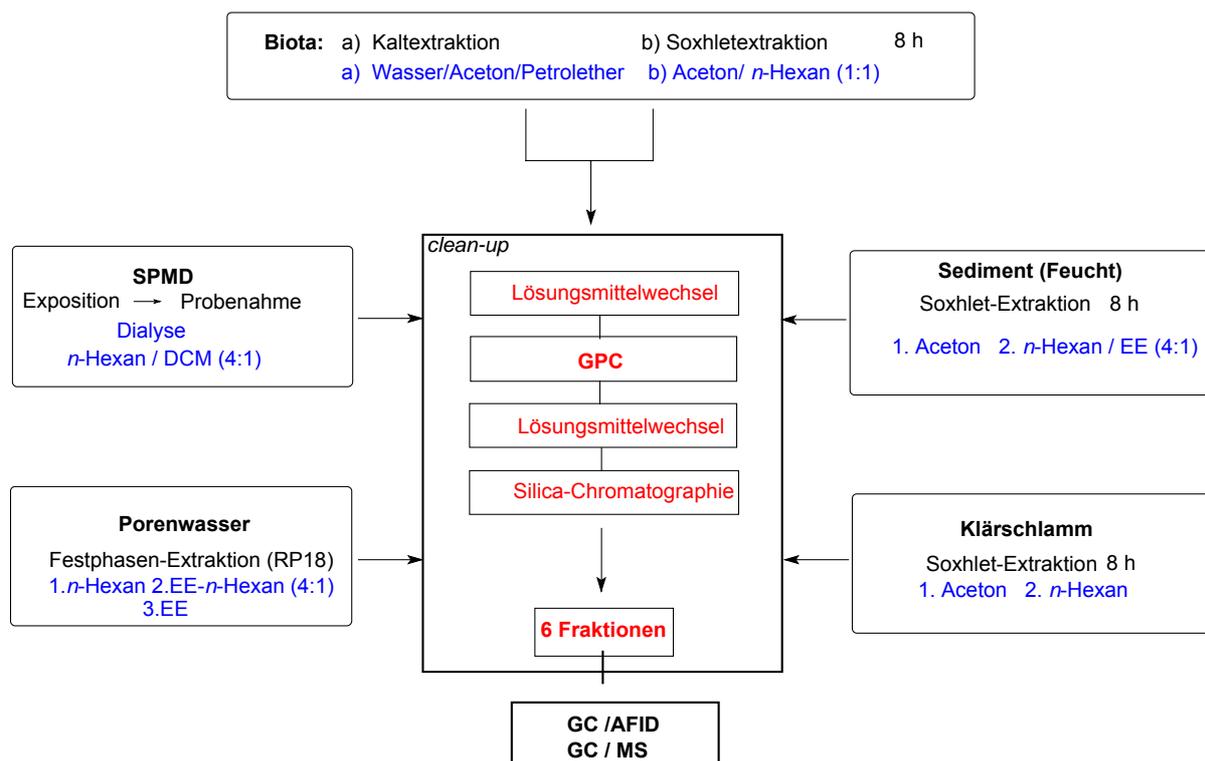


Abbildung 9: Analysenschema für die Bearbeitung von Sediment-, Klärschlamm-, Biota- und SPMD-Proben

Die Muscheln entstammten dem unbelasteten Gartower See und wurden sieben Wochen in Hälterungsnetzen im Klärteich exponiert. Nach der Entnahme wurden die Muscheln in Hamburg entschalt und feucht, ohne Zusatz von Natriumsulfat, homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend aufgeteilt, wobei jeweils eine Probe von der LVUA Neumünster und der Universität Hamburg parallel analysiert wurde. In Tabelle 2 werden die erhaltenen Ergebnisse für zwei Aalpoolproben und das Muschelhomogenat verglichen. Wie bereits in Kapitel 2.2.3.2 erläutert wurde, erfolgte hierfür eine Zweifachbestimmung der Probe mit und ohne Zusatz von Natriumsulfat, um mögliche Verluste durch das Trocknungsverfahren zu überprüfen.

Tabelle 2 : Vergleich der ermittelten Werte für 2 Aalproben und eine Muschelprobe in µg/g FG, die über zwei unterschiedliche Analysemethoden ermittelt wurden.

Verbindung	Aal (MW*) [ng/g EOM]		Muschel [ng/g EOM]	
	Uni Hamburg	LVUA-Neum.	Uni Hamburg	LVUA-Neum.
HHCB	4.100 ± 700	4.800	111.000	120.000
AHTN	2.000 ± 400	2.600	43.000	45.000
MX	200 ± 10	240	73	130
MK	380 ± 60	390	1.050	1.440
MX-4-Amin	3 (n=1)	60	450	1.550

MW = Mittelwert der Bestimmung (n=5)

Resultat der zweifachen Aufarbeitung einer „feuchten“ Muschelprobe ohne Natriumsulfat im Vergleich zur Probenaufarbeitung unter Verwendung von Natriumsulfat war, daß keine Verluste im Hinblick auf die Moschus-Verbindungen festgestellt werden konnten. Eine Aufarbeitung der Proben ist jedoch durch eine Trocknung wesentlich vereinfacht, da hierdurch ein homogenerer Extrakt entsteht als bei der direkten Extraktion von „feuchten“ Biota-Homogenaten. Insgesamt konnte der Vergleichstest belegen, daß für HHCB, AHTN, MX und MK eine ausgezeichnete Übereinstimmung der Ergebnisse vorhanden ist, lediglich für MX-4-Amin wurden größere Abweichungen erhalten.

2.2.3.4 Arbeitsbereich, Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Analyse von Sedimentproben

Es wurden aus den Versuchen neben den Wiederfindungsraten auch Bestimmungsgrenzen für die zu untersuchenden Zielverbindungen berechnet. Durch eine Kalibrierung wurde der Arbeitsbereich des AFIDs für die Analyse von N- und P-haltigen Verbindungen bestimmt. Alle Quantifizierungen wurden mit Hilfe eines AFIDs neuerer Bauart über externe Standards durchgeführt. Es wurden dafür Konzentrationsbereiche gewählt, die in etwa den realen Gehalten der Analyten in den Proben entsprachen. Im Gegensatz zu älteren AFID-Detektoren zeigte das Ergebnis der Kalibrierung einen relativ großen linearen Bereich, zudem erwies sich der verwendete Detektor über längere Zeiträume als deutlich stabiler als die älteren im Arbeitskreis vorhandenen AFID-Detektoren. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der AFID- bzw. der GC-MS Analytik unterscheiden sich in Einzelfällen stark: so liegt das Nachweisvermögen für phosphororganische Verbindungen um den Faktor 100 über dem des GC-MS-Systems. Berechnungsbasis für die Bestimmungsgrenze war die jeweils kleinste eingesetzte Konzentration mit einem Signal von mindestens der zehnfachen Größe des Untergrundrauschens. Zusätzlich wurde für die Irgarol-Untersuchungsreihe die Bestimmungsgrenze an einer Realprobe über das Standardadditionsverfahren in 3 verschiedenen Konzentrationen durchgeführt.

Ergebnis der Kalibrierung und des Standard-Additionsverfahren für den AFID

Linearität des Detektors (AFID):	0,05 ng/g – 1000 ng/g
Arbeitsbereich:	0,5 ng/g – 1000 ng/g
Phosphororganische Verbindungen	0,005 ng/g – 100 ng/g

Die Angabe zur oberen Grenze des Arbeitsbereiches entspricht der maximal eingesetzten Standardkonzentration. Kommt es zu Überschreitungen dieser Analyt-Konzentrationen in der Probe, sollten die Proben auf die entsprechenden Arbeitskonzentrationen der Standardmischungen verdünnt werden.

Für die Untersuchungen auf verschiedene Zielverbindungen (s. Kapitel 2.4, Nordseeproben) bleibt insgesamt festzuhalten: Die Bestimmungsgrenze bildet die gerade noch quantifizierbare Menge des Kontaminanten in der Probe, korrigiert um die Wiederfindungsraten der individuellen Komponenten. Dieses Maß ist extrem von den Eigenschaften der verwendeten Probenmatrix

abhängig und wird durch die jeweils in den Fraktionen vorhandenen Komponentengemische beeinflusst. Da diese jedesmal unterschiedlich sind, sollten Bestimmungsgrenzen zusätzlich zu jeder Probenserie berechnet werden. Alternativ wird eine Quantifizierung unter Verwendung von sogenannten Wiederfindungsstandards durchgeführt. Dieses Verfahren erfordert allerdings eine Reihe an Einzelverbindungen, die einerseits nicht in Umweltproben vorkommen und sich andererseits jeweils in einer definierten Fraktion des clean-up-Schrittes zu annähernd 100 % wiederfinden. Um in allen Fraktionen Quantifizierungen durchführen zu können, müssen daher entsprechend viele geeignete Verbindungen gefunden werden. In der Regel werden zu diesem Zweck deuterierte Verbindungen hergestellt und eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Verfahren nur in einzelnen Fällen angewendet (siehe auch Quantifizierung der Moschusverbindungen im Kapitel 4). In Untersuchungen, die eine chemische und toxikologische Analyse kombinieren, ist der Einsatz solcher Verbindungen hingegen nicht sinnvoll, da eine eventuelle Wirkung nicht ausgeschlossen werden kann. Bis zum Abschluß dieser Arbeit wurde kein geeigneter bzw. verträglicher Standard für beide Verfahren gefunden.

2.2.4 Dokumentation und Verwendung von Referenzmaterial

Rückverfolgbarkeit und Rückführbarkeit der Ergebnisse sind wichtige Anforderungen an die Qualität einer analytischen Untersuchung. Dies bedeutet vor allem eine ausführliche und in jedem Schritt nachvollziehbare Dokumentation der Arbeiten. Zudem sollten als Konsequenz der Rückführbarkeit von Daten alle Ergebnisse in einer ungebrochenen Kette von Vergleichen auf internationale Standards zurückgeführt werden.

- ⇒ Die Kalibrierung der genutzten Meßinstrumente sollte somit unter Verwendung von Standardlösungen, die aus Verdünnung von zertifizierten Referenzmaterialien (CRM) oder den reinen Substanzen erhalten wurden, durchgeführt werden.
- ⇒ Die Wiederfindungsversuche (über die ganze Methode) sollten wiederum mit CRM durchgeführt werden, welches mit den zu analysierenden Proben vergleichbar ist.
- ⇒ Für die zu untersuchenden Zielverbindungen standen zu Beginn der Arbeit teilweise keine zertifizierten Standards zur Verfügung. Die Nitromoschusmetabolite wurden innerhalb der Arbeitsgruppe selbst synthetisiert bzw. entstammen einer Verdünnungslösung, die von der LVUA Neumünster hergestellt und uns zur Verfügung gestellt wurde. Für alle weiteren Zielverbindungen wurden Reinsubstanzen in Lösung gebracht und daraus Verdünnungsreihen angesetzt. Die Konzentrationen der verwendeten Standards sind im Anhang aufgeführt.

Als Referenzmaterial für Sedimente stehen verschiedene Möglichkeiten zur Auswahl:

- ⇒ Unkontaminiertes Real-Sediment: entspricht einem Sediment mit möglichst geringem Belastungsniveau.

- ⇒ Standard-Referenz-Sediment: Herstellung aus anorganischen und organischen Referenzmaterialien oder aber mehrfach extrahiertes Kontrollsediment, so daß keine Hintergrundbelastung mehr vorhanden ist.
- ⇒ Referenzsediment mit einer **bekanntem** „natürlichen Schadstoffbelastung“. Hierbei handelt es sich um belastetes Probenmaterial, worin die Konzentrationen ausgewählter Zielverbindungen durch zertifizierte Analysen bestimmt wurden und daher als Referenz eingesetzt werden können.

Zur Zeit der Durchführung der Versuche waren für Feucht-Sedimentproben keine CRM im bezug auf die sehr hydrophilen, ausgewählten Zielverbindungen erhältlich. Um mögliche Matrixeffekte zu erfassen, bietet sich die Möglichkeit, Versuche an Originalproben durchzuführen, die mit den Zielverbindungen in deutlich höher liegenden Konzentrationen dotiert wurden. Bei der Auswahl des Referenzsedimentes sollten die physikalisch-chemischen Eigenschaften wie TOC-Gehalt und die Korngröße möglichst den späteren Testsedimenten ähnlich sein. Die Hintergrundbelastung des Referenzsedimentes muß vor Beginn der Versuchsreihe bekannt (d.h. mit Hilfe der zu prüfenden Methode analysiert sein), und daraus folgend sollten die Konzentrationen des Test- und Referenzsedimentes hinreichend unterschiedlich sein.

Verwendet man hingegen ein mehrfach vorextrahiertes Sediment und stockt dieses mit Reinstwasser und „Spike-Standard“ auf, fallen Matrixeffekte und Hintergrundbelastung bei der anschließenden Untersuchung zur Bestimmung von WFR weg. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind in dem Moment schlecht auf Realproben übertragbar, da diese deutlich tiefer liegen dürften, als es mit Matrixanteilen erreichbar wäre. Generell entstehen durch Sediment-Dotierungen leicht falsch positive Befunde, da sich die Bindungs- und Adsorptionsgleichgewichte zwischen den Kontaminanten und Partikeloberflächen bzw. dem gelösten partikulären Material sehr viel langsamer einstellen als im Vergleich zur Dotierung von Wasserproben mit Aceton-Mischungen.

Für die Versuche zur WFR wurden unter Berücksichtigung oben genannter Kriterien zwei verschiedene Referenzsedimente verwendet. Die Untersuchungen mit der Modellmischung 1 (s.a. Tabelle 1) wurden mit Hilfe einer sehr gering belasteten Störprobe, und die Versuche mit der Modellmischung 2 mit Hilfe einer gering belasteten Nordseewattprobe durchgeführt. Die Anwendung der zwei verschiedenen Materialien war durch die unterschiedlichen Untersuchungsziele vorgegeben. (Die Untersuchung auf Moschusmetabolite erfolgte anfangs in Elbsedimenten, daher wurde eine wesentlich geringer belastete limnische Probe verwendet. Die Untersuchung auf Irgarol erfolgte in marinen Proben, den Nord- u. Ostseehafenproben).

Alle innerhalb dieser Studie untersuchten Proben unterlagen einer vollständigen Dokumentation: Angefangen bei der Probenahme, über den Transport, Lagerung bis zur endgültigen gaschromatographischen Vermessung können alle Handlungen in bezug auf die Proben anhand von Protokollen bzw. Probenlaufzetteln nachgelesen werden. Die Probenbezifferung wurde entsprechend arbeitskreisinternen Vorgaben (SOP P-Name) vollzogen. Sämtliche Berechnungen sowie alle einzelnen GC- bzw. GC-MS-Chromatogramme sind auf Datenträgern gespeichert, deren Ablage auf den Probenlaufzetteln vermerkt ist. Muster der Probenahmeprotokolle der verschiedenen Probenahmeserien als auch der unterschiedlichen verwendeten Probenlaufzettel sind im Anhang

enthalten. Durch diese Maßnahmen kann eine vollständige Rückverfolgbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden.

2.2.5 Verifizierung der Leistungsfähigkeit

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit und Güte der Methode Versuche mit unterschiedlichen Detektionsverfahren durchgeführt. Aus den Versuchen zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurde abgeleitet, daß eine sequenzielle Extraktion (Aceton → *n*-Hexan) für die ausgewählten Zielverbindungen nicht notwendig ist. Ob die alleinige Extraktion mit Aceton ausreichend für eine vollständige Erfassung aller Inhaltsstoffe ist, wurde zusätzlich mit Hilfe einer Nordseeprobe (KS11) geprüft. Es sollte an einer realen Probe die gesamte Analyse mit einem Aceton-Extrakt und einem nachgeschalteten *n*-Hexan-Extrakt durchgeführt werden. Beide Extrakte wurden durch ein Screening und die unterschiedlichen Detektionsmethoden möglichst vollständig charakterisiert. Auf die Bestimmung von Wiederfindungsraten der Silika-Fractionen 1 und 2 wurde verzichtet, da die Quantifizierung sehr lipophiler Komponenten dieser Fractionen nicht im Vordergrund der Methodenentwicklung stand. Im folgenden werden die Fractionen

- (1) des Aceton-Extraktes (A) mit Fr. 1 - 7 A und
- (2) des *n*-Hexan-Nachextraktes (H) mit Fr. 1 - 4 H bezeichnet.

2.2.5.1 Belastungsabschätzung durch ECD-, AFID-Messungen

Zielsetzung:

- ⇒ Anwendung des Modellversuches auf Realproben. Es soll belegt werden, daß die Verbindungen, die in den WFR-Versuchen eingesetzt werden, auch in Realproben erfaßt werden, sofern sie in den Proben vorhanden sind.
- ⇒ Die hohe Empfindlichkeit des AFIDs sollte genutzt werden, um zusätzliche Hinweise auf die Belastung mit polaren Verbindungen ($\log K_{OW} < 2$) zu erhalten.
- ⇒ Die hohe Nachweismöglichkeit des ECDs für chlororganische und allgemein elektrophile Komponenten sollte ergänzende Informationen über die Inhaltsstoffe der lipophilen Fractionen 1-3 ergeben.
- ⇒ Für eine Weiterentwicklung der Fraktionierungstechnik soll ermittelt werden, an welchen Stellen eine Unterfraktionierung sinnvoll erscheint.

Die Ergebnisse der unterschiedlichen Detektionstechniken werden durch die folgenden Abbildungen 9-15 auf den Seiten 46-52 wiedergegeben. Unterschiedliche Belastungen sollen mit Hilfe der Chromatogramme aufgezeigt und mit den Daten der Screening-Untersuchungen (MS) verglichen werden. Vergleichende Ergebnisse aus den GC-MS-Untersuchungen beider Extrakte werden jeweils tabellarisch aufgeführt. Dargestellt sind ausgewählte Verbindungen, die nach Bibliotheksvorschlägen bzw. durch Standardübereinstimmung ermittelt wurden.

Ein Problem der gewählten Darstellungsweise ist, daß sich die Volumina der gemessenen Fraktionen (z.B. 1A, 1H) zum Teil unterscheiden und daher nicht direkt von der Signalgröße und Anzahl auf eine höhere oder niedrigere Belastung rückgeschlossen werden kann. Ein qualitativer Vergleich ist allerdings möglich, da die Volumenunterschiede den Faktor zwei nicht überschreiten.

Eine zusätzliche Orientierung in bezug auf die Aufkonzentrierungsunterschiede der einzelnen Fraktionen liefert die Größe dreier Organophosphorsäureester, welche als Laborkontaminationen vorkommen und in geringem Maße immer sichtbar sind. (TnBP/TBP für AFID-Messung).

Durch den hohen Gehalt an KW und PAK und dementsprechend starken Überlagerungen erwies sich der Nachweis chlorierter Verbindungen geringerer Konzentration als sehr schwierig. Die Sensitivität des ECD ist für elektrophile Substanzklassen um ein vielfaches höher als die des Massenspektrometers. Nicht zuletzt ist dies auch ein Grund dafür, daß nach wie vor bei Routineanalyseverfahren die ECD-Detektion auf Organochlorpestizide die Methode der Wahl darstellt. Ein Vergleich mit einem externen Standard, der ein Gemisch an chlorierten Xenobiotika enthielt, zeigte teilweise gute Übereinstimmungen, Substanzen wie z.B. OCS, DDT, DDE, DDD sowie 2 HCH-Isomere konnten aufgrund der niedrigen Konzentrationen durch die GC-MS-Analyse hingegen nicht sicher bestätigt werden.

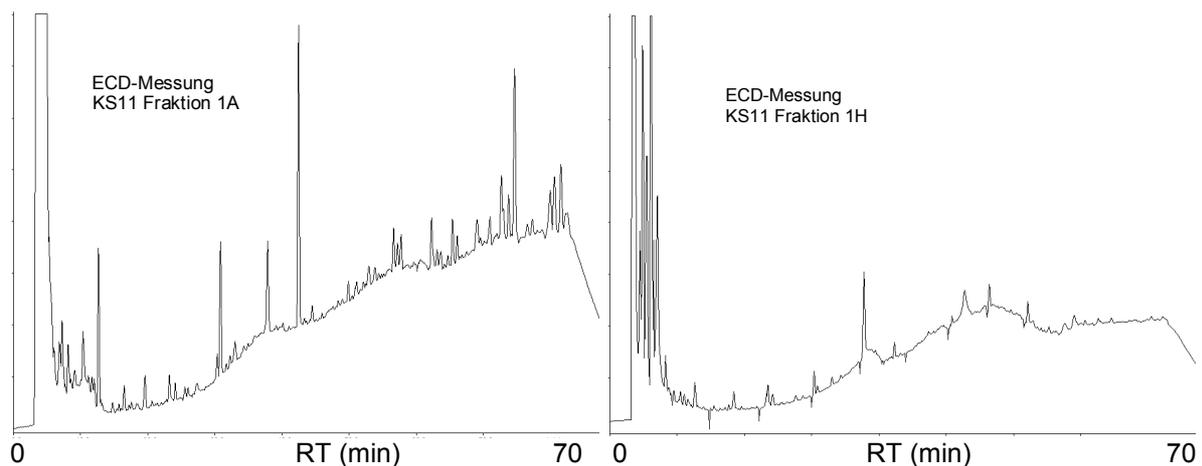


Abbildung 10: ECD-Chromatogramme der Fraktion 1 (Probe KS11): 1A Aceton-Extrakt; 1H n-Hexan-Extrakt

Der Vergleich von ECD- und GC-MS-Chromatogrammen zeigt für Fraktion 1 des *n*-Hexan-Extrakts keine „Neu-Identifizierungen“. Wohl aber konnten noch deutliche Rückstände einer Reihe an lipophilen Substanzen erfaßt werden (s.a. Tabelle 3, Chlorbenzole).

Tabelle 3: Ausgewählte Ergebnisse der GC-MS-Untersuchung (Aceton- /*n*-Hexan-Extrakt)

Fr.	Scan Nr.	Verbindung	m/z	Ident. [%]
1	1000	Dichlorbenzol	146/148/111	71
1h	1000	Dichlorbenzol (sehr gering)	146/148/111	
1h	1018	Dichlorbenzol (sehr gering)	146/148/111	68
1	1020	Dichlorbenzol	146/148/111	95
1	1066	Dichlorbenzol	146/148/111	71
1h	1066	Dichlorbenzol (sehr gering)	146/148/111	
1h	1119	Diethylbenzol	134/ 119 /105	59
1	1120	Diethylbenzol	134/119/ 105	61
1h	1171	1,4-Dimethyl-2-ethylbenzol	134/ 119 /111	51
1	1179	Alkylbenzol	134/ 119	60
1	1330	Trichlorbenzol	182, 180 147, 145, 109	80
1h	1330	Trichlorbenzol (sehr gering)	182, 180 147, 145, 109	
1	1481	Naphthalin	128/102	88
1h	1481	Naphthalin	128/102	71
1	1792	Tri- <i>iso</i> -propylbenzol	204/ 189 /161/105	93
1	2090	Dimethylhexylmethylbenzol	204/ 119	66
1h	2092	Dimethylhexylmethylbenzol	204/ 119	50

Aus der Tabelle wird zum einen ersichtlich, daß sowohl im den Aceton-Extrakt als auch im nachgeschalteten *n*-Hexan-Extrakt sehr lipophile Verbindungen wie KW, PAK und auch die Chlorbenzole zugeordnet werden konnten. Zum andern zeigt die Auflistung, daß auch für Fraktion 1 noch Rückstände der Sediment-Inhalte nach der Aceton-Extraktion vorhanden waren.

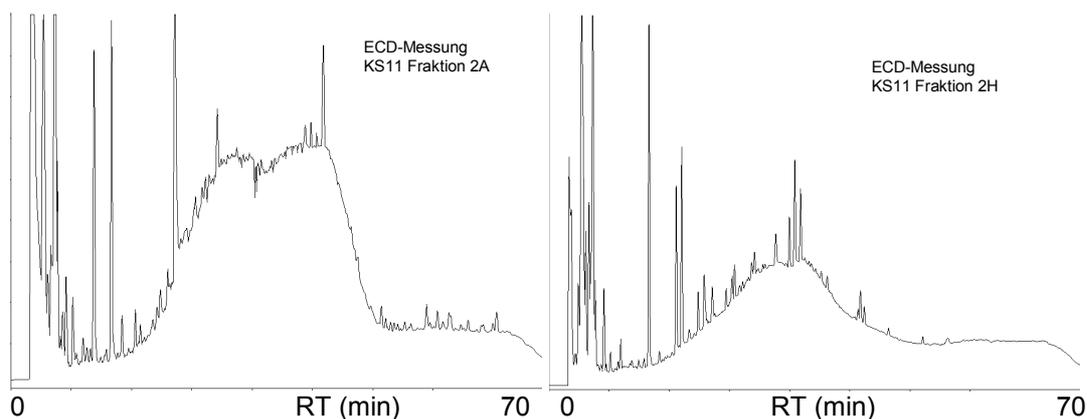


Abbildung 11: ECD-Chromatogramme der Fraktion 2 (Probe KS11): 2A Aceton-Extrakt; 2 H *n*-Hexan-Extrakt

Fraktion 2 A war deutlich höher belastet, so daß für die ECD-Bestimmung noch ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt notwendig war. Eine insgesamt viel geringere Belastung lag in Fraktion 2 H vor. Dennoch war ein hoher, chromatographisch nicht aufzulösender Untergrund geblieben. Die Abbildung 11 veranschaulicht, daß für stärker belastete Proben durch getrennte Extraktion und nachfolgend getrennte Aufarbeitung der lipophilen Fraktionen die Identifizierung der Analyten wegen der geringeren Matrixbelastung erleichtert ist. Es werden in der *n*-Hexan-Fraktion lediglich Stoffe

nachgewiesen, die auch in der Aceton-Fraktion vorhanden waren, dies deutet auf eine Erfassung von Restmengen. Eine Erklärung für die schlechte Auflösung der Chromatogramme könnte noch vorhandener Schwefel sein, welcher durch das Clean-up möglicherweise nicht restlos abgetrennt wurde.^[8] Durch die lipophilen Eigenschaften des elementaren Schwefels eluiert dieser generell in den Fraktionen 1-2 der verwendeten Kieselgel-Chromatographie. Im Gegensatz zum ECD ergeben Schwefel und Schwefelverbindungen kaum einen bzw. keinen Response bei der Detektion mittels AFID. Durch diese Diskriminierung erscheinen die Chromatogramme dann im wesentlichen unbelastet. Demgegenüber erzeugen Kohlenwasserstoffe negative Signale, wobei die Intensität der Signale allerdings stark von den verwendeten Gasen und Gasströmen abhängig ist.

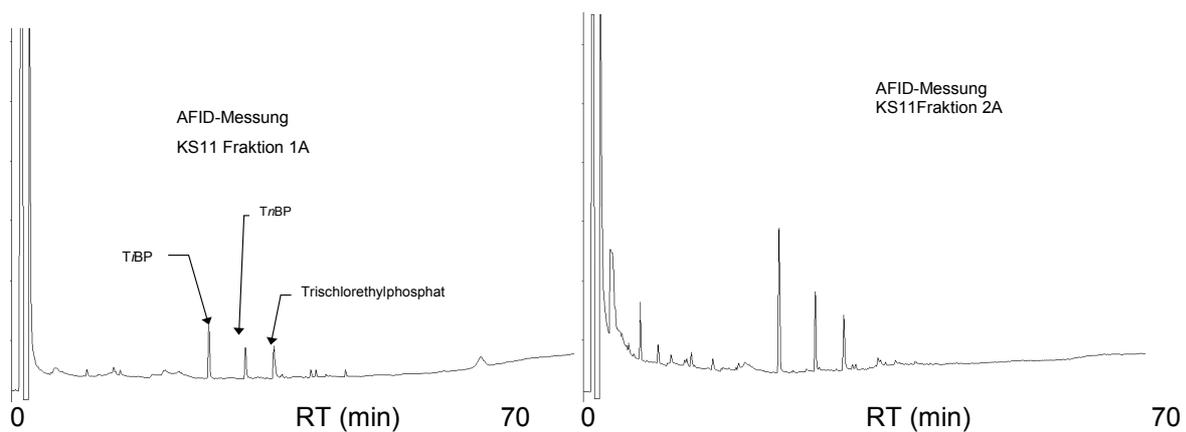


Abbildung 12: Vergleich AFID-Bestimmung der Fraktion 1A und 2A des Aceton-Extrakts der Probe KS11

Trotzdem erscheint der Vergleich der Chromatogramme (Fraktion 2; ECD-AFID) interessant, weil Matrixbelastungen äußerst unterschiedlich sichtbar bzw. unterdrückt werden. Besonders hervorzuheben ist die hohe Selektivität des AFIDs. In Übereinstimmung mit den GC-MS-Messungen ist der Gehalt an N- und P-haltigen Verbindungen in den Fraktionen 1 und 2 der Silica-Fraktionierung sehr gering, wobei die detektierten Signale auf bekannte Blindwerte zurückzuführen sind.

Tabelle 4: Ausgewählte Ergebnisse der GC-MS-Untersuchung (Aceton-/n-Hexan-Extrakt)

Fr	Scan Nr.	Verbindung	m/z	Identität[%]
2	906	Dimethyltrisulfid	128/ 126 /111	98
2h	906	Dimethyltrisulfid	126/111/85	76
2h	960	Trimethylbenzol	120/105	70
2	961	1,2,3-Trimethylbenzol	120/ 105	85
2	1120	Diethylbenzol	134/ 119 /105	63
2h	1120	Diethylbenzol	134/119/105	64
2h	1422	Hexahydromethanoinden	164	68
2h	1465	2-Fluor-naphthalin ?	146/113	70
2	1476	Naphthalin	128/102	98
2h	1479	Naphthalin	128/102	
2	1757	Methylnaphthalin	141/142/115	94
2h	1764	Methylnaphthalin	141/115	90
2	1793	Triisopropylbenzol	204/ 189 /161/147/133/119	93
2	1799	Methylnaphthalin	141/142/115	97
2h	1801	Methylnaphthalin	141/115	
2	1842	Trimethyltetrahydronaphthalin	174/ 159	62
2	1894	Trimethyltetrahydronaphthalin	174/ 159 /144/128	75
2h	1958	1,1'-Biphenyl	154/128	89
2	1960	1,1'-Biphenyl	154 /153/152/139/128/115	93
2h	2028	Alkyl-naphthalin	156/141/136/128/115	
2h	2056	Alkyl-naphthalin	156/141	
2h	2068	Alkyl-naphthalin	156/141	
2h	2290	3-Chloro-benzothiophene	168 /170/139/133	50
2h	2352	Trimethylnaphthalin	170/155	61
2	2488	Tetramethylnaphthalin	184/ 169 /155	63
2	2514	Tetramethylnaphthalin	184/ 169 /155	59
2	2532	9H-Xanthen	181 /169/152	75
2h	2537	9H-Xanthen	181	51
2	2539	1,1'-Biphenyl-4-carboxaldehyd oder Isomeres	181 /182/152	86
2	2555	1,1'-Biphenyl-4-Carboxaldehyd (s.o.)	181 /182/(169)/152	65
2	2627	Tetramethylnaphthalin	184/ 169	72
2h	2628	Tetramethylnaphthalin	184/ 169	59
2	2679	9-Methyl-9H-fluoren	180/ 165	72
2h	2746	??	266/182/ 117	
2	2747	Diethylbiphenyl	210/195/ 181 /166/152	70
2h	2780	???	266/182/ 117	
2h	2809	???	266/182/ 117	
2	2840	Phenanthren	178 /152	54
2h	2843	Phenanthren	178 /152	74

Mehrere MS-Spektren von Verbindungen des *n*-Hexan-Extraktes wurden nicht im Aceton-Extrakt wiedergefunden bzw. waren überlagert, allerdings konnte den Spektren auch keine Verbindungsstruktur durch Vergleich mit Bibliotheksspektren zugeordnet werden. Eine ausführliche Spektreninterpretation und Strukturzuordnung erschien zum einem für diese Spektren nicht sinnvoll, zum anderen galt der Schwerpunkt dieser Untersuchungen eher dem polaren Bereich.

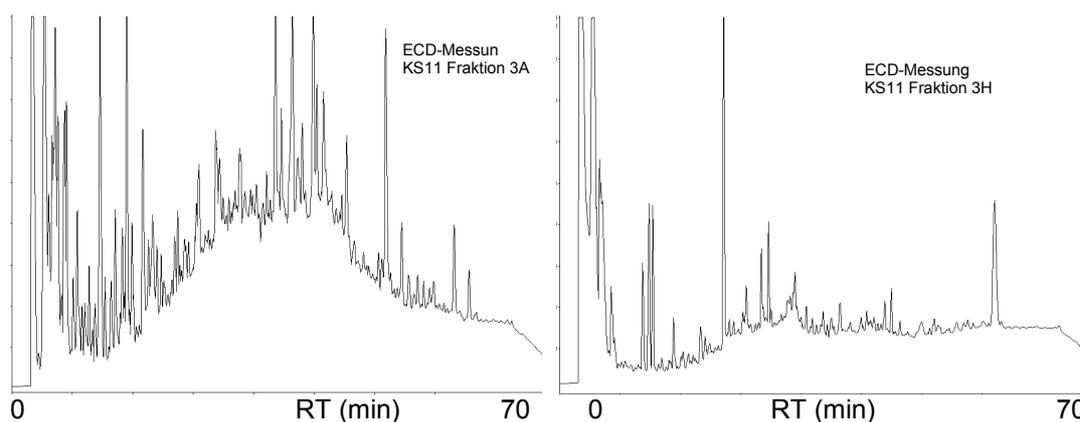


Abbildung 13: ECD-Chromatogramme der Fraktion 3 (Probe KS11): 3A Aceton-Extrakt; 3H *n*-Hexan-Extrakt

Die Untergrundbelastung der Fraktion 3A war ohne Unterfraktionierung bzw. weiteren Clean-up-Schritt ebenfalls zu hoch für ECD-Bestimmungen. Für die Analyse von Spurenstoffen bestanden zu starke Überlagerungen durch wesentlich höher konzentrierte Kohlenwasserstoffe (bi- u. tricyclische Aromaten). Daher konnte durch die ECD-Messung mit Hilfe von externen Standardgemischen lediglich eine qualitative Zuordnung einer Reihe sogenannter „persistent-organic-pollutants“ (POPs) erfolgen. Beispiele hierfür sind u.a. Isomere des Hexachlorcyclohexans (HCH) sowie Dichlor-diphenyl-trichlorethans (DDT) und die Metabolite Dichlor-diphenyl-dichlorethan (DDD) und Dichlor-diphenyl-ethen (DDE). Der Vergleich der Retentionszeiten zeigte auch für diese Fraktion zwischen Aceton- und *n*-Hexan-Extrakt eine Übereinstimmung der vorhanden Signale. Die Ergebnisse der GC-MS-Messungen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Durch den nachgeschalteten *n*-Hexan-Extrakt wurden für diese Fraktionen keine Informationen über zusätzliche Verbindungen gewonnen. Bei der Interpretation von Abbildung 13 ist zu beachten, daß die Fraktion 3H um den Faktor zwei stärker angereichert werden mußte, um signifikante Signale zu erhalten. Insgesamt war für diesen Anreicherungsfaktor auch schon eine erhebliche Hintergrundbelastung meßbar.

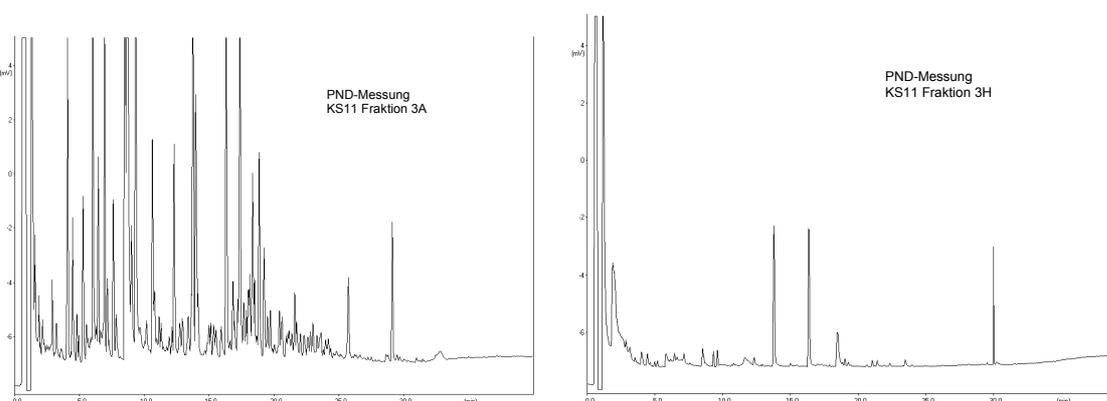


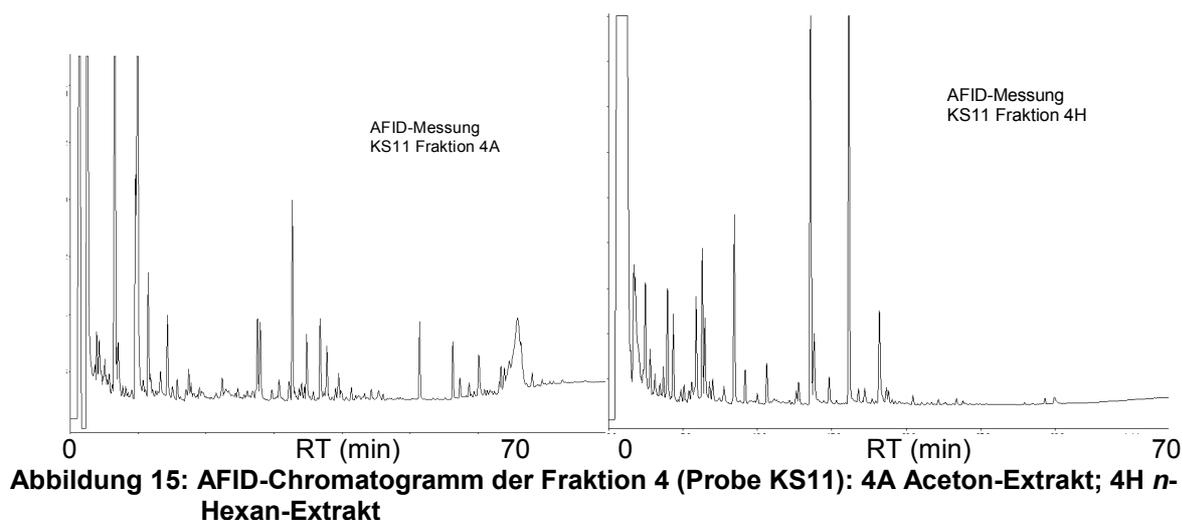
Abbildung 14: AFID-Chromatogramm Fraktion 3 (Probe KS11): 3A Aceton-Extrakt; 3H *n*-Hexan-Extrakt. Fraktion 3H ist um den Faktor 2 aufkonzentriert.

Tabelle 5: Ausgewählte Ergebnisse der Screening-Untersuchung Fraktion 3 (Probe KS11)

Peak-Nr.	Scan Nr.	Verbindung	m/z	Ident. [%]
3h	1150	Ethoxybenzol	150/135/(122)/107	
3	1165	<i>p</i> -Tolyl- <i>p</i> -methoxybenzoesulfonylamid	134 /119/106	
3	1465	Ethylidimethylbenzol	134/ 119 (146)	65
3	1612	Isopropenylmethoxybenzol	148/134/119/ 105	63
3h	1614	Isopropenylmethoxybenzol	148/133/119/105	53
3	1704	Alkylphenol	150/ 135	50
3h	1705	Alkylphenol	150/ 135	
3	1728	Alkylphenol	150/ 135 /107	52
3	1765	2-Methyl-benzthiazol	149 /108	60
3	1841	2,5-Dichloranilin	161/126	Std
3	1971	3-Methyl-indol	130 /103	84
3	1991	Trimethoxybenzol	168/ 153 /125/111	69
3	2177	Dibutyl-phosphanyl-ethyl-pyridin	194 /138/(104)	61

Ab Fraktion 3 ist eine deutlich höhere Belastung mit sauerstoff-, stickstoff- und phosphorhaltigen Verbindungen erkennbar. In Übereinstimmung mit den Screening-Ergebnissen der GC-MS-Untersuchungen läßt sich zusammenfassen, daß stickstoffhaltige Substanzen (*N*-Heterocyklen, Carbazole, Nitroverbindungen, Aniline) überwiegend erst ab Fraktion 3 (A) eluiert werden, darunter auch Pyridine, Pyrole und Pyrimidine biogener Herkunft. Ebenso konnten in dieser Fraktion die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu untersuchenden Zielverbindungsgruppen der chlorierten Aniline und Chlornitrobenzole identifiziert werden. Nitrobenzol wurde, aufgrund der zu geringen Sensitivität des eingesetzten GC-MS, ausschließlich über die AFID-Bestimmung detektiert.

Im *n*-Hexan-Extrakt wurden insgesamt wenig Inhaltstoffe nachgewiesen. Hier deutet sich, wie auch schon die Ergebnisse der WFR-Versuche zeigten, ein maximaler Gehalt von 1-2 % an Rückständen an. Bei einer getrennten Aufarbeitung nach sequentieller Extraktion erscheint es daher sinnvoll, die Silica-Chromatographie des *n*-Hexan-Extraktes nach der dritten Fraktion zu beenden.



Beim Vergleich der verschiedenen Detektions-Techniken wurde die geringste Signaldichte in den Chromatogrammen der Fraktion 4 erhalten. Hier wurde eine gute Separation der Peaks erzielt. Die

Resultate der AFID- und MS-Messungen stimmen ebenfalls gut überein, denn es wurden massenspektrometrisch viele Signale sowohl schwefelhaltigen als auch sauerstoffhaltigen Kohlenwasserstoffen zugeordnet, welche durch den AFID nicht detektiert werden können (Tabelle 6).

Ein großer Teil der zu untersuchenden Zielverbindungen wird ebenso in Fraktion 4 eluiert. Die wesentlich geringere Untergrundbelastung erleichtert die Identifizierung der Target-Verbindungen für diese Fraktion. Die Silika-Fraktionierung ermöglicht somit eine Auftrennung des komplexen Substanzgemisches in verschiedene Verbindungsklassen, die zusätzlich sehr selektiv mit Hilfe unterschiedlicher Detektions-Techniken untersucht werden können (Tabelle 6). In dieser Hinsicht konnte bereits ein Teil der angestrebten Methodenziele erreicht werden.

Tabelle 6: Ausgewählte Ergebnisse Fraktionen 4A und 4H (GC-MS), Probe KS11

Peak-Nr.	Scan Nr.	Verbindung	m/z	Ident. [%]
4h	1184	Dihydotetramethylpyrazol	138/ 123 /81	47
4	1258	2,4-Dimethyl-5-ethylthiazol	141 /126/(113)/100	61
4	1364	Dimethylethylthiazol	141/ 126 /(109)	70
4h	1457	Methylthiothiadiazolthion	164/131/88/81	
4	1467	Tolyl-ethanon	134/119	
4h	1467	Tolyl-ethanon	134/119/99/ 91	79
4	1513	Ethyl-dimethylthiophen	140/ 125	75
4h	1517	Ethyl-dimethylthiophen	140/ 125 / (99)	
4h	1594	Dimethylhydroxy-heptanoylsäure	141/ 99	86
4	1672	3-Acetyl-2,5-dimethylthiophen	154/ 139 /111/100/(193)	65
4h	1672	3-Acetyl-2,5-dimethylthiophen	99 / 139	
4h	1797	5-Formyl-4-methyl-2-methylthiopyrimidin	168 /122	45
4	1799	5-Formyl-4-methyl-2-methylthiopyrimidin	168 /122	75
4	1820	Dioxoethylenbis(iminosulphur pentafluorid)?	170/ 127 /123/111/100	71
4	1996	Trimethoxybenzol	168/ 153 /125/111	73
4h	1996	Trimethoxybenzol	168/ 153 /125/111/93/ 91	60
4	2169	Trimethyl-cyclohexenyl-butenon	177 /159/135/121/107	90
4	2268	4-Methoxy-(3-methylthio)phenol	170 /155/127/113/111	74
4	2453	Tetramethyl-4-H-1-benzopyran	173 /153/(125)/111	68
4	2928	Phthalat / Galaxolid + Tonalid	149	91
4h	2930	Phthalat, Spuren von Galaxolid	149 (243/258/213)	

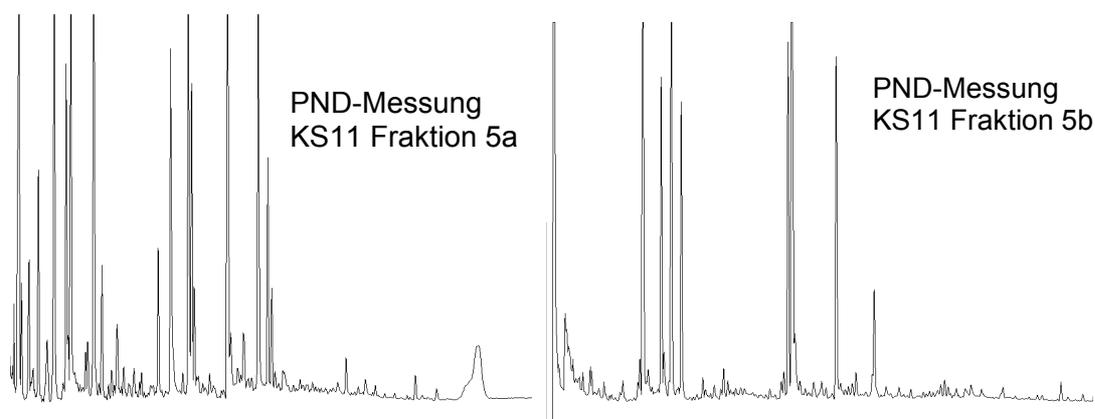


Abbildung 16: AFID-Chromatogramm der Fraktion 5a und 5b, die durch Unterfraktionierung aus Fraktion 5 erhalten wurden (Probe KS11): 5aA und 5bA Aceton-Extrakte

Für Fraktion 5 erfolgte zusätzlich eine Unterfraktionierung in die Fraktionen 5a und 5b, wobei Fraktion 5b nach optischen Kriterien separat aufgefangen wurde und stellt ein schwarz gefärbtes Eluat von etwa 400 µL dar.

Die Inhaltsstoffe der Fraktionen 5a und 5b werden gut chromatographisch aufgetrennt, und in der GC-MS-Messung wurden sehr viele „neue Spektren“ gefunden. Daher ist diese Fraktion im Sinne der Zielvorgabe besonders interessant und bedarf näherer Untersuchung. Ein einfacher Vergleich mit vorhandenen Bibliotheksspektren ergab im Gegensatz zu den Fraktionen 1-3 jedoch kaum Übereinstimmungen. Die Inhaltsstoffe (beispielsweise Triazine, Phenole) gelten als eher hydrophile Komponenten, über deren Vorkommen in marinen Sedimenten allerdings bisher wenig dokumentiert ist. Es konnten weiterhin, wie auch in den Fraktionen zuvor, Thiophene und Thiazole zugeordnet werden (Tabelle 7). Bei der Identifizierung der in Nordseeproben bisher unbekanntem Verbindungen tritt ein generelles Problem der MS-Messungen besonders deutlich hervor: Es mußte hier ein Kompromiß zwischen Empfindlichkeit und Informationsgehalt der Spektren gewählt werden, daher wurden nur Spektren mit $m/z \geq 100$ aufgenommen. Es wurde hierdurch eine größere Nachweisempfindlichkeit erzielt, jedoch können auf diese Weise niedermolekulare Verbindungen oder solche mit wichtigen Fragmenten unter m/z 100 nicht sicher identifiziert werden.

Für alle weiteren hier beschriebenen GC-MS-Bestimmungen besteht die gleiche Problematik. Sie wird in den folgenden Kapiteln der Screening-Untersuchungen erneut aufgegriffen. Als Inhaltsstoffe der Fraktionen 6-8 wurden größtenteils die bereits bekannten Phosphorsäureester identifiziert, daher wird an dieser Stelle auf eine Abbildung verzichtet.

Tabelle 7: Ausgewählte Ergebnisse der Fraktionen 5a und b (GC-MS), KS11

Peak-Nr.	Scan Nr.	Verbindung	m/z	Ident. [%]
5	1230	3,4-Diethylthiophen	140/ 125 /107	78
5	1259	5-Ethyl-2,4-dimethylthiazol	141/126/(113)/100	62
5	1365	Dimethylethylthiazol	141/126	95
5	1372	Isomeres zu 1365	141/126/120/105	
5	1543	Dimethylthiobenzol	138/122/108	56
5	1653	Pyrroldicarboxylsäure	155/137/ 111	72
5	1663	Ethenylsulfonylbenzol	168/(153/111) / 125	57
5	1693	<i>N,N</i> -Diethylmethyl-1 <i>H</i> -pyrazolamin	153/139/127/110	46
5	1731	3- oder 4-Bromphenol	172 /174	Std
5	1802	Ethylmethylthiopyrimidin	168/122	48
5	1829	Benzpropansäure	150/ 104	83
5	1859	Dichloranisol	258/193/178/ 176 /(150/111)	
5	1943	Methoxycarbonylacetylcyclopropan ?	(153)/ 127 /101	53
5	1990	Dimethoxy- <i>N,N</i> -diethylbenzylamin	208/ 151 /(138/123/109/104)	
5	1996	Triethyldihydroimidazon	168/ 153 /125/111	78
5	2015	Dihydro- <i>N</i> -methylphenylsulfonyl-2 <i>H</i> -pyran	126/111/108	71
5	2025	Carboxytrimethylbenzamin	179 /161/133/118/105	69
5	2183	5-Methylbenzotriazol	133/ 104	86
5	2206	Chlorphenylpropionsäure	190/ 147 /113/105/103/101	
5	2438	Butyldimethoxybenzol	194/ 151 /(109)	60
5	2721	Dihydro-Tetramethylindenon	(203)/188/ 173	81
5	2794	Loliolid(Calendin)	196/178/163/153/135/111	(40)
5	2985	Dihydrophenanthryl-acetamid ?	237 /219/195/177/153/138	

2.2.6 Zusammenfassende Fehlerbetrachtung

2.2.6.1 Referenzmaterialien

Zur Herstellung der Stammlösungen der Arbeitsstandards wurden Reinsubstanzen verwendet, wobei der vom Hersteller angegebene Reinheitsgrad zwischen >98 und 99 % liegt. In den Berechnungen zur Standardkonzentration wurde von 100 % ausgegangen, woraus sich ein systematischer Fehler von bis zu 2 % ergibt. Weitere mögliche Fehler setzten sich wie folgt zusammen:

Arbeitsschritt	Gerät	Eigenfehler	max. Gesamtfehler
Einwaage von 20 - 70 mg	Analysenwaage	± 0,2 mg	1,4 mg [2 %]
Verdünnung	Pipetten/Spritzen	0,0001-0,01 mL	1 – 2 %

Da für alle AFID-Bestimmungen externe Standards verwendet wurden und keine zertifizierten Lösungen der untersuchten Substanzen zur Verfügung standen, wurde der mögliche systematische Fehler bei der Herstellung von Standardlösungen berechnet bzw. abgeschätzt. Zu überprüfen galt, inwiefern die Konzentrationen der verwendeten Stammlösungen den vorausgesetzten 100 % entsprachen, da mögliche Abweichungen nicht allein auf die Herstellung der Lösungen zurückzuführen sind, sondern auch Fehler durch unsachgerechte Lagerung auftreten. Es kann hierbei zur Aufkonzentration der Inhaltsstoffe durch Entweichen von Lösungsmitteln kommen. Außerdem sind fast alle untersuchten Substanzen lichtempfindlich, so daß zudem durch Photoabbau Substanzverluste auftreten können.

Für die Fehlerabschätzung wurden Vergleichsstandards angesetzt, welche gegen die routinemäßig verwendeten Standardmischungen vermessen wurden. Da alle Messungen ebenfalls mit Hilfe des AFIDs durchgeführt wurden, war zusätzlich noch der Fehler durch mögliche Schwankungen in der Detektionsempfindlichkeit gegeben. Es wurde, bis auf eine Ausnahme, im Durchschnitt ein Fehler von 10 % für die Richtigkeit der angesetzten Standardlösungen festgestellt. Die Ergebnisse der Einzelmessungen betrugen zwischen 0 und 11 % (Ausnahme NB in einer Standardmischung: 35 %) und werden ausführlich in der Arbeit von R. Gatermann beschrieben.^[49]

2.2.6.2 Sedimentdotierung für WFR-Versuche

Das sogenannte „Spiken“ von festen bzw. dickflüssigen Probenmatrices bei WFR-Versuchen ist sehr problematisch und wurde vielfach kritisiert. Eine Gleichgewichtseinstellung für Sedimentmodellmischungen zwischen den verschiedenen Phasen Wasser und partikulärem Material wird meist nicht erreicht, wenn das Sediment nach Zugabe der Standardmischung sofort extrahiert wird. Möglicherweise würde ein Rührverfahren über mehrere Stunden zur besseren Verteilung der Inhaltsstoffe beitragen, jedoch erscheint es fast unmöglich, Sedimenthomogenat und Standardmischung ohne Verluste in die Soxhlet-Apparatur zu überführen. Das Auftreten von Adsorptionseffekten und Rückständen an den Gefäßwänden wäre unvermeidlich und würde zwangsläufig zu einem nicht reproduzierbaren Verlust der zu bestimmenden Analyten führen. Bei einer Dotierung mit Aceton lösen sich die Target-Substanzen wahrscheinlich eher in der wässrigen

Phase der Testmatrix, da Aceton hier als Lösungsvermittler gut geeignet ist. Außerdem sind Feuchtsedimente im Gegensatz zu Trockenmaterial, bei denen definierte Korngrößen eingesetzt werden können, von Inhomogenitäten gezeichnet, die bei Abnahme eines Aliquots zu Verfälschungen führen können. Der hierfür einzubeziehende Fehler ist schwer abschätzbar.

Eine weitere Einschränkung in der Aussagefähigkeit der Dotierungsversuche ist, daß hierdurch keine Aussagen erhalten werden, wie die untersuchten Inhaltsstoffe aus unterschiedlichen Bindungsarten herausgelöst werden können. So werden Substanzgruppen, wie z.B. chlorierte Aniline, die in komplexe Huminsäurestrukturen (über kovalente Bindungen) eingebettet sind, durch die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln nicht freigesetzt.^[50] Die hier beschriebenen Dotierungsversuche können zwar diese Prozesse nicht quantitativ erfassen, wohl aber Anhaltspunkte liefern, ob beispielsweise Inklusionseffekte durch Makromoleküle zu Verlusten an Standardsubstanzen und chemisch ähnlichen Verbindungen führen können. Insgesamt ist daher durch die beschriebenen Dotierungsversuche nur eine eingeschränkte Aussage möglich, zu welchem Prozentsatz die verschiedenen Substanzklassen extrahierbar und damit chemisch-analytisch erfaßbar sind. Auf diesen Aspekt wird im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur toxizitätsdirigierten Fraktionierung (Abschnitt 3.1) nochmals eingegangen, da dort die Erfassung der bioverfügbaren Schadstoffanteile essentiell ist.

2.2.6.3 Einwaage Feuchtgewicht:

Durch die Frittenporen der Extraktionshülse kann bei der Einwaage des feuchten Sedimenthomogenats Wasser entweichen. Der resultierende Fehler erhöht sich dementsprechend bei hohem Wassergehalten der Proben. Die Einwaage weicht in diesem Fall von realen Mengen ab, was bei einer Quantifizierung zu falsch berechneten Konzentrationen führt. Die Folge wäre ein zu niedrig berechneter Schadstoffgehalt. Es wurden Einwaage-Ungenauigkeiten von $\pm 0,5$ g festgestellt, wodurch ein prozentualer Fehler von $\pm 2,5$ % resultiert.

2.2.6.4 Fehler bei der Volumenbestimmung:

Bei einer Quantifizierung mit Hilfe von externen Standardgemischen fließen die Lösungsmittelvolumina in die Konzentrationsberechnung ein. Die Volumina können zum einen gravimetrisch, zum anderen direkt über die Volumen-Skala einer HPLC-Spritze ermittelt werden. Bei der Bestimmung über die Masse ist neben dem Einwaagefehler vor allem die Dichtebestimmung des Probensolvenz problematisch. Es wurde für die Volumenbestimmung ein Mittelwert der Dichte verwendet, da es sich nach der Aufarbeitung durch die notwendigen Lösungsmittelwechsel um ein Lösungsmittelgemisch aus *n*-Hexan und *iso*-Octan handelt, wobei das Mischungsverhältnis auf 1:1 geschätzt wurde. Die Dichte dieser beiden Substanzen unterscheidet sich nur gering (0,66 und 0,69). Um den Fehler einzugrenzen, der für die Bestimmung anzunehmen ist, wurden verschiedene Versuche durchgeführt:

- a) Volumenbestimmung über die zwei unterschiedlichen Verfahren, Ermittlung der Varianz.
- b) Gaschromatographische Bestimmung des realen Mischungsverhältnisses über die ermittelten Signalflächen.

Für die Versuche zur Volumenberechnung wurde der gesamte letzte Methodenschritt, Einengen und Lösungsmittelwechsel nach SOP-Rot, simuliert. Hierfür wurden jeweils 10 Glaskolben mit ausgezogener Spitze (je 5 à 25 mL und 50 mL) verwendet. Zwischen den berechneten Volumina bestand eine maximale Abweichung von 10%. Für das Mischungsverhältnis konnte durch Vergleich der bestimmten Flächen eine Zusammensetzung von 42 % *n*-Hexan und 58 % *iso*-Octan berechnet werden. Damit wurde für die gravimetrische Volumina-Bestimmung eine mittlere Dichte von 0,68 erhalten, folglich sollte der gesamte Volumenfehler nicht mehr als maximal 2-5 % betragen.

2.2.6.5 Fehler bei Detektion und Integration

Bei Verwendung des AFID wurden aus den Mittelwerten der Dreifachbestimmung Standardabweichungen zwischen 1 und 15 % ermittelt, während die Kalibrierung eine Meßunsicherheit von 5 % ergab. Insgesamt wird für Meß- und Integrationsfehler der GC-MS-Bestimmungen ein durchschnittlicher Fehler von 10 % gerechnet, welcher sich durch Vergleich aus den Messungen externer Standards unterschiedlicher Konzentrationen ableiten ließ.

2.2.6.6 Koelutionen bei Verwendung des AFIDs bzw. ECD

Die hohe Selektivität des AFIDs wurde bereits im Kapitel 2.2.5 anschaulich dargestellt, dennoch können bei der Fülle der zu extrahierenden Komponenten auch nach erfolgtem Clean-up störende Koelutionen der Target-Substanzen mit anderen Stoffen auftreten. Eine zusätzliche Verifizierung der Ergebnisse der AFID-Messungen erfolgte über eine GC-MS-Bestimmung oder aber über eine zweite Säule mit unterschiedlich polarer stationärer Phase. Für einige Nitroaromaten wurde die Nachweisempfindlichkeit des MS aufgrund zu geringer Konzentrationen unterschritten, in diesem Fall wurde auf eine genaue Konzentrationsangabe verzichtet. Denn auch die Prüfung über zwei Säulen verschiedener Polarität schließt Koelutionen bei hoher Matrixbelastung nicht eindeutig aus.

2.2.7 Diskussion der Ergebnisse

Durch die umfassende Aufarbeitung und Analyse einer Nordseeprobe konnte belegt werden, daß die repräsentativ ausgewählten Targetverbindungen durch die Methode vollständig erfaßt werden, während für die lipophilen Inhaltsstoffe der Fraktion eins und zwei insgesamt noch hohe Matrixbelastungen im *n*-Hexan-Extrakt festgestellt wurden. Für diese Substanzklassen ist eine Soxhlet-Extraktion ausschließlich mit Aceton unzureichend. Durch eine sehr viel geringere Untergrundbelastung der Fraktionen 1H und 3H wurde die chromatographische und spektrale Auflösung der unpolaren Fraktionen verbessert und damit auch die Analyse per ECD ermöglicht. Eine größere Untergrundbelastung der Fraktionen 2A und 3A erschwert bisher Identifizierung und Verifizierung im Spurenbereich, daher ist eine höhere Reinheit durch eine verbesserte Auftrennung von Inhaltsstoffen notwendig.

Die entsprechenden Fraktionen des *n*-Hexan-Extraktes weisen hingegen eine deutlich geringere Belastung und dementsprechend weniger Überlagerungen auf, was eine Identifizierung mittels GC-MS wesentlich vereinfacht. Im mittelpolaren Bereich werden durch die Nachextraktion keine zusätzlichen Informationen erhalten.

Eine charakteristische Aufteilung der erfaßten Verbindungsklassen auf die unterschiedlichen Fraktionen konnte durch den kombinierten Einsatz verschiedener Detektionstechniken für die Fraktionen 3, 4 und 5 erkannt werden. Die Vielzahl an erhaltenen Signalen/Spektren „neuer Verbindungen“ in den polaren Fraktionen 5-7 verdeutlicht, daß eine Methodenentwicklung für hydrophile Verbindungen sinnvoll und notwendig ist. Durch eine Erweiterung der Methodik auf HPLC-Untersuchungen und Derivatisierungs-Verfahren mit Hilfe deuterierter Reagenzien könnten zusätzlich sehr polare und thermisch labile Spurenstoffe analysiert werden. Die an dieser Stelle nicht weiter aufgeführten Fraktionen 6-8 werden noch ausführlich im Abschnitt 2.4 behandelt.

2.3 Target-Untersuchung von Sedimentproben

2.3.1 Vorkommen und Problematik von Irgarol und TBT in Sedimenten

Die Verwendung von Tributylzinn (TBT) als Biozid in Antifoulingfarben und die daraus resultierende ubiquitäre Verteilung dieser Organometallverbindung in aquatischen Systemen ist mittlerweile zu einem weltweiten Problem geworden. Durch Bewuchs von Schiffsböden mit Meeresorganismen, auch als marines Fouling bezeichnet, entstehen für die Schifffahrt eine Reihe sehr kostenintensiver Probleme. Die Erhöhung des Fahrtwiderstandes (Schleifkraft) und Korrosion der Oberflächen resultiert in einen Anstieg des Treibstoffverbrauches. Ein Treibstoffmehraufwand von schätzungsweise 0,3 bis 1 % wird bereits durch eine 10 µm Aufwuchs-Schicht verursacht. Der Treibstoffanteil stellt mit über 50 % den größten Einzelposten des gesamten Schifffahrtbetriebes dar. Dies veranschaulicht, welche bedeutende Rolle den Schutzmaßnahmen gegen Bewuchs zukommt. Im Jahre 1985/86 betrug beispielsweise die Treibstoffausgaben der Queen Elisabeth II 17 Millionen US\$.^[51] Kalkuliert man mögliche Mehraufwendungen bei einer Erhöhung des Verbrauches nur um 0,3 %, würde mit 51.000 US \$ insgesamt ein beachtlicher Posten entstehen. Antifoulingschutz wurde in früherer Zeit über am Rumpf installierte Kupferplatten erreicht. Später wurde dann Kupfer in den Anstrich direkt integriert. Ab 1980 enthielten die meisten Farben Kupfer oder Organozinnverbindungen (TBT). Dies führte nicht nur in Regionen intensiver Schifffahrt zu katastrophalen Umweltauswirkungen, sondern hat mittlerweile auch weniger stark belastete Gebiete erreicht. Zeitgleich mit der generellen Verwendung der zinnorganischen Farbanstriche wurde in französischen Austernbänken ein Rückgang der pazifischen Auster (*Crassostrea gigas*) beobachtet. Französische Austernzüchter erlitten Verluste in Millionenhöhe, da bereits die jungen Larven starben und auch die erwachsenen Tiere Abnormitäten aufwiesen. Nachdem die Schädigung auf TBT zurückgeführt werden konnte, kam es 1989 in den meisten Ländern zu einem Verbot von TBT als Bestandteil von Antifoulingfarben für Sportschiffe bzw. Schiffe, deren Rumpflänge kleiner als 25 m ist. *In der Europäischen Union wurde 1989 mit der Richtlinie 89/677/EWG: „Die Verwendung von zinnorganischen Verbindungen in anwuchsverhindernden Anstrichen für Schiffskörper mit einer Länge von weniger als 25 m sowie auf Geräten und Einrichtungen jeder Art, die in der Fisch- und Muschelzucht eingesetzt werden, durch die EU-Kommision verboten.“* Mit der Gefahrstoffverordnung vom 23. März 1990 wurde die o.g. Richtlinie in nationales Recht (GefStoffV) für die BRD umgesetzt und die Restriktionen hinsichtlich des Inverkehrbringens zinnorganischer Verbindungen 1993 in die Chemikalienverbotsordnung (chemVerbotsV.) übernommen. Österreich und die Schweiz erteilten hingegen ein komplettes

Anwendungsverbot im limnischen Bereich. Heutzutage gelten Irgarol 1051 und auch Diuron in Kombination mit Kupferoxiden als Herbizide zu den populärsten Alternativen gegen den Bewuchs der Schiffsböden mit Meeresorganismen. Für Diuron existiert allerdings in Schweden bereits ebenso ein Anwendungsverbot.^[52]

Das erstmalig von Ciba Geigy unter dem Handelsnamen Irgarol 1051 (2-Methylthio-4-tert-butylamino-6-cyclopropylamino-s-triazin) eingeführte Biozid gehört zur Substanzklasse der s-Triazine und ist damit Atrazin, dem bekanntesten Vertreter der Triazine, generell ähnlich. Die folgende Abbildung 17 zeigt das charakteristische Massenspektrum und die Strukturformel für Irgarol. Die toxikologische Datenlage des Triazins ist bislang noch als sehr lückenhaft anzusehen.^[53]

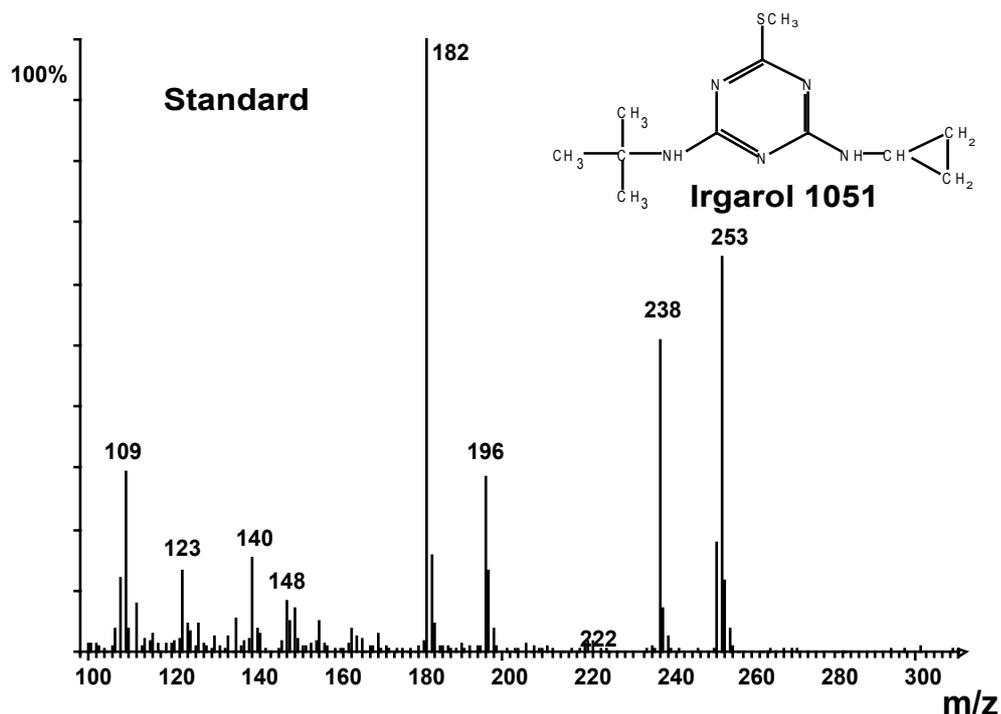


Abbildung 17: Massenspektrum und Struktur von Irgarol 1051

Nachdem inzwischen nachgewiesen wurde, daß Irgarol u.a. auch in marinen Kompartimenten (Sedimente, Biota) akkumuliert wird, rücken diese Verbindung bzw. allgemein die Triazine zunehmend in den Blickpunkt der Umweltdiskussion.^[54,55] Vor diesem Hintergrund bestand innerhalb dieser Arbeit von vornherein das Ziel, eine quantitative Erfassung der Triazine und der entsprechenden Transformationsprodukte in Sedimenten zu ermöglichen. Im Rahmen des Projektes ALOSON war von Seiten des Projektgebers (Umweltbundesamtes, UBA) großes Interesse an einer Untersuchung der Triazin-Alternative zum toxikologisch sehr bedenklichen TBT formuliert worden. Erste Probenahmen in Hamburger Elb-Yachthäfen führten schon 1997 zum Nachweis von Irgarol, in zum Teil sehr hohen Konzentrationen sowohl im Wasser als auch in den Sedimenten. Dies erhärtete den Verdacht, daß auch im marinen Bereich bereits hohe Anreicherungen vorkommen könnten.^[34]

Vor Beginn dieser Arbeit wurden bereits in einigen Sportboot- oder Yachthäfen der europäischen Küstengewässer Irgarolkonzentrationen im Wasser zwischen 5 und 600 ng/L mit maximalen Belastungen bis zu 1700 ng/L gemessen (Tabelle 8), während die Belastung der

gleichen Gewässer mit zinnorganischen Verbindungen als eine Konsequenz des Anwendungsverbotes für Schiffsrümpfe kleiner 25 m nach 10 Jahren langsam meßbar rückläufig war.^[56-64] Der Rückgang der TBT-Konzentrationen konnte bisher aber lediglich bei Wasseruntersuchungen festgestellt werden, für Sedimente zeigten auch neuere Untersuchungen kaum geringere Gehalte als vor 10 Jahren.^[65,66] In bezug auf Irgarol lag zu Beginn der hier beschriebenen Arbeiten nur eine Angabe zum Vorkommen in marinen Sedimenten vor.^[57] Außerdem wurde von Tóth et al. Irgarol in Wasser, Sediment und Algen innerhalb eines Yachthafens am Genfer See bestimmt.^[67]

Tabelle 8: Literaturvergleich gemessener Irgarol-Konzentrationen

Region	Wasser [ng/L]	Sediment [ng/g] TG	Literatur
UK / Humber	<1-39	-	[59]
UK / Englische Küste	<2-500	<10-132	[57]
UK / Plymouth Sound	<1-127	-	[55]
F / Côte d`Azur	<5-1700	-	[56]
F / Côte d`Azur	<1-640	-	[58]
E / Masnou Marina	7-325	-	[60]
CH / Genfer See	<0,3-145	2,5-8	[67]
UK / Englische Küste	<1-403	-	[64]

Die Untersuchungen wurden entsprechend folgender Zielsetzung durchgeführt:

- ⇒ Vorkommen von IRGAROL in Wasser und Sedimenten norddeutscher Yachthäfen.
- ⇒ Vergleich der Belastungssituation in „reinen Sportboothäfen“ zwischen Irgarol und dem TBT-Altlasten-Gehalt im Sediment.
- ⇒ Saisonale Abhängigkeit der Kontamination von Irgarol: wie schnell ist die Substanz unter Umweltbedingungen abbaubar ?
- ⇒ Untersuchungen zur Verteilung und Anreicherung von Irgarol.
- ⇒ Interpretation gemessener Konzentrationen des Irgarols im Zusammenhang mit vorhandenen toxikologischen Daten.

2.3.1.1 Beschreibung der Probenahme-Stationen und Zeitpunkte

Die Irgarol-Belastung in Wasser und Sediment wurde in insgesamt 14 Häfen entlang der norddeutschen Ost- und Nordseeküste untersucht. Um auch saisonale Abhängigkeiten zu erfassen, wurden drei Probenahme-Kampagnen zu unterschiedlichen Jahreszeiten durchgeführt. Abbildung 18 zeigt die Lage der Probenahmestationen. Innerhalb der zweiten Probenahmeserie wurde an jeder Station parallel zu jeder Sedimentprobe eine zweite entnommen, um für einen Vergleich auch die TBT-Konzentrationen zu bestimmen. Die TBT-Analysen sowie die Kohlenstoffbestimmung der Sedimente wurden von einer Schweizer Arbeitsgruppe im Rahmen der Zusammenarbeit innerhalb des Projektes ALOSON durchgeführt. .

Probenahme 1: Frühjahr 1997 (März-Mai)

Probenahme 2: Sommer 1997 (Juni-September)

Probenahme 3: Winter 1997 (Dez-Jan´98)

Die Saison der Sportschiffer beginnt in der Regel zwischen Ende Februar und Anfang April. Die Boote werden zumeist in den Wintermonaten aus den Gewässern entfernt und instand gesetzt. Dies bedeutet, daß diese frische Anstriche besitzen, wenn die Saison im Frühjahr beginnt. Die Funktionsweise der Antifouling-Schiffsanstriche basiert auf einer kontinuierlichen Absonderung der Pestizide in die Wasserphase, um Algen und Mollusken abzutöten, welche sich an den Schiffsböden anlagern.

Aus diesen Gründen wurde mit den Probenahmen im Frühjahr begonnen. Die Hauptsaison der Sportsegler und die der Sportboote liegt in den Sommermonaten, wodurch auch die Yachthäfen zu dieser Zeit am stärksten belegt sind. Viele der ausgewählten Probenahmeorte sind auch beliebte Urlaubsziele an der deutschen Küste. Für diesen Zeitraum wurden daher maximale Wasserkonzentrationen angenommen. Die Saison endet zwischen September und Oktober, was demnach auch bedeutet, daß es zu keinen weiteren Neueinträgen in die Gewässer kommen sollte. Um eine eventuelle Konzentrationsabnahme im Wasser und mögliche Reservoireffekte der Sedimente zu erfassen, wurde die Serie mit der Probenahme im Januar 1998 beendet.

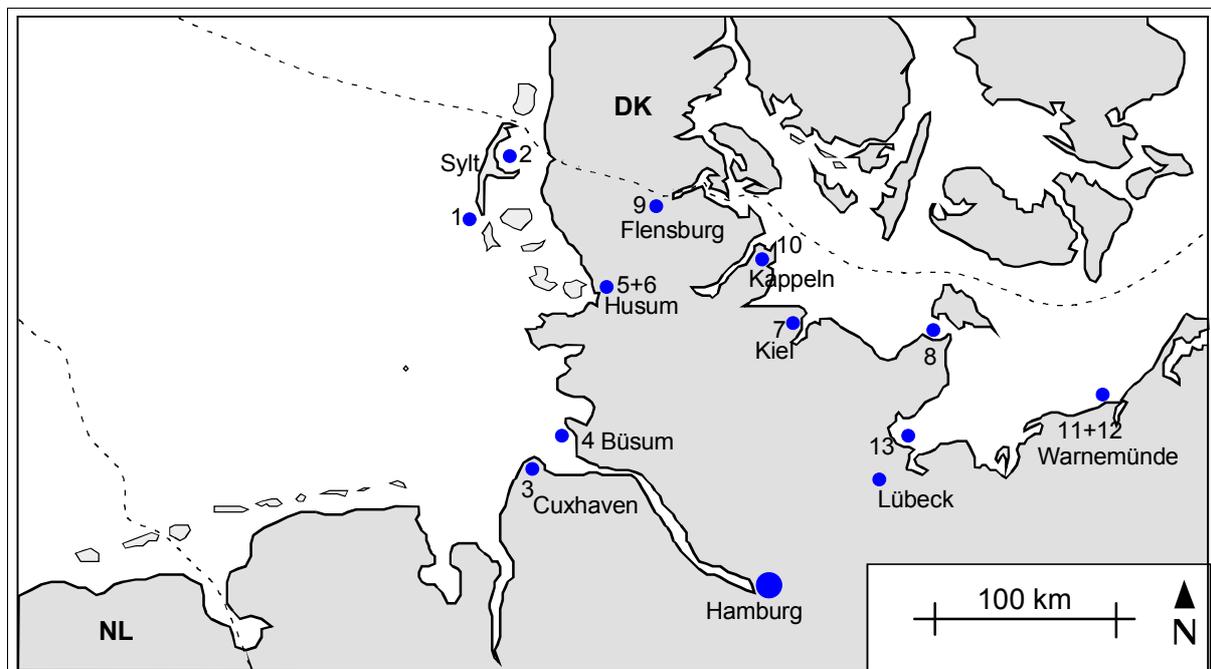


Abbildung 18: Probenahmestationen an der deutschen Nord- und Ostseeküste: 1.Sylt-Hörnum; 2. Sylt-Munkmarsch; 3.Cuxhaven; 4.Büsum; 5. Husum-Stadt; 6. Husum Segler Verein; 7. Kiel Schliksee; 8. Heiligenhafen; 9. Flensburg; 10. Kappeln, 11. Warnemünde Yachthafen; 12. Warnemünde Alter Strom; 13. Niendorf

Die Probenahmestationen an der Nord- und Ostsee unterscheiden sich erheblich in ihren Eigenschaften wie Größe, Wasseraustausch, Tideeinfluß sowie durch direkten oder indirekten Meereszugang. Insbesondere in Nordseehäfen ist für die Wasserkonzentration ein Tideeinfluß angenommen. Durch die zum Teil größeren Entfernungen zwischen den einzelnen Stationen war es nicht möglich, alle Proben zum gleichen Tidestand zu nehmen. Daher sind in Tabelle 9 zur Orientierung alle Merkmale der Stationen aufgeführt. Neben den bereits erwähnten Charakteristika spielt es häufig auch noch eine Rolle, ob die Schiffe direkt vor Ort, d.h. in einer Werft, die den

Kaianlagen benachbart ist, oder extern in Stand gesetzt werden. Je näher die Reinigungsprozeduren am Wasser stattfinden, desto mehr steigt auch die Gefahr des direkten Eintrages von Farbrückständen alter Lackierungen (Punktquellen-Kontamination). Falls Werftanlagen bzw. Wartungshallen in den entsprechenden Häfen augenscheinlich vorhanden waren, wurde dies ebenso protokolliert und in die folgende Tabelle mit einbezogen.

Tabelle 9: Charakteristische Daten der in dieser Arbeit beprobten Häfen

	Größe (Länge x Breite) [m x m]	max. Tiefe [m]	Anzahl der Boote (max. Kapazität)	Tide	Hafen- tor	Wasser- aus- tausch	Werft
Sylt-Hörnum	300 x 200	2 - 5	100	NW+5h	+	++	+
Sylt-Munkmarsch	100 x 100	2 - 3	50	NW+5 h	-	++	+
Cuxhaven	300 x 200	2 - 4,5	250	NW+1,5h	+	+++	-
Büsum	400 x 300	2 - 5	300	NW-3h	+	+++	-
Husum-Stadt	250 x 100	2 - 4,5	50	HW-2h	+	++	-
Husum Segler Verein	400 x 50	2 - 3	60	HW -2h	-	+	+
Kiel Schilksee	a.) 300 x 200 b.) 400 x 300	4,5	850-1100	-	+	-	-
Heiligenhafen	a.) 500 x 400 b.) 150 x 200	4,5	850	-	+	-	(-)
Flensburg	300 x 100	4,5	ca. 200	-	+	-	+
Kappeln	1500 x 50	4,5	ca. 200	-	-	+	(+)
Warnemünde YH	200 x 200	2 - 4	60	-	-	+	+
Warnemünde AS	600 x 28	2 - 5	90	-	-	--	-
Niendorf	400 x 100	4,5	ca. 300	-	+	--	+

Tide; HW= Hochwasser, NW= Niedrigwasser; YH= Yachthafen, AS = „Alter Strom“
Wasseraustausch: +++ sehr hoch / ++ hoch / + mittel - gering / -- sehr gering

2.3.1.2 Analysenmethode für die Untersuchung von Wasserproben auf Irgarol

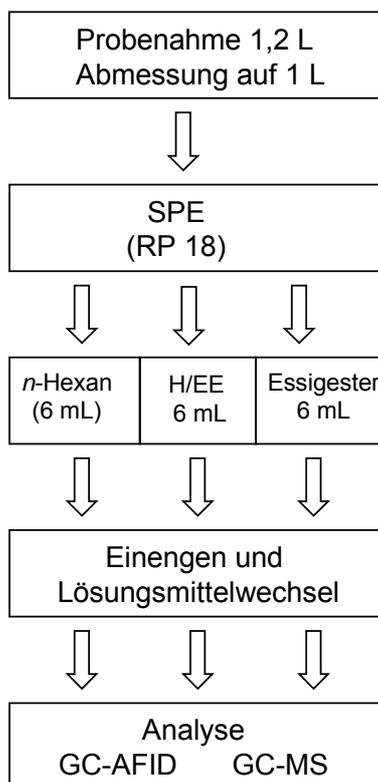
Innerhalb dieser Arbeit galt das Hauptinteresse der Belastung von Sedimenten. Für die Irgarol-Untersuchungen wurden auch die Wasserkonzentrationen benötigt, um Verteilungsgleichgewichte zu ermitteln und die Lebensdauer der Substanz abzuschätzen. Des Weiteren sind Wasserdaten für die Abschätzung toxikologischer Risiken im wässrigen Kompartiment notwendig, denn gerade für Algen und Muscheln ist die Wasserbelastung direkt entscheidend, während für Würmer und allgemein Bodenlebewesen die Sedimentkonzentrationen bedeutender sind. Ferner sollten die erhaltenen Datensätze mit vorhandenen Literaturwerten anderer Küstengebiete verglichen werden. Die Aufarbeitung und die Methode zur Analyse der Wasserproben wird schematisch durch die Abbildung 19 wiedergegeben. Wiederfindungsraten, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, wie sie bei Verwendung eines AFID-Detektors bzw. des GC-MS erhalten wurden, sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Angaben zur Qualitätskontrolle der Sediment- und Wasseranalysen

Matrix	BG ^a (AFID)	WFR [%]	RSD ^b [%]	BG ^a (GC-MS)
Wasser	4 ng/L	93	10	15 ng/L
Sediment	50 ng/kg	61	13	550 ng/kg

^aBG = Bestimmungsgrenze, korrigiert durch die Wiederfindungsrate. RSD^b Relative Standardabweichung reproduzierter Analyse über die gesamte Methode (n=10)

Die Analyse der Wasserproben wurde entsprechend der SOP-SPE durchgeführt (s. Anhang). Die Probenahme erfolgt mittels 1 oder 2 L Glas-Probenabnahmesflaschen und mußte aufgrund zum Teil sehr widriger Umstände direkt vom Bootssteg mit Hilfe einer Schnur genommen werden. Es wurde dabei versucht, eine einheitliche Sammelteufe von ca. 30 cm unterhalb des Oberflächenfilms einzuhalten, was sich bei starkem Niedrigwasser ausgesprochen schwierig gestaltete. Eine ausführliche Dokumentation der genauen Probenahme-Positionen und Verhältnisse (Temperatur, Niederschlag-Mengen etc.) wurde in den vor Ort geführten Protokollen festgehalten.

**Abbildung 19: Analysen-Schema für die Bestimmung von Irgarol in Wasserproben**

Mittlerweile sind unterschiedlichste Methoden für die Bestimmung von Irgarol sowie für Diuron und weiterer organischer Herbizide, die in Antifoulingfarben Verwendung finden (Chlothalonil und Dichlofluamid), veröffentlicht worden. Tabelle 11 gibt einen Überblick über bisher etablierte Methoden für die Analyse der genannten Biozide in Wasserproben. Insgesamt werden bei Verwendung von C 18-Kartuschen gute bis sehr gute WFR erhalten. Eine Alternative, die als sehr selektiv und sensitiv beschrieben wird, ist der Nachweis über Immuno-Assay's wie beispielweise die ELISA-Methode.^[68-70]

Tabelle 11: Vergleich verschiedener Referenzen bezüglich Extraktionsmethoden und Nachweisempfindlichkeit für Irgarol in Wasser

Extraktions-Methode	Methode-Detektion	Nachweisgrenze (ng/L)	Literatur
Immuno-Assay	Maldi-MS / ELISA	5-16 ng	[68-70]
DCM	GC-AFID	2	[57]
C 18 disks	GC-AFID	1,5	[58]
C 18 disks	GCMS(SIM)	0,5	[71]
C 18 cartridges	GCMS(SIM)	0,3	[67]
C 18 disks	MS-MS	0,1-1	[72]
C 18 cartridges	GCMS		[55]
SPE System	HPLC-DAD	1	[60]
C 18 cartridges	HPLC-UV-DAD	3	[67]

Chlorothalonil, Diuron und Dichlofluanid werden ebenso über die C-18 Extraktion erfaßt. Neben der flüssig-flüssig-Extraktion mit polaren Lösungsmitteln ist die Festphasenextraktion mittlerweile für viele polare Pestizide die Methode der Wahl. Interessant wäre auch ein Vergleich der Probengehalte mit möglichen Belastungen durch das Phenylharnstoffderivat Diuron gewesen. Dies ist jedoch durch die Anwendung der GC-MS Split-Injektionstechnik nicht möglich, da es ohne Derivatisierung (Methylierung der N-H-Gruppe) zur thermischen Zersetzung der Verbindung kommt. Alternativ werden die Phenylharnstoffderivate jedoch sehr empfindlich mit Hilfe der HPLC-DAD Technik nachgewiesen.^[73]

2.3.1.3 Irgarolkonzentrationen in ausgewählten Wasserproben der Nord- und Ostsee

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse aller drei Probenahmeserien zusammengefaßt. Nach der ersten Probenahme wurden einzelne Stationen geändert, da sich die vorher ausgewählten Häfen für saisonale Belastungsstudien als ungeeignet erwiesen. Die Yachthäfen Heiligenhafen, Flensburg, Kappeln und Warnemünde „Alter Strom“ (AS) wurden erst ab Serie 2 berücksichtigt. Keine weiteren Proben wurden an den Stationen Wismar (Ostsee) und Wilhelmshaven (Nordsee) genommen, da in diesen Häfen keine reine bzw. nicht einmal überwiegende Sportbootnutzung stattfindet.

Tabelle 12: Ermittelte Irgarolkonzentration in Wasser [ng/L]; Probenahmeserien 1-3

Hafen	Station Nr.	Serie 1 März-Mai	Serie 2 Juni-Sept.	Serie 3 Dez.-Jan.
Sylt-Hörnum	1	(620)	29	k.P.
Sylt-Munkmarsch	2	(1000)	11	110
Cuxhaven	3	14	12	k.P.
Büsum	4	40	33	n.n.
Husum-Stadt	5	6	k.P.	5
Husum Segler-Verein	6	240	170	14
Kiel Schilksee	7	260	320	n.n.
Heiligenhafen	8	k.P.	435	9
Flensburg	9	k.P.	440	< 5
Kappeln	10	k.P.	77	9
Warnemünde YH	11	40	190	< 5
Warnemünde AS	12	k.P.	90	< 5
Niendorf	13	170	320	5

k.P.= keine Probe

n.q.= nicht quantifizierbar

n.n.= nicht nachweisbar

<5 = unterhalb der Bestimmungsgrenze

Bei den Proben der ersten Probenahmeserie der Stationen 1 und 2 kam es während der „Autosampler“-unterstützten Messung zu einer Kontamination durch eine nicht korrekt gespülte Spritze. Es ist anzunehmen, daß eine Verunreinigung der Proben mit dem verwendeten externen Standardgemisch in Form eines „Offset“ von maximal 100 ng/L (Station 1) und 170 ng/L (Station 2) erfolgte. Die Proben werden daher in der weiteren Diskussion nicht berücksichtigt.

Anhand der Serie 2 soll die unterschiedliche Belastungssituation der Nord- und Ostseehäfen im folgenden diskutiert werden.

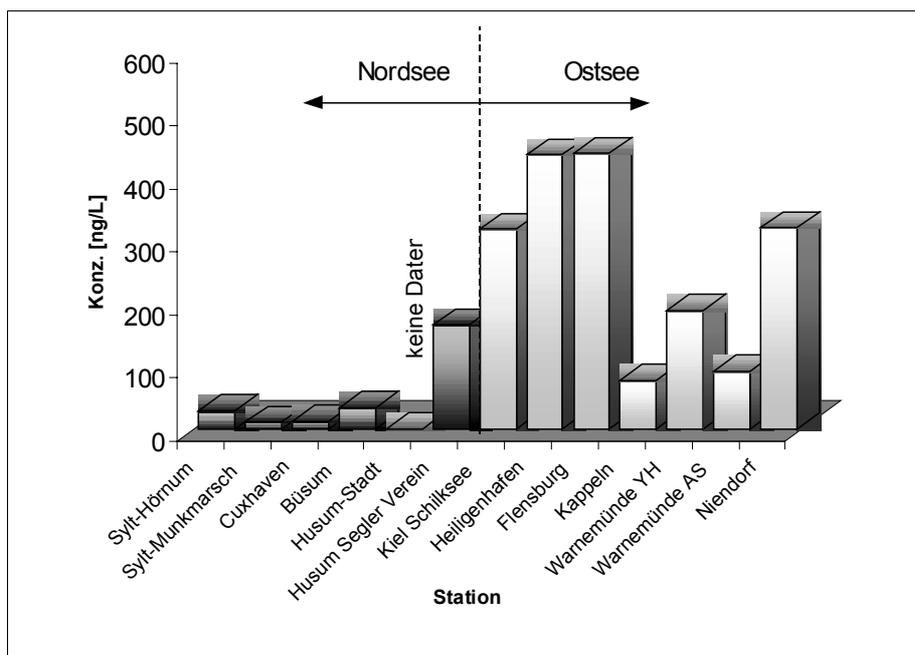


Abbildung 20: Ermittelte Irgarolkonzentrationen im Wasser; Probenahme 2, Stationen 1-13

Die Irgarolkonzentrationen im Wasser der untersuchten Nordseehäfen sind mit Werten zwischen 11 und 170 ng/L um ein Vielfaches geringer als die in den Ostseehäfen. Ferner weisen die Daten der Nordseehäfen untereinander stärkere Schwankungen bei vergleichbaren äußeren Bedingungen auf. Begründet ist dies vor allem durch starke Tideinflüsse und dem damit einhergehenden hohen Wasseraustausch. Es wird angenommen, daß sich innerhalb der Hafenbecken befindliches Wasser im Durchschnitt alle 48 h komplett erneuert. So wurden für die Stationen Cuxhaven und Büsum, die von der Größe mit Ostseehäfen in Niendorf oder Flensburg vergleichbar sind, mit 11 bzw. 33 ng/L die niedrigsten Konzentrationen ermittelt. Wie auch in einer Untersuchung an der englischen Küste für Probenahmeorte mit Gezeiteneinfluß zu beobachten war, wurden bei Niedrigwasser zumeist höhere Gehalte bestimmt als für Proben, die während der Flut genommen wurden.^[64] Dies läßt sich auf einen Verdünnungseffekt zurückführen. Demgegenüber sind die Konzentrationen in den Ostseehäfen sehr viel mehr von der Größe der Hafenbecken, der Anzahl der Boote sowie dem möglichen Wasseraustausch der Häfen mit dem offenen Meer abhängig. Werden diese Parameter berücksichtigt, sind die Ergebnisse sehr gut vergleichbar.

Für eine toxikologische Beurteilung wurde 1996 eine umfangreiche Untersuchung von Dahl et al. zur Beeinflussung von Algen durch Irgarol durchgeführt.^[52,74] Es konnten signifikante Veränderungen

in der Struktur mikrobiologischer Lebensgemeinschaften (*periphyton*; Kurzzeit-Laborversuch) bereits ab Irgarolkonzentrationen von 250 ng/L festgestellt werden. Ab Konzentrationen von 1 - 4 nM (200 - 1000 ng/L) wurde eine starke Abnahme der photosynthetischen Aktivität der Spezies beobachtet. Für Wachstumstörungen bzw. die Reduzierung der Biomasse marinen Periphytons wurden in Laborversuchen (Langzeit) EC₅₀-Werte im Konzentrationsbereich von 0,72 - 2,7 nM (200 - 680 ng/L) bestimmt. Für Grünalgen wurden „No-observed-effect-concentrations“ (NOECs, 144 h) von 22 ng/L erhalten, der gemessene EC₅₀-Wert (72 h) für die Hemmung der Photosynthese-Aktivität liegt bei 2,5 µg/L.^[55]

Die Wirkungsmechanismen des Irgarol in Pflanzen respektive Algen entsprechen nach Aussage der Hersteller (Ciba Geigy/Novartis) denen der Triazine, die als Photosystem II (PSII) -Inhibitoren den Elektronentransport in den Chloroplasten reduzieren. Neben diesem Effekt erzeugen PSII-Hemmer zudem durch ihre Anwesenheit gewöhnlich oxidativen Streß innerhalb der mikrobiologischen Lebensgemeinschaften.

In Kurzzeittests zeigte sich Irgarol, im Vergleich der EC₅₀-Werte, 70mal toxischer als Atrazin. Vergleicht man die Ergebnisse von Langzeitstudien und die kalkulierten Lowest-observed-effect concentrations (LOECs), wurde für Atrazin 100 ng/L im Vergleich zu 63 ng/L für Irgarol bei marinem Phytoplankton erhalten.^[74,75] Dementsprechend differieren die Toxizitäten dieser beiden Verbindungen kaum. Eine Zusammenfassung der bisher publizierten Toxizitätsdaten für Irgarol ist in Tabelle 13 enthalten.

Tabelle 13: Literatur-Angaben zur Toxizität des Irgarols

Species	Endpunkt / Effekte	Konzentration	Literatur
short-term-test	LOEC (ST)	3,2-10 nM (810-2,530 ng/L)	[52,74]
<i>Periphyton</i> (photos. inh.)	NOEC (ST)	1-3,2 nM (250-810 ng/L)	[52,74]
	EC ₅₀ (ST)	4,7-5,5 nM (1,190-1,390 ng/L)	[52,74]
long-term-test			
<i>Periphyton</i>	EC ₅₀ (LT)	0,72 nM (182 ng/L)	[52,74]
Photosynthese / Chl. a	NOEC (LT)	0,062 nM (16 ng/L)	[52,74]
	LOEC (LT)	0,25 nM (63 ng/L)	[52,74]
<i>Periphyton</i>	NOEC (LT)	0,25 nM (63 ng/L)	[52,74]
Photosynthese inhib.	LOEC (LT)	1,0 nM (250 ng/L)	[52,74]
	EC ₅₀ (LT)	0,82 nM (210 ng/L)	[52,74]
<i>Periphyton</i>	NOEC (LT)	1,0 nM (250 ng/L)	[52,74]
Biomass (Chl a)	LOEC (LT)	4,0 nM (1,000 ng/L)	[52,74]
	EC ₅₀ (LT)	2,7 nM (680 ng/L)	[52,74]
Alge	MIC	0,01-0,1 [mg/L]	[76]
<i>Daphnia</i> sp ¹	48 h LC 50	2,63 [mg/L] (ECOSAR pred.)	[53]
<i>Daphnia</i> sp ¹	24 h EC 50	66 [mg/L]	[76]
<i>Daphnia</i> sp ¹	16 d EC 50	0,33 [mg/L] (ECOSAR pred.)	[53]
Fisch (FW) ¹	96 h LC 50	2,13 [mg/L] (ECOSAR pred.)	[53]
Regenbogenforelle	96 h LC 50	0,94[mg/L]	[76]
Fisch (SW) ¹	96 h LC 50	1,33 [mg/L] (ECOSAR pred.)	[53]
Fisch ¹	30 d ChV	0,38 [mg/L] (ECOSAR pred.)	[53]
<i>Zoetra marina</i>			
Photosynthese inhib.		180 ng/L	[77]
	EC ₅₀ (10 d)	2500 ng/L	[77]
	EC ₅₀ (36 d)	200 ng/L	[77]
Reduziertes Wachstum		100 ng/L	[55]
<i>E.intestinalis</i>	EC ₅₀	< 500 ng/L	[55]

¹Theoretisch berechnet (ECOSAR)

ST= Kurzzeit-Test

LT= Langzeit-Test

Die meisten in dieser Studie ermittelten Konzentrationen von Irgarol im Wasser befinden sich im Bereich der durch Laborversuche ermittelten Effektkonzentrationen. Die maximal beobachteten Werte liegen mit 435 ng/L und 438 ng/L für Kiel Schilksee und Heiligenhafen deutlich über dem niedrigsten EC₅₀-Wert der für die Abnahme der Photosynthese-Aktivität ermittelt wurde (182 ng/L). Daher unterstreichen die hier vorgestellten Untersuchungen, daß zumindest im Bereich der Sportboothäfen mit Irgarolkonzentrationen zu rechnen ist, die eine direkte Beeinträchtigung aquatischer Lebensgemeinschaften zur Folge haben.

2.3.1.4 Ergebnisse der Irgarol-Untersuchung von ausgewählten Sedimenten der Nord- und Ostseehäfen

Die Irgarolkonzentrationen im Sediment der Nord- und Ostseehäfen gleichen in ihrer Verteilung den Wasserwerten. Es existierten größere Schwankungen zwischen den Nordsee-Stationen, und größtenteils sind die erhaltenen Konzentrationen im Vergleich zu den untersuchten Ostsee-Häfen sehr viel geringer. Abbildung 21 stellt die Daten der Sommer-Probenahmeserie für Nord- und Ostsee gegenüber. In Tabelle 14 sind alle Konzentrationen, bezogen jeweils auf Feucht- und Trockengewicht, enthalten. Trotz des relativ starken Wasseraustausches in den untersuchten Nordseehäfen fanden sich für die meisten Probenahmestationen dennoch beachtenswerte Irgarolkonzentrationen im Sediment. Die erhaltenen Daten variieren zwischen „gerade nachweisbar“, z.B. für die Stationen Büsum und Cuxhaven, und einer maximalen Konzentration von 15 ng/g FG für den relativ kleinen Hafen Sylt-Munkmarsch. Gerade für Cuxhaven und Büsum wurden eigentlich höhere Werte erwartet, da es sich, wie schon erwähnt, bei diesen Häfen, neben Hörnum (Sylt), um die größten an der Nordseeküste handelte. Infolge ständiger Wassererneuerung und damit zusammenhängenden starker Strömungen, wovon vor allem die Sedimentoberflächen betroffen sind, resultieren hier jedoch deutlich geringere Gehalte.

Die gemessenen Konzentrationen in den ausgewählten Ostseehäfen lagen wiederum im Durchschnitt höher: Bezogen auf das Feuchtgewicht wurden maximale Werte von 40 ng/g für Niendorf (Station 13) und 80 ng/g in Warnemünde (Station 12) erhalten. Umgerechnet auf das Trockengewicht und den Gehalt an organischem Kohlenstoff, wurden in Warnemünde 219 ng/g TG sowie 3900 ng/g TOC bestimmt, im europäischen Vergleich (s.a. Tabelle 8) die bisher höchste gemessene Konzentration. In der Sommerprobenahmeserie wurde für die Nordseehäfen ein Mittelwert von 5 ng/g FG und in der Ostsee ein deutlich höherer von 21 ng/g FG erhalten. Diese Werte liegen etwas höher als die von Toth et al. für den Genfer See ermittelten, entsprechen jedoch der Größenordnung der an der englischen Küste gemessenen Werte.^[57,67]

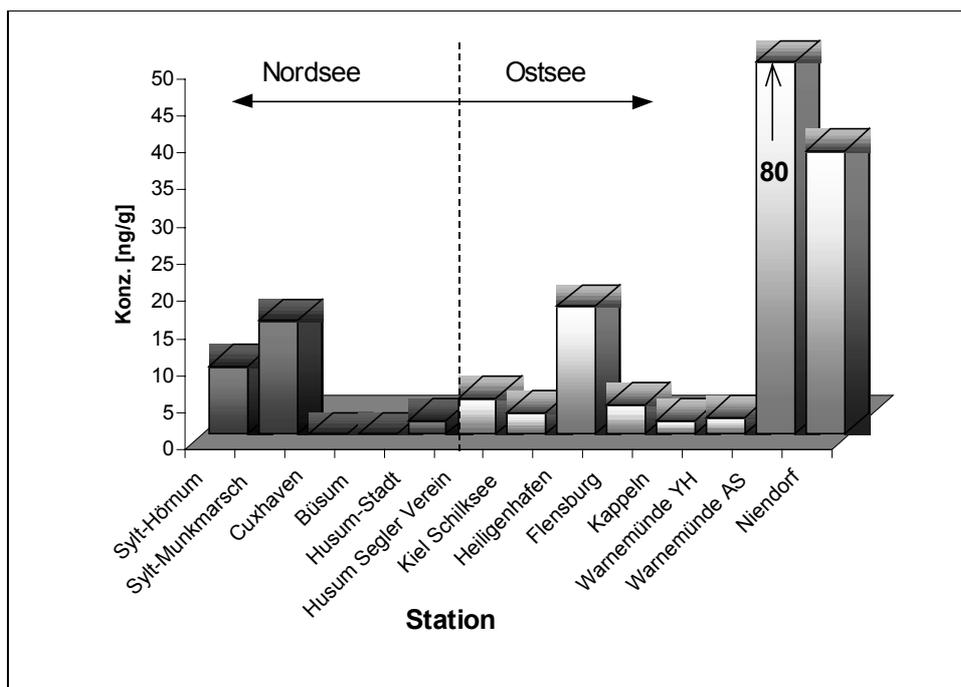


Abbildung 21: Irgarol-Konzentrationen im Sediment der Probenahmeserie 2

Tabelle 14: Irgarol-Konzentration im Sediment in ng/g FG der Probenahme 1-3

Hafen	Serie 1 März-Mai	Serie 2 Juni-Sept.	Serie 3 Dez.-Jan.
Sylt-Hörnum	14	9	2
Sylt-Munkmarsch	k.P.	15	50
Cuxhaven	< 1	< 1	k.P.
Büsum	< 1	< 1	< 1
Husum-Stadt	< 1	2	3
Husum Segler-Verein(N)	6	5	1200
Kiel Schilksee	2	3	7
Heiligenhafen	8	17	3
Flensburg	k.P.	4	16
Kappeln	k.P.	2	2
Warnemünde YH	< 1	2	< 1
Warnemünde AS	k.P.	80	50
Niendorf	4	38	< 1

k.P.= keine Probe

n.n.= nicht nachweisbar

n.q.= nicht quantifizierbar <BG= unterhalb der Bestimmungsgrenze

2.3.1.5 Saisonale Abhängigkeit der Irgarol-Konzentration

Für neun der untersuchten Häfen sind in Abbildung 22 die ermittelten Daten zusammengefasst. Die Graphiken verdeutlichen die saisonale Variabilität der Irgarolbelastung für Wasser- und Sedimentproben.

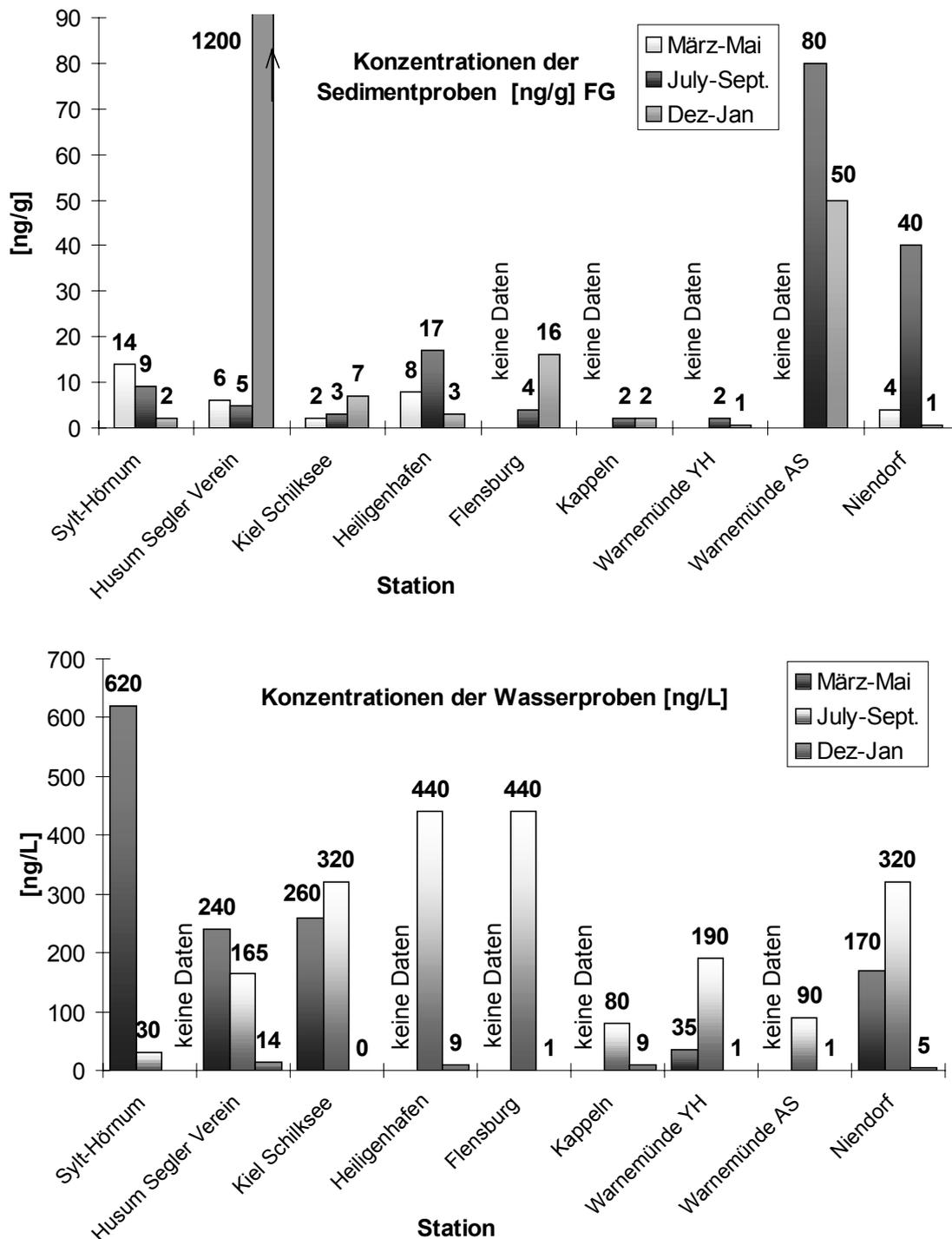


Abbildung 22: Saisonaler Vergleich der Irgarolkonzentrationen im Wasser und im Sediment

Für die erste Probenahme wurden Sedimentbelastungen zwischen <1 und 10 ng/g Feuchtgewicht erhalten. Bedenkt man, daß zu diesem Zeitpunkt die Bootssaison gerade erst begonnen hatte, sind diese Konzentrationen beachtlich. In den ersten Monaten der Saison ist der Eintrag durch die frischen Anstriche in die Wasserphase zumeist stark erhöht. Die Sedimentierung dauert in der Regel aber länger, so daß die im Frühjahr ermittelten Sedimentwerte auch als Spiegelbild der Restbelastungen des Vorjahreseintrages angesehen werden müssen. Die im Sediment gespeicherten Mengen können leicht remobilisiert werden und dadurch die Gehalte in der wäßrigen Phase zusätzlich erhöhen.

Maximale Konzentrationen für die Wasserphase wurden im Frühjahr und im Sommer gefunden, während in der Probenahmeserie 3 die Konzentrationen fast aller Häfen im Bereich der Bestimmungsgrenze lagen bzw. Irgarol nicht mehr nachweisbar war. Die Sedimente zeigten sich auch während der Wintermonate als durchgängig belastet, gleichwohl konnte auch hier ein Rückgang der Konzentrationen festgestellt werden. Demnach muß auch für Irgarol eine Speicherung und Anreicherung im Sediment angenommen werden.

Für einzelne Stationen wurden hiervon abweichend im Winter die höchsten Werte analysiert (Kiel und Flensburg), wobei sich die Interpretation der Daten schwierig gestaltet. Eine Erklärung könnte die zum Teil sehr starke Inhomogenität der Proben sein, wodurch der Gehalt an Kohlenstoff und daraus folgend der Schadstoffgehalt sehr unterschiedlich sein kann. Zusätzlich konnte für die Nordseestationen u.a. auch durch den saisonalen Vergleich gezeigt werden, daß unterschiedliche Belastungen gleichermaßen durch punktuelle Einträge geprägt sind. Vielerorts spielt es eine entscheidende Rolle, ob eine Werftanlage(-Halle) direkt auf dem Yachthafenglände vorhanden ist und wie groß die Entfernung zwischen Probenahmestelle und vorhandenen Slip-Anlagen war. Es wurde versucht, repräsentative Probenahmestellen zu wählen, die einen Vergleich zwischen den Häfen ermöglichen. Demnach wurden die Proben möglichst zentral innerhalb der Bootsanlagen entnommen. Im Winter war dies in den Nordseehäfen zum Teil nicht möglich. Um Eis-Schäden zu verhindern, werden die Steg-Pontons im Winter entfernt. Die in Serien 1 und 2 gesetzten Positionen konnten daher nicht erneut beprobt werden. In zwei Häfen war dadurch gar keine Probenahme möglich, während in anderen Häfen außen liegende Holzstege genutzt werden mußten. In der Station Husum (Segler-Verein) war die Probenahme nur direkt neben einer Slip-Anlage möglich. Daraus resultierend wurde für diese Station, einmalig innerhalb aller Serien, die maximale Konzentration von 1200 ng/g FG ermittelt. Diese sollte als maximaler Wert aufgefaßt werden, sie ist jedoch nicht als repräsentative Belastung für das Sediment im gesamten Hafen anzusehen.

2.3.1.6 Irgarol-Verteilung zwischen Wasser und Sediment

Bis heute ist wenig über die Irgarol-Verteilung zwischen den verschiedenen Kompartimenten bekannt. Um genauere Kenntnisse über den Transport und das Schicksal der Verbindung insgesamt zu erlangen, sind erweiterte Informationen über Anreicherungs- und Verteilungsfaktoren von großer Bedeutung. Die Wasserlöslichkeit von 7 mg/L spricht für eine höhere Affinität des Irgarols zu Schwebstoffen, im Vergleich z.B. zu Atrazin mit einer deutlich besseren Wasserlöslichkeit von 33 mg/L. Starke Varianzen bei Angaben von 3,65 - 3,95 treten für die bisher publizierte Verteilungskoeffizienten auf. Hierbei liegen einige etwa in der Größenordnung der Isomere des HCH. Andererseits wurde 1996 von Rogers et al. mit 2,38 ein wesentlich geringerer Wert durch Modellierung berechnet.^[53] Aus dieser Arbeit geht eine Verteilung des gelösten Irgarol-Rückstandes zu 95 % in der Wasserphase und lediglich zu 4,4 % im Sediment hervor. Des weiteren wurden von Tolosa et al. die Verteilungskoeffizienten $\log K_{oc}$ 5,1 und $\log K_d$ 3,0 durch separate Bestimmung der Irgarolkonzentration für die wäßrige Phase und darin enthaltene Schwebstoffe ermittelt. Untersuchungen zur Bioakkumulation in Seegrass wiederum ergaben mit einem Akkumulationsfaktor von 25.000 eine verhältnismäßig hohe Anreicherung.

Entsprechend der Gleichung 7 wurden aus den Irgarolkonzentrationen der Serie 2, Stationen 7-13, die Verteilungskoeffizienten ($\log K_{OC}$), bezogen auf dem Gehalt an organischen Kohlenstoff, berechnet. Für die Berechnung eines Mittelwertes wurden ausschließlich Daten der Ostseehäfen zugrunde gelegt, da diese wesentlich weniger streuten als die der Nordseehäfen.

$$\log K_{OC} = \log \frac{C_{Sed-OC/TG} \times 1000}{C_{Wasser}} \quad (7)$$

Mit: $C_{Sed-OC/TG}$ = Konzentration im Sediment bezogen auf den Gehalt an organischem Kohlenstoff in [ng/g]

C_{Wasser} = Konzentration im Wasser in [ng/L]

Aus den 7 beprobten Häfen konnte ein mittlerer $\log K_{OC}$ -Wert von 3,3 mit einer Standardabweichung von $\pm 0,72$ bestimmt werden. Die zur Berechnung benötigten Daten sind in Tabelle 15 enthalten. Vergleicht man die Sedimentkonzentrationen, bezogen auf die T_{OC} -Gehalte, wurden maximale Werte mit 3910 ng/g TOC für Warnemünde und 1760 bzw. 1070 ng/g TOC für die Stationen Niendorf und Heiligenhafen erhalten.

Der Gehalt an organischem Kohlenstoff variierte zum Teil auch aufgrund hoher Inhomogenität der Proben zwischen 1,1 % und 5,6 %. Auch aus diesem Grunde wurde entschieden, den Verteilungskoeffizienten in Abhängigkeit von den Gehalten an organischem Kohlenstoff in den Sedimenten zu berechnen. Generell wird für Sedimentkontaminanten die Adsorption am Partikel angenommen. Diese Annahme ist jedoch nicht unbedingt allgemeingültig, vielmehr werden gerade für hydrophile Substanzen zahlreiche sehr komplexe Bindungsmöglichkeiten der Schadstoffe im Sediment diskutiert.

In Verteilungsstudien für Atrazin konnte eine Abhängigkeit der Verteilung vom Salzgehalt festgestellt werden. Es wurde ein Anstieg des partikulär gebundenen Anteils mit zunehmendem Salzgehalt vermerkt. Da sich Atrazin und Irgarol chemisch ähnlich sind, ist eine analoge Abhängigkeit der Verteilung auch für Irgarol zu berücksichtigen.^[53,59] Für diese Untersuchung wird angenommen, daß der Salzgehalt der untersuchten Stationen eine untergeordnete Rolle spielte, da in der Ostsee sehr geringe, kaum variierende Salz-Gehalte vorherrschen.

Tabelle 15: Angaben zur Ermittlung des Verteilungskoeffizienten Wasser/Sediment für Irgarol in bezug auf den Gehalt an organischem Kohlenstoff

Hafen	Station	Sedimente			Wassergehalt [%]	Wasser Konz [ng/L]	Sedimente		Konz (ng/g OC)	Log K _{OC} Verteilung [kg/L]
		Konz.GC-MS [ng/g] FG	Konz. AFID [ng/g] FG	[ng/g] TG			anorg. C [%]	org. C [%]		
Sylt-Hörnum	1	10	9	14	65	29	1	3,8	368	4,1
Sylt-Munkmarsch	2		15	25	60	11	0,7	3,3	758	4,8
Cuxhaven	3		< BG	< BG	67	12	1,2	3,1	< BG	< BG
Büsum	4		< BG	< BG	66	33	1,3	2,8	< BG	< BG
Husum-Stadt	5		2	3	59	keine WP	0,4	1,6	188	keine WP
Husum Segler-Verein	6		5	7,5	64	165	1,2	3,1	242	3,2
Kiel Schilksee	7	3	3	4	71	317	1,4	5	80	2,4
Heiligenhafen	8		17	44	39	435	0,4	4,1	1073	3,4
Flensburg	9	4	4	5	72	438	0,1	1,1	455	3,0
Kappeln	10		2	4	51	77	0,6	3,2	125	3,2
Warnemünde YH	11		2	4	39	188	1,2	3	133	2,9
Warnemünde AS	12	103	81	219	37	91	0,8	5,6	3911	4,6
Niendorf	13	31	38	67	57	319	0,6	3,8	1763	3,7

YH= Yachthafen AS="Alter Strom" BG= Bestimmungsgrenze WP = Wasserprobe

Tabelle 16: Konzentrationen aller analysierter Organozinnverbindungen in ng/g TG sowie das kalkulierte Verhältnis TBT/Irgarol

Stat.	Hafen	N	TBT	DBT	MBT	TPT	DPT	MPT	TBT/Irgarol
1	Sylt-Hörnum	2	640	200	10	70	40	< 10	46
2	Sylt-Munkmarsch	2	160	60	10	20	ND	ND	6
3	Cuxhaven	2	80	30	10	40	< 20	ND	-
4	Büsum	2	210	40	60	< 17	ND	ND	-
5	Husum Stadt	3	720 (± 20)	280 (± 230)	30	< 17	< 20	< 10	240
6	Husum Segler-Verein	2	620	150	30	90	< 20	< 10	78
7	Kiel Schilksee	4	2800 (± 410)	1900 (± 180)	100	3800 (± 2500)	340 (± 230)	60 (± 90)	703
8	Heiligenhafen	2	600	620	20	210	40	10	14
9	Flensburg	4	570 (± 450)	200 (± 90)	50	140 (± 160)	160 (± 200)	< 10	114
10	Kappeln	1	1100	150	10	60	ND	ND	283
11	Warnemünde YH	3	1400 (± 260)	630 (± 410)	140	< 17	< 20	ND	353
12	Warnemünde AS	2	17000	14000	1300	970	220	50	77
13	Niendorf	3	2,000 (± 320)	610 (± 150)	20	1,200 (± 1,300)	200 (± 30)	20 (± 10)	30

2.3.1.7 Vergleich der Konzentrationen zinnorganischer Verbindungen und des Irgarols (zweite Probenahmeserie)

Obwohl die Hauptaufmerksamkeit dieser Studie Irgarol galt, sollten die nach wie vor über die kommerzielle Schifffahrt eingetragenen Zinnorganyle nicht unbeachtet bleiben. TBT ist immer noch eines der stärksten Umweltgifte, die momentan in Gebrauch sind, und triorganische Zinnverbindungen sind wegen ihrer insgesamt hohen Ökotoxizität seit Jahren Gegenstand öffentlicher Diskussionen. Trotz des Verbotes für die Verwendung in der Sportschifffahrt und Regulation der Applikationen wird kontinuierlich über hohe Gehalte dieser Substanzklasse in den Gewässern reiner Yachthäfen, aber auch in offenen Gewässern und natürlich in großen Seehäfen berichtet. Für Seehäfen mit Werftaktivitäten wurden auch in jüngster Zeit mit 1 bis 100 µg/g TG sehr hohe Sedimentbelastungen gemessen.^[FUSSENDNOTEREF _Ref487805464 \h 6178-81] Weiterhin werden zinnorganische Verbindungen als Industriechemikalien auch gegenwärtig in großen Mengen eingesetzt. Des weiteren zählen die Desinfektion im Hygienebereich, Konservierung wasserbasierter Farben und Lacke, aber auch der Materialschutz (Dachbahnen, Holzschutz) zu den Anwendungsbereichen der zinnorganischen Substanzen. Solche Verwendungen führen in der Regel zu einem diffusen, aber kontinuierlichen Austrag von TBT aus den behandelten Materialien in die Umwelt. In einer von der Zeitschrift „Ökotest“ durchgeführten Studie wurden Rückstände der giftigen Substanz in der Sportbekleidung von der Socke bis zum T-Shirt analysiert. Der Nachweis der giftigen Substanz in der Sportbekleidung sensibilisierte zusätzlich die Öffentlichkeit in der Besorgnis um gesundheitliche Risiken durch TBT.^[82]

Besonders schwerwiegend sind durch die hormonelle (androgene) Wirkung des TBTs hervorgerufene Schädigungen, die insbesondere für marine Schnecken festgestellt wurden. Hierbei handelt es sich um pathomorphologische Veränderungen im Genitalbereich, die zur Sterilität von Schneckenpopulationen führen können (Ausbildung männlicher Geschlechtsorgane bei weiblichen Schnecken, *Imposex*). Auch an der niedersächsischen sowie der schleswig-holsteinischen West- und Ostküste sind Schneckenarten wie die Wellhornschnecke und mehrere Arten von Strandschnecken und Wattschnecken betroffen. Derzeit sind für etwa rund 130 Schneckenarten bereits Schädigungen durch TBT bekannt. Ferner kommt es über die Nahrungskette zu weitverzweigten schädlichen Effekten bei Seevögeln, Fischen und Meeressäugern, die sich u.a. auch weit ab von den Küstenzonen ernähren.^[80,83,84]

Gerade in jüngster Zeit häufen sich die Meldungen über mit TBT belastete Fische bzw. Fischkonserven. Daraus resultiert ein beachtenswertes Risiko für den Menschen, betrachtet man alleine die potentiellen hormonellen Effekte des TBTs bereits für Konzentrationen im Ultraspurenbereich. Erst kürzlich erregten die von Kannan et al. veröffentlichten Daten zu Belastungen des menschlichen Blutes mit TBT und entsprechenden Transformationsprodukten großes Aufsehen.^[85,86,87]

Die zweite Sedimentproben-Serie der vorliegenden Arbeit wurde auf TBT inklusive aller Metabolite sowie Triphenylzinn (TPT) und entsprechende Abbauprodukte untersucht. Die Gruppe der Phenylzinnverbindungen wurde ebenfalls berücksichtigt, da diese ein ebenso hohes toxisches Potential aufweisen wie TBT. Die Arbeiten wurden innerhalb des gemeinsamen Projektes ALOSON des UBAs unter Federführung von Herrn PD Dr. Fent (EAWAG) durchgeführt. Alle Ergebnisse der

Sediment-Messungen sind in Tabelle 16 auf Seite 71 dargestellt. Interessant erschien vor allem die Untersuchung derselben Sedimentproben für einen Vergleich des TBT-Ersatzstoffes Irgarol mit den Gehalten an TBT und dessen Transformationsprodukten.

In allen Proben konnten Tributylzinn (TBT) und Triphenylzinn (TPT) nachgewiesen werden. Die resultierenden Transformationsprodukte (Dibutyl- (DBT), Monobutylzinn (MBT) und Diphenyl-, Monophenylzinn (DPT, MPT)) waren ebenfalls vorhanden, jedoch in geringeren Konzentrationen (10-14.000 ng/g TG). Die maximalen Gehalte an TBT lagen zwischen 2000 und 17.000 ng/g TG für die Stationen 7, 12 und 13. Vergleicht man diese Werte mit den jeweiligen Irgarolkonzentrationen, ergeben sich für die zinnorganischen Substanzen an allen Stationen um 1-2 Größenordnungen höhere Werte.

Obwohl es sich bei der Station 7 (Kiel Schilksee) um einen reinen Yachthafen handelt, weshalb kein Neueintrag in den letzten 10 Jahren vorliegen sollte, wurden hier sehr hohe Konzentrationen an TBT bestimmt. Dieser Befund läßt den Schluß zu, daß der Abbau zu DBT und MBT sehr langwierig ist. Ferner zeigen die verhältnismäßig hohen Gehalte an DBT und MBT, daß auch diese Abbauprodukte eine hohe Persistenz aufweisen. Zusätzlich ist aber zu bedenken, daß das Anwendungsverbot für die TBT-haltigen Anstriche nicht immer eingehalten wird. Jüngste Ergebnisse einer Studie zu TBT- und Irgarolbelastungen in Häfen der englischen Küste konnten belegen, daß trotz Verbotes in einzelnen Lackierungen der Boote < 25 mg TBT enthalten war.^[64]

Für die Nordseehäfen wurden weitaus geringere Gehalte als für die Ostseehäfen ermittelt. Höchstmengen fanden sich in der Probe Husum Stadt, mit einem Hafen, der ebenso für Schiffe der Fischereiwirtschaft und Ausflugsschiffen Liegeplätze anbietet.

Bisher wurden die Effekte von TBT auf Muscheln und Schnecken vor allem mit Belastungen des Wassers in Verbindung gebracht. Die Bedeutung der Sedimentbelastung tritt erst in jüngster Zeit in den Vordergrund, und zwar vor allem im Zusammenhang mit dem Verklappen von kontaminiertem Baggergut. Generell gilt für die Verteilung von TBT, daß zwischen 95 und 99 % partikulär gebunden vorliegen und max. 5 % in der wäßrigen Phase gelöst sind. Durch Aufwirbeln kann es jedoch zu einer maximalen Auslaugung des Sedimentes kommen, wodurch der Anteil in der wäßrigen Phase bis zu 35 % ansteigen kann.^[88] Die Oslo-Paris-Kommission (OSPAR) zum Schutz der Meeresumwelt sieht daher im Rahmen von ökotoxikologischen Bewertungskriterien als vorläufigen Grenzwert für TBT-Gehalte in Sedimenten Konzentrationen von 0,005-0,05 µg/kg TG vor.

Neben der verständlicherweise deutlich höheren Belastung von Hafensedimenten sind durchaus auch beträchtliche Konzentrationen der Organozinnverbindungen in küstennahen Bereichen vorhanden, die dem Einfluß des normalen Schiffsverkehrs unterliegen. In einer Untersuchung von 1997 im Rahmen des Bund-Länder-Meßprogrammes (BLMP) wurden für die Nordsee maximale TBT-Konzentrationen von 124 µg/kg TG und für die Elbe bei Cuxhaven 44 µg/kg TG ermittelt.^[89] In einer 1996 durchgeführten Untersuchung von Kalbfus et al. werden Medianwerte von 34-1200 ng/kg FG angegeben mit Spitzenbelastungen von 34 µg/kg FG.^[90]

Betrachtet man wiederum Daten aus dem limnischen Bereich, wie z.B. Untersuchungsergebnisse aus der Elbe oder dem Hamburger Hafen, wird eine durchschnittliche Belastung von 400 µg/kg (TG) angegeben.^[91] Die hohen Einträge durch den Schiffsverkehr spiegeln sich nicht nur im Sediment wider, auch die Untersuchung einer hochbelasteten Brassenpoolprobe (standorttreuer Fisch) zeigte

eine Konzentration von 2950 µg/kg FG. Die Ergebnisse der Hamburger Umweltbehörde betragen für Poolproben von Aal und Brasse im Durchschnitt zwischen 15 und 400 µg/kg FG. Dies bedeutet für den Fischkonsumenten, daß die Fische die ADI-Werte (1,6 µg/kg-KG/Tag) der WHO bei weitem überschreiten. Insgesamt ist festzustellen, daß Wasser und Sedimentkonzentrationen innerstädtischer Gewässer die Effekt-Level für aquatische Organismen deutlich überschreiten.

2.3.2 Zusammenfassende Betrachtung

Es konnten sowohl für die Nord- als auch Ostsee-Stationen beachtliche Konzentrationen von Irgarol im Wasser (1 - 440 ng/L) und im Sediment (<1 - 80 ng/g FG) bestimmt werden. Ergebnis einer jüngst durchgeführten ökologischen Risikoeinschätzung, basierend auf europäischen Monitoringdaten für Irgarol, ist, daß nach einer Wahrscheinlichkeitsberechnung gut 10 % aller Pflanzen in Hafengebieten mit geringem Wasseraustausch in den Sommermonaten durch eine reduzierte Photosyntheseaktivität ein verringertes Wachstum aufweisen.^[92] Wachstumsstörungen und Hemmung der Photosynthese sind ab einer Konzentration von 136 ng/L gegeben. In der vorliegenden Arbeit wurden in den Sommermonaten etwa dreimal höhere Gehalte in fast allen untersuchten Ostseehäfen ermittelt. Die Autoren der zuvor zitierten Studie berücksichtigten als einziges ökologisches Risiko bei Verwendung von Irgarol dessen Wirkung als Photosynthesehemmer und damit als Pflanzentoxin, während eine Toxizität für Fische und Invertebraten erst ab wesentlich höheren Irgarolkonzentrationen angenommen wird (LC₅₀ Invertebraten 400 µg/L; LC₅₀ Fisch 790 µg/L), die allgemein nach Meinung der Autoren auch innerhalb von Hafenanlagen nicht erreicht werden.

Die Halbwertszeit von Irgarol in Seewasser beträgt 201 Tage. Bei einer photochemisch induzierten Transformation wird als Hauptprodukt *N*-(1,1-dimethylethyl)-6-methylthio-1,3,5-triazin-2,4-diamin gebildet, welches eine wesentlich geringere Toxizität als die Mutterverbindung aufweisen soll.^[92] Unter anaeroben Bedingungen findet kein Abbau statt. Insgesamt ist auf der Grundlage der vorhandenen Datensätze festzuhalten, daß die ermittelten Werte der vorliegenden Studie eine Remobilisierung des Irgarols aus dem Sediment in die Wasserphase während der Winterzeit erwarten lassen.

Die in Probenserie 2 ermittelten Daten für die Belastung mit Organozinnverbindungen zeigen deutlich, daß die Sedimente mit dieser giftigen Substanzgruppe als „langzeitkontaminiert“ zu bezeichnen sind. Ein Rückgang der Konzentrationen, selbst ohne Neueinträge, erfolgt offensichtlich nur sehr langsam. Die Verbindungen TBT und TPT konnten in allen untersuchten Sedimentproben nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Irgarolkonzentrationen liegen die Werte für alle Stationen um 1-2 Größenordnungen höher.

Die Auswirkungen der Biozide im Sediment, z.B. auf Schnecken, Muscheln und Benthos, beruhen in der Regel auf komplexen Wechselwirkungen. Nicht nur durch eine extreme Sensibilität, sondern auch wegen ihrer Lebensweise und Ernährung sind viele Spezies mittlerweile gefährdet. Erste Effekte z.B. bei der Wattschnecke (*Littorina littorea*) treten bereits ab TBT-Konzentrationen im Wasser von 5 - 10 ng/L auf.^[84] Unabhängig von ihrer endokrinen Wirkung auf Schnecken wirken Zinntrialkyle auf Gewässerorganismen, vor allem auf Fische, schon in sehr geringen Konzentrationen

toxisch: Der niedrigste NOEC-Wert (90 d) von 10 ng/L wurde für eine Süßwasser-Spezies (*Poecilia reticulata*) berichtet.

Ökotoxikologische Untersuchungen ergaben deutliche Unterschiede in der Wirkung zwischen verschiedenen aquatischen Spezies, wobei sich Regenbogenforellen z.B. als wesentlich sensitiver als der Aal zeigten. Die Toxizität von Zinnorganylen sinkt anscheinend mit abnehmendem Substitutionsgrad und zunehmender Kettenlänge des organischen Rests. Tabelle 17 zeigt eine Auswahl bereits veröffentlichter Daten zur chronischen und akuten Toxizität für aquatische Organismen.

Tabelle 17: Toxizität des TBT für sensitive aquatische Organismen ^[83]

Organismus	Endpunkt/ Effekt	Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	Verbindung
Algen	EC ₅₀ , 72 h	0,3-0,4	TBT-Oxid
	Chronisch (Wachstum)	0,1	(TBTO)
Zooplankton	LC ₅₀ , 48 h	1,1	TBT
<i>Acartia tonsa</i>	LC ₅₀ , 6 d	0,4	TBTO
<i>Nauplii</i>	Chronisch (überlebend, 6 d)	0,023	TBT-Chlorid (TBTCl)
<i>Daphnia magna</i>	LC ₅₀ 96 h	3,3-5,5	TBT
	LC ₅₀ 96 h	1,7	TBTO
<i>Amphipods</i>	LC ₅₀ 96 h	1,3	TBT
	Chronisch 24 d (no lethality)	0,53	TBT
<i>Molluscs, Bivalves</i>	Chronisch (Körpergew.)	0,73	TBT
Austern (<i>C.gigas</i>)	Chronisch LC ₁₀₀ 12 d h	0,18	TBT-Acetat
<i>Mytilus edulis</i>	Chronisch (Wachstum)	0,25	(TBTAc)
		0,1	TBT
Larven	Chronisch 25 d (Wachstum)	0,05	TBTO
			TBT
Würmer			
<i>T.tubifex</i>	LC ₅₀ , 24 h	5,5	TBTO
<i>Crustaceae</i>			
Krabben (juv.)	LC ₅₀ 96 h	0,3	TBT
Adulte	LC ₅₀ 96 h	0,42	TBT

Durch hohe Wasseraustauschraten und damit auch starke Strömungen an der Sedimentoberfläche, wie sie in den untersuchten Nordseehäfen zum Teil vorgefunden wurden, aber auch durch Baggerungen oder Aufwirbelung durch Schiffsmanöver, kommt es relativ schnell zu einer Remobilisierung der Umweltgifte. Damit werden die Stoffe wieder außerhalb der Häfen in offenen Gewässern verfügbar. Die Verteilung und das Schicksal des TBTs sind mittlerweile gut erforscht, Abbildung 23 zeigt die verschiedenen Konzentrationslevel für die Kompartimente Wasser, Sediment und Biota. Die Verteilung im Wasser zwischen gelöster Phase und partikulärem Material ist unter

anderem vom Salzgehalt und pH-Wert abhängig. Ebenso wird die Adsorption im Sediment von natürlich vorhandenen Chelatisierungsreagenzien bzw. allgemein von Komplexbildnern beeinflusst.

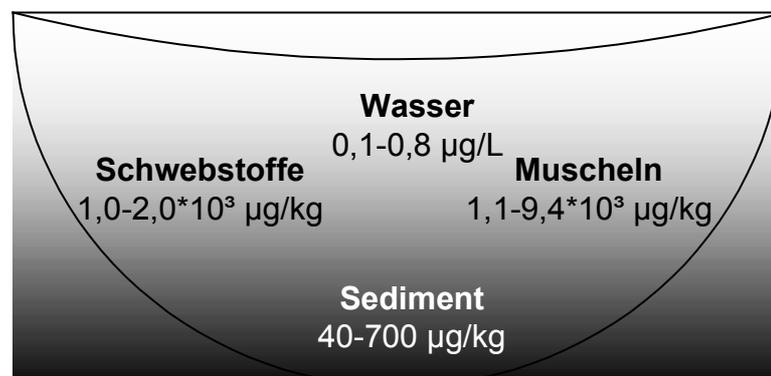


Abbildung 23 : Verteilung des TBTs in unterschiedlichen Kompartimenten, basierend auf Messungen im Luzerner See zwischen 1988 und 1994; aus "Ecotoxicology of Organotin Compounds"^[83]

Ein weiteres Problem ergibt sich für die z.T. extrem belasteten Baggergüter. Seewasserwege und Hafenanlagen müssen, um sie für geforderte Schiffsgrößen befahrbar zu halten, regelmäßig ausgebaggert werden. Je nach Herkunft der Sedimente (Nationalpark, Bundeswasserstraßen etc.) gibt es unterschiedliche Entsorgungsverfahren. Für TBT-kontaminierte Sedimente (z.Zt. > 50 µg/kg TG) ist nur noch eine Deponierung an Land möglich, was im Vergleich zum Verspülen, Verklappen bzw. bei Verwendung und Verwertung der Böden ein extremer Kostenfaktor ist.

Die Situation zwingt daher aus ökologischen und ökonomischen Gründen zu einem Ausstieg aus der Organozinnverwendung. Der Einsatz von organischen Bioziden (Irgarol, Diuron, Chlorothalonil, Dichlofluanid) kann, wie die in dieser Arbeit vorgestellten Daten für das Beispiel Irgarol zeigen, nur als eine vorübergehende Notlösung betrachtet werden.

Ein generelles Anwendungsverbot von organozinnhaltigen Anstrichen wurde bereits im November 1999 auf der Hauptversammlung der International Maritime Organisation (IMO) festgelegt. Die Vollversammlung der IMO empfiehlt in einer Resolution das Verbot der Applikation TBT-haltiger Farben zum 1. Januar 2003, abgesichert durch eine vom MEPC zu erarbeitende internationale Konvention.^[93] Somit wird der Bedarf an biozidfreien Anstrichen entscheidend steigen. Weltweit sind mittlerweile über 10 Produkte auf dem Markt, die allerdings zur Zeit nur für Spezialanwendungen angeboten werden. Hierbei handelt es sich zum Teil um Beschichtungen aus Silikon oder aber teflonhaltige Anstriche, deren Oberflächen zu glatt für einen Bewuchs sind. Weiterhin im Angebot sind selbstpolierende Farben auf Kupferbasis, zum Teil noch ergänzt durch nicht TBT-haltige Biozide (Algentoxine). Darüber hinaus gibt es die Entwicklung hydroviskoser Anstriche, hierbei handelt es sich um Epoxyharze, die unter Wasser aufquellen und dadurch einer „schlüpfrigen“ Fischhaut gleichen. Die maximalen Standzeiten sind von der Nutzung der Schiffe bzw. deren Fahrtgeschwindigkeit abhängig und variieren stark. Daher sollten Anstriche entsprechend der spezifischen Nutzung der Schiffe (Fahrtgeschwindigkeiten etc.) gewählt werden.

Innerhalb eines gemeinschaftlichen Pilot-Projektes der Hamburger Umweltbehörde, der HADAG Reederei, Schiffsfarbenherstellern und dem WWF wurden bereits über 6 Monate unterschiedliche

Alternativanstriche und verschiedene Reinigungsverfahren getestet, wobei in Silikon-Beschichtungen - wenn auch problematisch in Applikation und Persistenz – und hydro-viskosen Anstriche zusammen mit einer Mikrofaser-Beschichtung, aussichtsreiche Perspektiven gesehen werden.^[94]

2.3.3 Weitere in den Wasser- und Sedimentproben identifizierte Verbindungen

Zu Beginn der Probenahme-Kampagne erschien es sinnvoll, sich im wesentlichen mit der Belastung von Irgarol im Wasser und auch im Sediment zu befassen und damit auf eine Hauptkontaminante zu beschränken, da systematische Untersuchungen beider Kompartimente als recht umfangreich angesehen wurden. Trotzdem wurden alle Fraktionen einzelner Wasser- und auch Sedimentprobenextrakte per GC-MS untersucht. Die Ergebnisse des Screenings werden in Tabelle 18 aufgeführt. Einzelne Sedimentfraktionen wurden außerdem GC-AFID-Messungen unterzogen. Aufgrund der höheren Nachweisempfindlichkeit der AFID-Detektion wurden durch Vergleich mit externen Standardgemischen noch Hinweise auf weitere stickstoffhaltige Verbindungen erhalten. Alle per GC-MS ermittelten Substanzen wiesen eine hohe Übereinstimmung mit Bibliotheksspektren auf, es fand aber überwiegend keine Verifizierung durch einen Vergleich mit Referenzsubstanzen statt.

In allen per GC-MS untersuchten Proben fiel eine Isocyanatverbindung auf, bei der es sich höchstwahrscheinlich um ein Fragment des Diurons handelt. Diuron ist in einigen Antifouling-Anstrichen neben Irgarol als Biozid enthalten, daher ist das Vorkommen im Hafenwasser nicht unwahrscheinlich. In Fraktion 3, der sehr polaren Essigsäureethylesterfraktion, der Station 13 wurde durch Vergleich mit Bibliotheksspektren auf ein mögliches Vorhandensein von Coffein geschlossen (s.a. Abbildung 24). Das Vorkommen von Coffein ist u.a. bereits für Rhein und Elbe beschrieben.^[95]

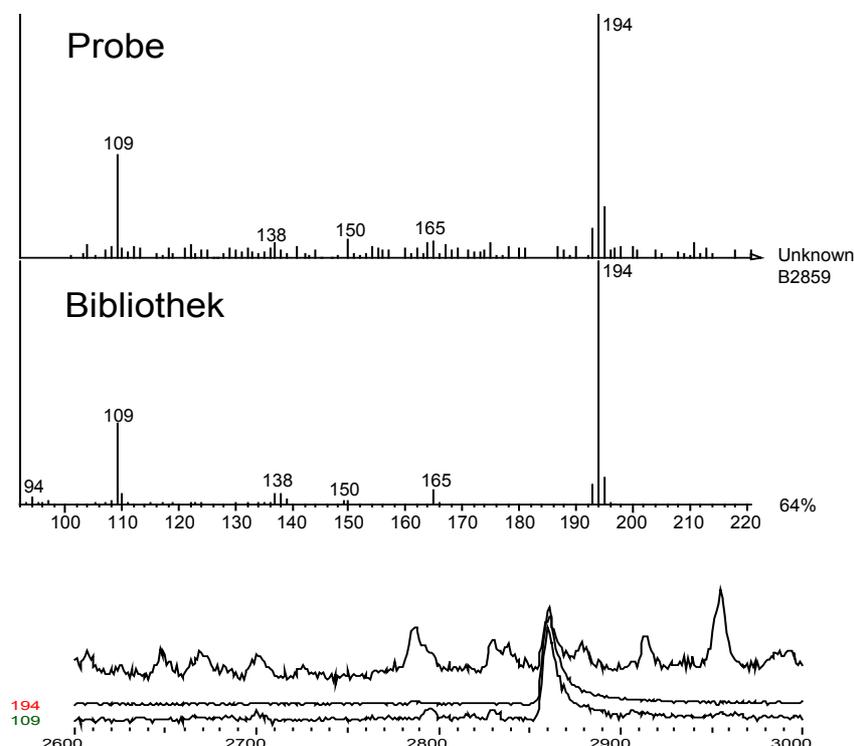


Abbildung 24: Vergleich der Massenspektren der unbekannten Substanz in Fraktion 3 der Wasserprobe Station 13 (Niendorf Hafen) (oben), mit dem Bibliotheksspektrum für Coffein (unten).

In der Wasserprobe Station 3 (Serie II) wurde mit Terbutylazin ein Triazin-Vertreter der landwirtschaftlich genutzten Triazin-Pestizide gefunden. Die Abbildung 25 zeigt den Vergleich der erhaltenen Massenspektren. Terbutylazin konnte über den Vergleich mit einem Referenzstandard eindeutig verifiziert werden.

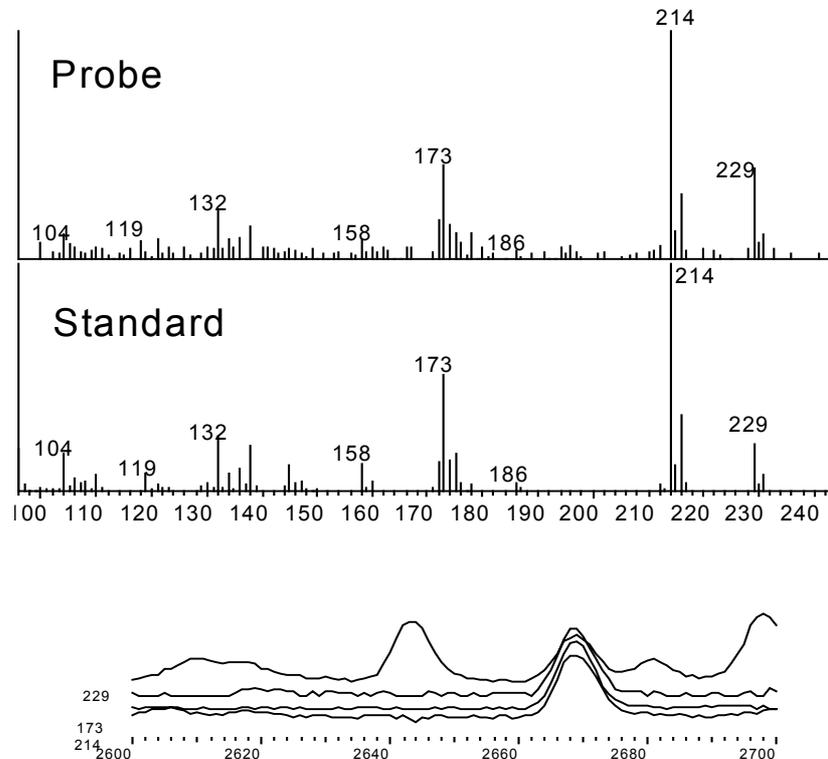


Abbildung 25: Vergleich der Massenspektren des Terbutylazins (Oben: Wasserprobe, mitte: Standard; unten: Ionenspuren für m/z 229, 214 und 173).

Neben punktuellen MS-Untersuchungen der Wasserprobenextrakte wurden auch die Fraktionen 2-6 ausgewählter Sedimentproben per GC-MS analysiert. Für 7 Proben erfolgte zudem die Analyse der Fraktionen 3-5 per GC-AFID: Die MS-Untersuchung ergab eine Übereinstimmung von folgenden Standardreferenz-Substanzen mit Proben-Inhaltstoffen:

Tabelle 18: Ergebnisse der GC-MS-Untersuchung ausgewählter Hafensedimente

Verbindung/Station	Fraktion	Hörnum	Cuxhaven	Kiel Schilksee	Warnemünde YH
Chlornitrobenzol	3,4	X	X		
2,5-DCA	3	X	X		
TCA	3	X	X		
Galaxolid	4	X	X	X	X
Tonalid	5	X	X	X	X
Moschus-Xylol	3,4		X		
Moschus-Keton	4		X		
MX-4-Amin	4		X		

In der Probe aus dem Cuxhavener Yachthafen ist das Auftreten der Nitromoschusverbindungen, inklusive des Amino-Transformationsproduktes des Moschusxylols stark aufgefallen. Der Gehalt der Nitromoschus-Transformationsprodukte überrascht, da für diese Station, durch den hohen

Wasseraustausch im Vergleich zu den anderen Stationen, wesentlich geringere Belastungen mit organischen Schadstoffen festgestellt wurden. Eine mögliche Erklärung könnte in einer unbekanntem Abwasser-Zuleitung im Hafenbecken sein, die eventuell im Zusammenhang mit lokalen Abwässern des touristischen Gewerbes steht.^[96] Abbildung 26 zeigt die Strukturen der möglichen Nitromoschustransformationsprodukte, die Mutterverbindungen und polycyclischen Moschusduftstoffe sowie deren chemische Bezeichnungen sind in Abbildung 2 (Seite 20) dargestellt. Bis auf die polycyclischen Duftstoffe lagen jedoch die Konzentrationen aller Verbindungen an der Nachweisgrenze und waren somit nicht quantifizierbar.

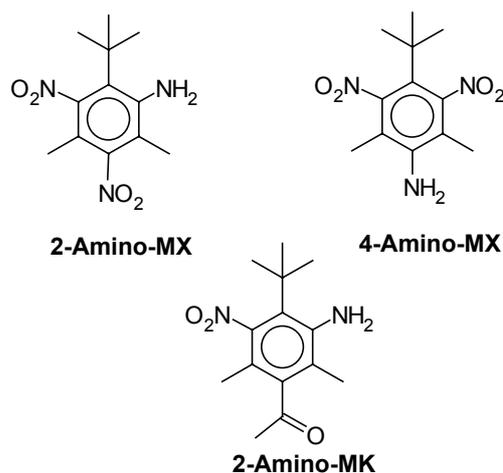


Abbildung 26: Strukturen der Nitromoschus-Transformationsprodukte

Außerdem wurden eine Reihe klassischer Sedimentinhaltsstoffe (KW, PAK, chlorierte KW etc.) identifiziert. Für die Station Hörnum fiel ein relativ hoher Gehalt an bromierten Verbindungen, wie beispielsweise der Brom-Indole auf. Diese Verbindungen werden im folgenden Kapitel im Rahmen der Screening-Ergebnisse dreier Nordseeproben näher diskutiert.

Die AFID-Analyse ergab eine Übereinstimmung in den Retentionszeiten von Standard-Referenzverbindungen und den in Tabelle 19 enthaltenen Substanzen. Die Daten werden als Vermutung bzw. Hinweis auf ein Vorkommen der Verbindungen gewertet, wobei die Messungen jeweils auf zwei Kapillarsäulen unterschiedlich polarer stationärer Phasen (SE 54, DB 698) durchgeführt wurden. Es wurde für eine Reihe an Substanzen eine Übereinstimmung mit externen Referenzsubstanzen erhalten, die anschließend auch durch die GC-MS Analyse verifiziert werden konnten.

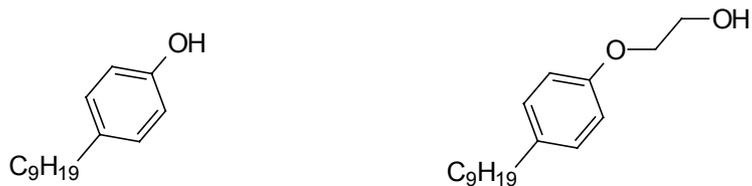
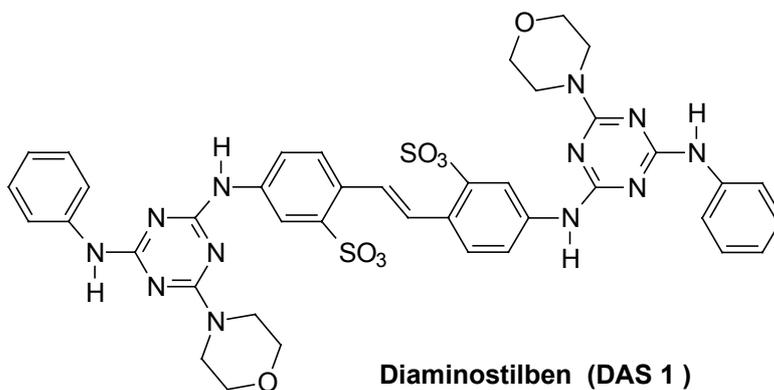
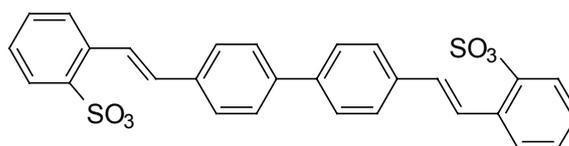
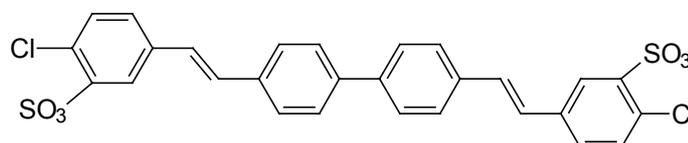
Tabelle 19: Ergebnisse der AFID-Messungen.

Verbindung/Station	Frkt.	Sylt- Munkmarsch	Hörnum	Kappeln	Büsum	Warnemünde YH
Nitrobenzol	3 (4)			☒		
2-Nitrotoluol	3	☒				☒
3-Nitrotoluol	3					☒
1-Chlor-2-nitrobenzol	3,4	☒	☒		☒	
1-Chlor-3-nitrobenzol	3,4	☒	☒	☒	☒	
1-Chlor-4-nitrobenzol	3,4	☒				
1,4-Dichlor-2-nitrobenzol	4	☒	☒		☒	

Im Rahmen des ALOSON-Projektes wurden die Sedimente der zweiten Probenahmeserie auf weitere Schadstoffe untersucht: Von der Arbeitsgruppe Giger (EAWAG, Schweiz) wurden die Konzentrationen an **Nonylphenol (NP)**, **Nonylphenol-mono-ethoxylat (NP1EO)**, **Diaminostilben (DAS)**, **Distyrylbiphenyl (DSBP)** und **BLS** untersucht. (Die Strukturen der untersuchten Verbindungen zeigt Abbildung 27). Ebenso wurden einzelne Hafenproben der Nord- und Ostsee durch die Arbeitsgruppe Schröder (Universität Aachen) auf Rückstände an Nonylphenoethoxylate $[NP(EO)_n]$ sowie dem Gehalt an linearen Alkylbenzolsulfonaten untersucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 20 und 21 aufgeführt.

Mit 10 bis 153 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TG liegen Nonylphenolkonzentrationen in etwa der gleichen Größenordnung wie in zwei Schweizer Seen (Bieler- und Wohlersee). Die Nonylphenol-Belastungen eines dritten Schweizer Sees (Greifensee) liegen 1-2 Größenordnungen höher.^[97] Nonylphenol-monoethoxylat konnte in den untersuchten Proben nicht quantifiziert werden. Die Konzentrationen der untersuchten optischen Aufheller lagen in den Sportboothäfen zwischen < 10 und maximal 59 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TG für Diaminostilben (DAS) (MW Nordsee 35 ± 19 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TG; MW Ostsee 23 ± 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Für DSBP wurden etwas niedrigere Werte zwischen < 2 und maximal 21 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TG erhalten. Die Verbindung BLS konnte in allen Proben nachgewiesen werden, allerdings in nichtquantifizierbaren Mengen. Insgesamt liegen die erhaltenen Daten aus Nord- und Ostseehäfen, verglichen mit Belastungen des Oberflächen-Sedimentes des Greifensees (ein relativ kleiner Schweizer See, mit relativ hoher Einwohnerdichte), um ein bis zwei Größenordnungen tiefer (DAS 1 und DSBP)^[98].

**Nonylphenol (NP)****Nonylphenol-Monoethoxylat (NP1EO)****Diaminostilben (DAS 1)****Distyrylbiphenyl (DSBP)****Bleichmittel-stabiler Aufheller (BLS)****Abbildung 27: Strukturen der weiteren, in den Sedimentproben untersuchten Verbindungen****Tabelle 20: Ergebnisse der Analyse-Daten in [$\mu\text{g}/\text{kg}$ TG] der Arbeitsgruppe Giger (EAWAG, Schweiz)**

Station	Nr.	NP	NP1EO	DAS 1	DSBP	BLS
Sylt-Hörnurn	1	85	< 10	12	4	< 2
Sylt-Munkmarsch	2	24	< 10	< 10	< 2	< 2
Cuxhaven	3	53	< 10	59	12	< 2
Büsum	4	22	< 10	32	7	< 2
Husum-Stadt	5	60	< 10	44	16	< 2
Husum Segler-Verein	6	153	< 10	53	21	< 2
Kiel Schilksee	7	25	< 10	32	16	< 2
Heiligenhafen	8	11	< 10	27	4	< 2
Flensburg	9	81	< 10	10	9	< 2
Kappeln	10	10	< 10	27	5	< 2
Warnemünde YH	11	35	< 10	14	9	< 2
Warnemünde AS	12	134	< 10	52	22	< 2
Niendorf	13	41	< 10	10	5	< 2

Tabelle 21: Ergebnisse der Analyse-Daten in [$\mu\text{g}/\text{kg}$ TG] der Arbeitsgruppe Schröder (Universität Aachen)

Station	Nr.	Serie	NP (EO) _n		LAS (C ₁₀₋₁₃)	
Büsum	4	1	< 10	< 10	43	39
Kiel Schilksee	7	1	45	39	107	106
Warnemünde YH	11	2	28	29	99	72
Niendorf	13	3	< 10	< 10	87	81

Für beide Verbindungen erfolgte eine Mehrfachbestimmung derselben Probe (n = 2)

Die LAS- und die NP(EO)_n-Untersuchungen wurden jeweils über ES-FIA/MS und FIA/MS/MS im SRM-Modus (selected reaction monitoring) durchgeführt. Für nähere Erläuterungen zu den unterschiedlichen methodischen Verfahren soll an dieser Stelle auf die entsprechende Literatur verwiesen werden^[99-101].

Die gemessenen Konzentrationen der Nonylphenole und der optischen Aufheller deuten insgesamt auf diffuse Einträge hin. Sie scheinen vor allem von kommunalen Belastungen abhängig zu sein (Küstennähe). Ferner besteht noch die Möglichkeit, daß die Alkylphenole über „Offshore“ Aktivitäten in die Nordsee eingetragen werden. Während die Hafensproben generell lokale Belastungsschwerpunkte im Zusammenhang mit der Sportschifffahrt und verwendeten Anstrichen etc. widerspiegeln.

2.4 Screening-Untersuchung von Nordsee-Sedimenten

Zur Beschreibung der Schadstoffbelastung von aquatischen Sedimenten gehört neben der Erstellung einer umfangreichen qualitativen Substanzübersicht auch eine quantitative Erfassung ausgewählter Verbindungen. Hierbei können wichtige zusätzliche Informationen zur Abschätzung möglicher Gefährdungspotentiale für die Umwelt und den Menschen erhalten werden. Dementsprechend sollten nach dem vorläufigen Abschluß der Methodenentwicklung und den Versuchen zur WFR einzelne Nordseeproben auf ausgewählte Zielverbindungen untersucht werden. Hierbei richtete sich die Aufmerksamkeit weniger auf die sogenannten „historischen Schadstoffe“, die überwiegend Gegenstand der Monitoringprogramme staatlicher Untersuchungsstellen sind, sondern vor allem auf Verbindungen höherer Polarität, die bereits durch ihr Vorkommen in der Wasserphase auffällig geworden sind und teilweise über relativ hohe Toxizitäten verfügen.^[102]

In der Regel gelangt ein großer Teil der in Flüssen transportierten Schadstoffe letztlich in die Meere. Alleine die Elbe liefert mit ihren Nebenflüssen ein breites Spektrum an Substanzen, welche sich im Sediment und Wasser nachweisen lassen. Umfangreiche sogenannte non-target-Listen wurden in den letzten Jahren größtenteils von Franke et al. erarbeitet, worin mehr als 520 organische Chemikalien im Wasser, Schwebstoffen und Sedimenten der Elbe (ab der tschechischen Grenze) identifiziert und verifiziert wurden.^[35,103]

Im folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchung von drei ausgewählten Nordseesedimenten diskutiert. Im Gegensatz zu den Hafensproben, deren Belastung generell auf lokale Quellen zurückzuführen ist, stellen zusätzlich zu den Flüssen atmosphärische Depositionen, direkte Verschmutzung auf See durch Verklappung, Havarien und Leckagen sowie Offshore-

Aktivitäten weitere wichtige Quellen des Schadstoffeintrages in die Nordsee dar. Zu den bedeutenden Schadstoffen der Nordsee zählen immer noch Schwermetalle, Kohlenwasserstoffe, chlorierte Kohlenwasserstoffe, aber auch Nährstoffe.

Die Auswahl der untersuchten Proben erfolgte entsprechend den zu erwartenden Belastungsschwerpunkten und nach der Zusammensetzung des Probenmaterials (schlickhaltig, tonhaltig). Im Wasser gelöste Verbindungen unterliegen der direkten Bewegung des Wasserkörpers, während die räumliche Ausdehnung partikulär gebundener Kontaminanten im wesentlichen durch Sedimentations- und Erosionsprozesse bestimmt wird. Die in Abbildung 28 gezeigten Probenahmestationen werden entsprechend den Strömungsverhältnissen für die Wasserphase der Deutschen Bucht wie folgt beschrieben: Station 1 unterliegt weitgehend den Einflüssen der Weser und eventuell des Rheins, während die Stationen 2 und 3 aufgrund der vorherrschenden Wasserbewegungen durch die Elbeinflüsse dominiert sein sollten.

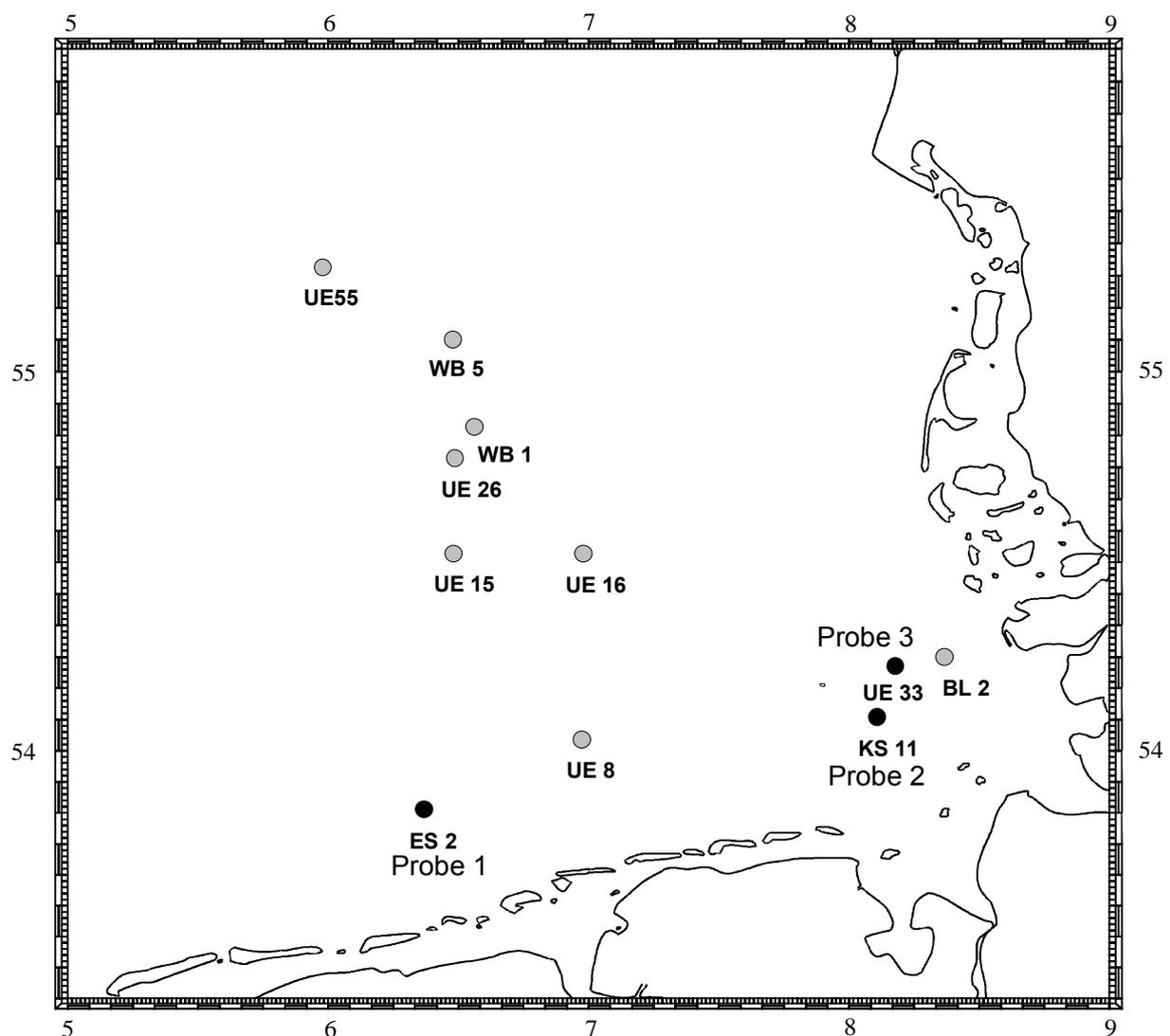


Abbildung 28: Stationen der Sedimentprobenahme Nordsee

Tabelle 22 gibt zur näheren Erläuterung die hydrographischen Daten der in die Nordsee mündenden Flüsse wieder. Für Schwermetalle und einige Chlororganika gilt der Rhein als bedeutendster Eintragspfad bzw. Transportweg. Die Elbe stellt nach den Angaben der Gewässergütestelle ARGE-Elbe nach wie vor für die in die Deutsche Bucht mündenden Flüsse den am höchsten belasteten Strom dar, aber auch Weser und Ems können ausschlaggebend für lokale Belastungen sein.^[106,104]

Tabelle 22: Hydrographische Daten der in die Nordsee mündenden Flüsse^[105]

	Länge [km]	Mittlerer Jahresabfluß [m³/s]	SPM-Fracht [10 ⁶ t/a]	Einzugs- gebiet [km²]	Einwohner im Einzugsgebiet [mio]
Elbe	1091	877	0,8	148268	24,9
Weser	432	381	0,4	45800	k.A.
Ems	371	110	0,14	12649	k.A.
Rhein	1326	2300	4,3	183800	50,0
Themse	336	40	k.A.	k.A.	k.A.

2.4.1 Identifizierung und Quantifizierung ausgewählter Zielverbindungen

Während der Analyse einiger Sedimentproben aus den Nordseehäfen fielen insbesondere die chlorierten Aniline, Nitroaromaten, Organophosphorsäureester sowie die Gruppe der polycyclischen Moschusduftstoffe auf, die in allen per GC-MS untersuchten Proben verifiziert werden konnten. Alle eben erwähnten Substanzen sind bereits als Kontaminanten des Rheins und der Elbe bekannt. Des weiteren wurden Untersuchungen zu Belastungen der Nordseesedimente mit Nonylphenol und LAS für die Proben der Stationen KS11, BL2, UE 15, UE 26, WB5 durchgeführt.

2.4.1.1 Aniline, Nitroaromaten und Phosphorsäureester

Innerhalb der abgebildeten Karte (Abbildung 28) für die Deutsche Bucht sind die Probenahmestationen, einer Sedimentprobenahme-Kampagne des Bundesamtes für Seeschifffahrt und Hydrographie, mit einem Kasten markiert. Bei der Probenahme wurden vorwiegend Stationen ausgewählt, die relativ hohe Gehalte an Schlick und Ton aufwiesen, bzw. Stationen die als Belastungsschwerpunkte aus früheren Untersuchungen bekannt waren. Für erste Untersuchungen wurden die Proben ES1, KS11 und UE33 (1-3) ausgewählt.

In der unten folgenden Tabelle 23 werden alle identifizierten Substanzen mit den ermittelten Konzentrationen aufgelistet, sofern diese oberhalb der entsprechenden Bestimmungsgrenzen (BG) lagen. Zum Teil ergaben sich für einzelne Verbindungen hohe Hintergrundbelastungen, wobei Kontaminationen durch die Laborluft nicht zu jedem Zeitpunkt als konstant angesehen werden konnten. Durch die hohen Schwankungen erschien es nicht vertretbar, einen sogenannten Blindwert quantitativ festzulegen und die Konzentration in der Probe durch Subtraktion des kalkulierten Hintergrundwertes zu bestimmen. Die Verbindungen wurden jedoch, mit einem Kreuz

gekennzeichnet, in die Tabelle aufgenommen, da ihre Konzentrationen in den Proben generell die Laborblindwerte deutlich überschritten.

Tabelle 23: Identifizierte Substanzen dreier ausgewählter Nordsee-Sedimentproben. Konzentrationsangaben in µg/kg Trockengewicht (TG)

Substanz	Probe 1 [µg/kg](ES1)	Probe 2 [µg/kg] (KS11)	Probe 3 [µg/kg] (UE33)	Vorkommen im Wasser [95,103-108]
Nitrobenzol	<BG (MS)	4	NN	Rhein /Elbe
1-Chlor-2-nitrobenzol	0,2	<BG	1,1	Rhein /Elbe
4-Nitrotoluol	<BG (MS)	1,3	<BG (MS)	Rhein /Elbe
2-Chloranilin	<BG	<BG	<BG (MS)	Rhein /Elbe
2,5-Dichloranilin	0,73	0,2	<BG (MS)	Elbe, Nordsee
2,4-Dichloranilin	<BG	NN	NN	Rhein /Elbe
2,4,6-Trichloranilin	1,34**	< BG (MS)	< BG (MS)	Elbe, Rhein
2. Isomer (Trichloranilin)	0,7	NN (MS)	NN (MS)	Rhein
2-Chlor-4-nitroanilin	<BG	NN	NN	Elbe
2,6-Dichlor-4-nitroanilin	1,4	NN	NN	Elbe, Rhein
Tri- <i>iso</i> -butylphosphat	☒	☒	☒	Elbe, Rhein
Tri- <i>n</i> -butylphosphat	☒	☒	☒	Elbe, Rhein
Triethylphosphat	☒	☒	☒	Elbe, Rhein
Triphenylphosphat	< BG (MS)	< BG (MS)	NN	Elbe, Rhein
Tris(2-chlorethyl)phosphat	☒	☒	☒	Elbe, Rhein
Tris(2-chlorpropyl)phosphat	< BG (MS)	< BG (MS)	< BG (MS)	Elbe, Rhein
Dimethylphthalat	☒	☒	☒	Elbe / Rhein/ Weser
Diethylphthalat	☒	☒	☒	Elbe / Rhein /Weser
Di- <i>iso</i> -butyl-phthalat	☒	☒	☒	Elbe / Rhein/ Weser
Di- <i>n</i> -butylphthalat	☒	☒	☒	Elbe / Rhein/ Weser
Octylphthalat	☒			Rhein / Elbe
Di(2-ethylhexyl)phthalat*	> 50	> 50	>50	Elbe / Rhein/ Weser

* Die Belastung der Proben mit DEHP überschritt etwaige Hintergrundwerte in allen Proben mindestens um den Faktor 10

** Berechnung ohne Korrektur durch WFR

Mit Nitrobenzol, 1-Chlor-2-nitrobenzol und DEHP konnten drei Kontaminaten in den Nordseesedimenten identifiziert werden, welche auch in der 1999 aktuell erstellten Prioritäten-Liste für die zur Zeit neu entstehende EU-Wasserrahmenrichtlinie enthalten sind.^[113] Das Vorkommen der Nitroaromaten, chlorierten Aniline und der polycyclischen Moschusverbindungen ist für Nordseewasser in der Deutschen Bucht bereits in den Arbeiten von Gatermann und Bester et al.

beschrieben.^[49,109-112] Bei einem Vergleich zwischen der beobachteten Belastung der wäßrigen Phase mit obengenannten Substanzen und anderen organischen Xenobiotika liegen die gemessenen Konzentrationen in Bereichen des α -HCHs. Es handelt sich hierbei insgesamt um organische Spurenstoffe, deren Risikopotential auch schon in geringen Konzentrationen nicht zu vernachlässigen ist (siehe Tabelle 24). So belegen Nitrobenzol und die Stoffgruppe der Monochlornitrobenzole einen sehr hohen Rang in einer für die EU erarbeiteten Liste prioritärer Stoffe für die Erstellung einer Wasserrahmenrichtlinie der EU.^[113] 3-Chlornitrobenzol ist vor allem durch die Problematik, die es für Wasserversorger und Betreiber von Kläranlagen der EU darstellt, auffällig geworden. Da nun die Chlornitrobenzole nicht als reine Einzelsubstanzen in die Umwelt gelangen, ist bei der Auswahl die gesamte Stoffgruppe betroffen.

Tabelle 24: Konzentrationen ausgewählter Nitroaromaten und des 2,5-Dichloranilins in Nordseewasserproben der Jahre 1990, '93 und '95 in [ng/L]

Verbindung	Max. Konzentration im Nordseewasser in [ng/L]		
	1990 ^[110-112]	1993 ^[109]	1995 ^[110-112]
Nitrobenzol		0,5 - 2,5	
1-Chlor-2-nitrobenzol	0,13 - 0,28	0,05 – 0,35	nq – 0,59
1-Chlor-3-nitrobenzol	0,02 – 0,19	-	nq – 0,08
1-Chlor-4-nitrobenzol	0,14 – 0,44	-	nq – 0,61
2,5-Dichloranilin	0,04 – 0,46	-	nq – 0,65

Des Weiteren waren in den Untersuchungen der Nordseewasserproben der Serie 1993 die Verbindungen *O,O,O*-Trimethylthiophosphat (TMTP) und *O,O,S*-Trimethyldithiophosphat (TMDTP) bei den AFID-Messungen besonders aufgefallen, da sie aufgrund der hohen Sensitivität des Detektors einen sehr deutlichen Response zeigten und neben drei, vier weiteren Verbindungen die dominierenden Signale in den Chromatogrammen ergaben.^[114] Deshalb wurden auch diese Substanzen in die Versuche zur WFR aufgenommen. Aufgrund hoher Toxizität ist ihr Vorkommen auch in Sedimenten von Interesse. Es stellte sich aber heraus, daß die Nachweisempfindlichkeit des verwendeten GC-MS für eine Verifizierung der Substanzen im Sediment zu gering war. Über den AFID wurden in der Probe 2 (KS11) Konzentrationen zwischen 0,05 und 0,1 µg/kg TG bestimmt. Es muß an dieser Stelle angemerkt werden, daß heutzutage Untersuchungen, die einzig und allein mit Hilfe des GC-AFID durchgeführt wurden, infolge der zahlreichen möglichen Signal-Überlagerungen als unzureichend angesehen werden. Das Vorkommen der Thiophosphate kann aber speziell in der Sedimentprobe 2, die noch starken Elbe-Einflüssen unterliegt, als wahrscheinlich angesehen werden. In der Elbe, Mulde und dem Hamburger Hafen wurde vor allem TMDTP, aber auch TMTP im Sediment und zum Teil in Schwebstoffextrakten nachgewiesen.^[35] Da es sich hierbei jedoch um Screening-Untersuchungen handelte, wurden keine Angaben zu Konzentrationen veröffentlicht. Generell wurden zumeist, wahrscheinlich produktionsmengenabhängig, höhere Gehalte für TMDTP als für TMTP bestimmt. In der Nordsee wurden 1991 Gehalte zwischen <70-1400 pg/L und ein Rückgang der Konzentrationen für 1993 auf 1-470 pg/L für die Verbindung TMTP festgestellt. Für TMDTP wurden 1991 100-9400 pg/L und 1993 nur noch 2-100 pg/L erhalten. Es wird angenommen,

daß die Thiophosphate als Nebenprodukte bei der Synthese von phosphorganischen Pestiziden entstehen. Da in den Jahren nach der deutschen Vereinigung die Herstellung der genannten Stoffe in der Region Bitterfeld eingestellt wurde, konnte zugleich auch eine Abnahme ihrer Konzentrationen und ihrer produktionsbedingten Verunreinigungen festgestellt werden.^[106,115,116,117]

Die Substanzklasse der Phthalate und der trialkylierten Phosphorsäureester werden lediglich tabellarisch aufgeführt. Auch wenn die gemessenen Konzentrationen teilweise weit über den Hintergrundwerten lagen, erschien es durch die bereits erwähnte Schwankungsbreite der Blindwerte nicht sinnvoll, Werte zu berechnen. Phthalate sind weit verbreitete und vielfach untersuchte Umweltkontaminanten. Sie konnten durchgängig in allen Proben nachgewiesen werden. Eine weitergehende Diskussion erfolgt im Kapitel 3.4.8.

Die Verbindungen Tris(2-chlorethyl)-phosphat (TCEP) und Tris(2-chlorpropyl)-phosphat (TCPP) stellen sogenannte Alternativen zu den in den letzten Jahren viel diskutierten polybromierten Biphenylethern und PCB dar und werden als Flammschutzmittel eingesetzt. Gleichzeitig zeigen TCEP und TCPP, wie auch die trialkylierten Phosphorsäureester und Phthalate, gute Wirkungen als Weichmacher in Polyurethanschäumen, in Bauteilen für Kraftfahrzeuge sowie Lacken und Farben. Die Jahresproduktion von TCEP betrug schon 1986 in der Bundesrepublik ca. 4000-5000 t.^[118] Die Anreicherung im Sediment zeigt neben hohen Wasserkonzentrationen die Umweltrelevanz dieser Verbindungen.

2.4.1.2 Moschusduftstoffe

Bereits die Analyse der Sedimentproben aus den Nord- und Ostseehäfen hatte gezeigt, daß in allen die polycyclischen Moschusverbindungen (PCM) nachweisbar waren. Das Vorkommen dieser Substanzklasse wurde mittlerweile in zahlreichen Biota-Untersuchungen bis hin zur Muttermilch von Rimkus et al. beschrieben.^[20] Erstmalig analysiert wurde die Nachfolgegeneration der Nitromoschus-Duftstoffe von Eschke et al. 1994 im Ruhrwasser.^[21] Für die Elbe wurden während einer non-target-Untersuchung der Elbwasserproben 1992-94 Galaxolid und Tonalid auffällig. Franke et al. analysierten die Substanzen zusammen mit weit über 250 anderen organischen Chemikalien in Elbe und deren Nebenflüssen.^[103]

Aus veröffentlichten Daten für Belastungen von Oberflächengewässern mit PCM läßt sich ableiten, daß zumeist höhere Konzentrationen in der Nähe von kommunalen Kläranlagen gefunden werden. Im Gegensatz zu den weiter oben erwähnten Industriechemikalien werden Moschusverbindungen hauptsächlich durch die Verwendung von Haushaltsreinigern, Kosmetika, parfümhaltigen Waschlotionen und vor allem Waschmitteln in die Umwelt eingetragen. Die Untersuchungen von Eschke et al. 1994 und 95 zeigten eine deutliche Abnahme der PCM-Konzentration in der Ruhr mit wachsender Entfernung zu einem Klärwerksabfluß^[21,119]. Im Mittel wurden Konzentrationen mit 200 ng/L für Tonalid und 400 ng/L für Galaxolid gemessen, allerdings wurden wesentlich höhere Konzentrationen mit 1100 ng/L (Faktor 5) in Höhe eines Klärwerks erhalten. Gleiches wurde von Gatermann für die Nitromoschusverbindungen in der Elbe festgestellt.^[19,120] In der Arbeit von Bester et al. zeigte sich durch Vergleich der Konzentrationen im

Nordseewasser mit einer Elbe-Station (Stade) bereits ein starker Verdünnungseffekt in bezug auf eine Belastung mit HHCB und AHTN (Stade: 95 bzw. 67 ng/L).^[112]

Nach dem freiwilligen Anwendungsverzicht der europäischen parfümherstellenden Industrie für die Verbindung Moschus-Xylol (MX) stieg insgesamt die Produktionsmenge, und damit auch Verbrauchsmenge, der als weniger toxisch geltenden polycyclischen Moschusduftstoffe. Mittlerweile spiegelt sich dies auch deutlich in den Ergebnissen der Rückstandsanalytik von Oberflächengewässern wider. Insgesamt kann über den Zeitraum von 1990 bis 1995 eine deutliche Zunahme der Gewässerbelastung für Galaxolid (Faktor 2-5) und auch Tonalid (Verdopplung) festgestellt werden (Tabelle 25).

Tabelle 25 : Konzentrationen von HHCB und AHTN in Nordseewasserproben der Jahre 1990, '93 und '95

Verbindung	Max. Konzentration in Nordseewasser in [ng/L]		
	1990 ^[110-112]	1993 ^[109]	1995 ^[110-112]
Galaxolid	0,09 – 0,88	nq – 2,8	0,17 – 4,8
Tonalid	0,09 – 0,94	nq – 0,8	0,08 – 2,6

Die Datenlage zu Belastungen der Sedimente ist immer noch unbefriedigend. Während eines Umweltmonitorings des Landesamtes für Ökologie in Niedersachsen wurden 1996 erste orientierende Untersuchungen von Gewässersedimenten auf Rückstände der Polycyklen unternommen. In dieser Studie wurden auch zwei Sedimentproben der Elbe untersucht, wobei Konzentrationen für Galaxolid von 9,6 und 31 µg/kg TG, für Tonalid lediglich 0,7 und 3,8 µg/kg TG ermittelt wurden.^[121] In der bereits zitierten Arbeit von Eschke et al. wurden Gehalte in Sedimenten der Ruhr von 150 bis 300 µg/kg TG für AHTN und HHCB bestimmt.

Wie zu erwarten, liegen die Belastungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Nordseesedimente ermittelt wurden, deutlich niedriger (Tabelle 26).

Tabelle 26: Galaxolid- und Tonalidkonzentrationen in µg/kg, analysiert in Nordsee-Sedimenten

Substanz	Probe 1 [µg/kg] (ES1)	Probe 2 [µg/kg] (KS11)	Probe 3 [µg/kg] (UE33)
Galaxolid	15	< BG	7,6
Tonalid	10	< BG	6

Die Probe 1 (ES1) ist mit 15 µg/kg für Galaxolid und 10 µg/kg für Tonalid ist zehnmal niedriger belastet als die publizierte Konzentrationen in der Ruhr, liegt aber erstaunlicherweise noch in der Nähe der Werte, die 1996 für die Elbe ermittelt wurden.

Für einen allgemeinen Überblick sind die in der Literatur erhältlichen Analyse-Daten für Sedimente und Schwebstoffe in Tabelle 27 aufgeführt. In der Elbe, Nähe Magdeburg, konnten Winkler et al. Schwebstoff-Konzentrationen für Tonalid im Bereich von 190 - 770 µg/kg TG und für Galaxolid zwischen 150 bis 740 µg/kg TG messen.^[122] Betrachtet man die Werte genauer, wird ersichtlich, daß gemessene Konzentrationen beider Verbindungen etwa in der gleichen Größenordnung liegen,

während die Konzentrationen im Wasser die vermeintlichen Produktionsmengen in Relation widerspiegeln, d.h. es werden deutlich höhere Konzentrationen für Galaxolid erhalten. Die in der Literatur für beide Substanzen angegebenen $\log K_{ow}$ bzw. $\log K_{OC}$ -Werte erklären dieses Verhalten nicht bzw. nur unzureichend. Eine mögliche Erklärung bestünde in einer stärkeren Adsorption an Partikeln in der aquatischen Umwelt für Tonalid.

Tabelle 27: Polycyclische Moschusverbindungen in Sediment

Probe	Anzahl (n)	HHCB [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	AHTN [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Jahr	Literatur
Sediment (Elbe)	2	9,6/31	0,7/3,8	1996	[121]
Sediment (Weser)	2	2,1/9,7	< 0,5	1996	[121]
Sediment (Ems)	2	< 0,5	< 0,5	1996	[121]
Sediment (Leine)	1	54	3,9	1996	[121]
Sediment (Oker)	1	4,7	< 0,5	1996	[121]
Sediment (Ruhr)	1	0,15 - 0,3	0,15-0,3	1995	[119]
SPM (Magdeburg, Elbe)	31	148 - 736 MW 440	194-770 MW 468	1996/97	[122]
SPM (Hessen)	13	78 - 2723 MW 460	91-3211 393	1996	[123]
SPM (Schwarzbach, Rodau)	13	897 - 13722 MW 2641	544-12666 MW 2948	1996	[123]
SPM (Rhein)	14	50 - 160 MW 80	100-540 MW 270	1994-96	[124]
SPM (Rhein, Meuse)	14	50-580 210	60-1200 710	1994-96	[124]

Eines der möglichen Folgeprodukte des HHCB wurde in einer niederländischen Studie zur Abschätzung möglicher Umweltrisiken durch Galaxolid und Tonalid als Lacton-Isomer identifiziert.^[125] C. Meyer et al. identifizierten das etwas hydrophilere Transformationsprodukt erstmalig in Elb- und auch Oderwasser-Proben. Durch freundlicherweise zur Verfügung gestelltes Referenzmaterial war es im nachhinein auch in den Nordseesedimenten möglich, das erwähnte Lacton zu identifizieren.

Eine Quantifizierung erfolgte nicht direkt, die Konzentration wurde lediglich über die Ionenspuren des Galaxolid-Standards rückwirkend abgeschätzt. Interessant erscheint dagegen, daß für HHCB-ON durch die „Abschätzung“ ein deutlich höherer Wert erhalten wurde als für die Muttersubstanz selbst. zur Absicherung dieses Befundes sind weitere Versuche zur WFR und ergänzende quantitative Analysen erforderlich.

2.4.1.3 Nonylphenol, Nonylphenolmonoethoxylat und optische Aufheller

Bereits im Abschnitt 2.3.3 erfolgte eine Besprechung der von der Arbeitsgruppe Giger ermittelten Gehalte für die Nonylphenole und optischen Aufheller in Parallelproben der Sedimentprobenserie 2 aus Nord- und Ostseehäfen. Hier soll vergleichend die Datenlage um einzelne Nordsee-Stationen erweitert werden, da die Sedimente aus den Sportboothäfen auch in bezug auf diese Substanzklassen als lokal belastet angesehen werden müssen.

Es wurden insgesamt 5 weitere Nordsee-Sedimentproben ausgewählt und auf Rückstände von NP, NP1EO, DAS1, DSBP und BLS analysiert, wobei unter anderem auch eine Parallel-Probe zu

Probe 2 (Station KS11) untersucht wurde. Entsprechend potentieller Belastungsschwerpunkte wurde für die küstennahe Station KS 11 mit 55 µg/kg TG der höchste Wert erhalten, der sich deutlich von den gemessenen Konzentrationen für die 4 weiteren Proben abhebt. Lediglich für die Station WB5 konnte noch ein Wert oberhalb der Bestimmungsgrenze ermittelt werden, während Nonylphenolmonoethoxylat in keiner der untersuchten Proben quantifiziert werden konnte.

Tabelle 28: NP und NP1EO in µg/kg TG in Sedimenten aus der Deutschen Bucht

Nordseestation	NP	NP1EO
(KS11)	55	< 10
(BL2)	< 10	< 10
(UE15)	< 10	< 10
(UE26)	< 10	< 10
(WB 5)	13	< 10

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß sich die Konzentrationen aller untersuchten Zielverbindungen zumeist an bzw. unterhalb ihrer Bestimmungsgrenzen bewegten. Wesentlich dominanter erschienen andere Komponenten: Um mehrere Größenordnungen höher sind die Gehalte an PAH, Alkylbenzole bzw. allgemein KW, aber auch an chlorierten Benzolen. Da es Zweck der Untersuchung war, möglichst sowohl Zielkomponenten im Spurenbereich als auch eine große Vielfalt an weiteren Substanzen mit einer Analysenmethode in den Nordseesedimenten zu erfassen, wurden die Hauptkomponenten in der jeweiligen Fraktion soweit als möglich per GC-MS aufgeklärt.

2.4.2 Ergebnisse der Screening-Untersuchung

Im Hinblick auf angestrebte Verfahren toxizitätsgeleiteter Analysen, die gleichermaßen auf die sehr sensiblen Bereiche der Küstengewässer und marine Sedimente angewendet werden sollen, wurde erstmals ein Screening für drei Nordseesedimentextrakte durchgeführt. Dadurch sollte zunächst ein näherer Einblick in die Belastungssituation und in das Verteilungsmuster biogener und anthropogener Stoffe gewonnen werden.

Es war zu erwarten, daß die sehr dominanten Substanzklassen der größeren Flußsysteme, wie Elbe, Rhein, aber auch Weser und Ems, in den Nordsee-Sedimenten vertreten sind. Dementsprechend konnten, wie auch schon die Target Analysen zeigten, „klassische Schadstoffe“ identifiziert werden, welche aus den vergleichsweise stark belasteten Flüssen eingetragen wurden.

2.4.2.1 Vorgehensweise bei der Identifizierung

Die im folgenden aufgeführten Substanzvorschläge sind vorwiegend Ergebnisse aus Massenspektren-Bibliotheksrecherchen, die unter Verwendung unterschiedlicher Software erzielt wurden. Verbindungen wurden den entsprechenden Spektren zugeordnet, sofern eine hohe Übereinstimmung der Proben-Spektren mit denen der vorhanden Vergleichsbibliotheken erhalten wurde. Hierbei wurde eine Rangordnung in Abhängigkeit der Parameter „Fit-Faktor, Refit und Purity“ für das Arbeiten mit der Magnum-Software, respektive NIST und PEST Bibliotheken angewendet. Der

„Fit-Faktor“ kennzeichnet dabei die Güte der Übereinstimmung des Bibliothekspektrums mit dem Probenspektrum, der „Refit-Faktor“ wiederum die umgekehrte Übereinstimmung und die Angabe „Purity“ entspricht der Reinheit des Analyse-Spektrums. Generell wird ab dem Faktor > 600 eine hohe Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung angenommen, bei einer Bandbreite 0 – 1000. Für das Arbeiten mit der „Masslib-Software“ wurde als Kriterium die prozentuale Identitätsangabe gewählt, wobei die Überschreitung von 70 Prozent als ein Hinweis auf das Vorhandensein der Substanz gewertet wurde, sofern die erhaltenen Massenfragmente in sich auch plausibel erschienen. Allerdings kann durchaus ein Spektrum mit geringerer prozentualer Deckung korrekt zugeordnet sein, so daß in Einzelfällen Untergrund und Struktursignale genau interpretiert werden müssen. Ferner sind sinnvolle Retentionszeiten (Flüchtigkeit der Substanz) und, durch die Fraktionierung der Extrakte, auch die Polarität der Komponenten als Kriterium zu berücksichtigen.

Die beschriebene Technik zur Identifizierung kann als Hinweis auf das Vorhandensein einer Verbindung in der Probe gesehen werden, jedoch nicht als Beweis. Innerhalb einer anderen Studie zur Identifizierung organischer Xenobiotika in Probenmatrix konnten auf die beschriebene Weise verschiedene Labore in einem Ringversuch vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse erzielen.^[126] Insgesamt wurde bestätigt, daß diese Methoden geeignet sind, Umweltproben auf unbekannte organische Inhalte zu untersuchen. Sinnvollerweise sollte jedoch nach der oben beschriebenen Identifizierung eine Verifizierung mit Hilfe von Referenzmaterial folgen. Dies wird in der Regel jedoch nur für eine beschränkte Auswahl an Verbindungen möglich sein, wobei projektorientierte Auswahlkriterien heranzuziehen sind. Im Hinblick auf die angestrebte Kombination derartiger chemischer Untersuchungsmethoden mit toxikologischen Testverfahren wurde in der vorliegenden Arbeit ein Augenmerk auf die strukturelle Zusammensetzung bzw. die funktionellen Gruppen der Kontaminanten gelegt. Interessant erschien z.B. das Vorkommen von Nitrogruppen, die aus toxikologischer Sicht meist potentielle Kanzerogene darstellen. Des weiteren galt die Aufmerksamkeit Phenolen, halogenierten Verbindungen, aber auch toxischen Vertretern der PAH. Sofern Referenzmaterial zugänglich war, wurden die identifizierten Substanzen durch Retentionszeitenvergleich bzw. Standardadditionsverfahren verifiziert.

Neben der Zuordnung von Verbindungsstrukturen zu einzelnen Signalen sollten besonders belastete Fraktionen eingehender analysiert werden. Zur Illustration dieses Aspektes sind für ausgewählte Fraktionen Chromatogramme wiedergegeben. Sofern es möglich war, sind den dominierenden Signalen Strukturvorschläge oder die für dieses Spektrum signifikanten Massenfragmente zugeordnet. Die gesamte Untersuchung unterlag einer hohen Limitierung durch das verwendete Massenspektrometer. Es wurde in Massenbereichen < 100 insgesamt ein sehr hoher Untergrund festgestellt. Dies war zum Teil durch Silikon-Zusätze der Septen bedingt, die in den für die Probenaufbewahrung benutzten Vials, aber auch in Septen des Injektor-Systems eingesetzt wurden. Daraus resultierte letztendlich eine stark verringerte Nachweisempfindlichkeit des Gerätes. Infolgedessen wurde davon abgesehen, Massen kleiner 100 aufzunehmen, wodurch die Spektreninterpretation stark eingeschränkt bzw. für einige Verbindungsklassen eine Erkennung und Zuordnung unmöglich war. Dies betraf insbesondere die Substanzklasse der *n*-Alkane, niedrigsiedende Halogenalkane und Aromaten, wie beispielsweise die toxikologisch nicht unwichtigen Xylole und Ethylbenzol. Selbst für Komponenten wie Moschus-Xylol, deren charakteristische

Massenfragmente weit größer sind (282), fällt die Zuordnung häufig schwer, da für eine Spektrenanalyse mehrere Zerfallsprodukte notwendig sind.

2.4.3 Identifizierte Substanzgruppen aus Nordseesedimenten

Für die analysierten Nordsee-Sedimentproben zeigte sich, daß selbst nach Fraktionierung der Sedimentextrakte außerordentlich komplexe Zusammensetzungen mit einem hohem Anteil biogener, geogener und petrogener Komponenten erhalten werden. Biogene Substanzgruppen wie mono-, di-, triterpenoide Verbindungen, Fettsäuren, Wachsester, Alkohole, Ether, Aldehyde, Ketone, Sulfide, Amide, Pyridine, Pyrimidine, Purine und Nitrile sind in Sedimenten mannigfaltig vorhanden.

Für viele Substanzen, die als Naturstoffe vorkommen, sind ebenso anthropogene Einträge möglich. Vielfach ist dabei die Quelle nur schwer zuzuordnen. Beispielsweise sind aliphatische und polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe ubiquitär vorhanden. Sie sind typische Bestandteile von Roh- bzw. Erdölen und deren Destillationsprodukten den Mineralölen. Biogene Muster der aliphatischen KW sind durch das Vorkommen ungerader Kohlenstoff-Kettenlängen gekennzeichnet, so daß über sogenannte „Biomarker“ zum Teil eine Klärung der Frage „biogen/anthropogen“ möglich ist. Derartige biogene Einträge lassen sich auf terrestrische Pflanzen, zahlreiche marine Algen, Kleinstorganismen und ebenso auf bakterielle Stoffwechselprozesse zurückführen. Eine natürliche Produktion der PAH erfolgt bei der Bildung von Erdölen (petrogene PAH). Die hier untersuchten Sedimentproben wiesen eine Vielzahl unterschiedlicher aromatischer Komponenten sowie hohe Konzentrationen alkylierter PAH auf. Die Herkunft der PAH ist im Groben zwei Eintragungspfad zuordnen :

- a) **Verbrennungsprozesse:** Die Zusammensetzung der PAH aus Verbrennungsprozessen sind in charakteristischer Weise dominiert durch thermodynamisch stabile, nicht alkylierte Verbindungen. Des weiteren treten zumeist hohe Gehalte an 4- und 5-Ring-Aromaten auf.
- b) **Mineralöle:** PAH petrogener Einträge weisen grundsätzlich besonders hohe Konzentrationen alkylierter (2- u. 3-Ring) Aromaten auf. Insgesamt überwiegen in den Gemischen 1- und 2-Ring Aromaten. Typischerweise sind Naphthalin und auch Methylnaphthaline in hohen Konzentrationen vorhanden. Zudem finden sich in Mineralölen entstehungsbedingt verschiedene aromatische Heterocyklen (S, N, O), wie z.B. Dibenzothiophene und entsprechende alkylierte Isomere.

Den polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und alkylierten Benzolen kam im Rahmen der Aufgabenstellung dieser Arbeit nur geringe Bedeutung zu. In einzelnen Fraktionen waren sie jedoch in beachtenswerten Konzentrationen vorhanden, und damit wurden sie als signifikante Inhalte der Sedimentextrakte als Ergebnis des Screenings in Tabelle 29 aufgelistet und zugeordnet, sofern dieses bei der hohen Anzahl verschiedener (Struktur)-Isomere möglich war.

In allen drei Proben erschien der Anteil an unterschiedlich stark substituierten C₂- und C₃-Ring-Aromaten besonders hoch. Im semiquantitativen Vergleich der ermittelten Gehalte an Naphthalin, Phenanthren und Anthracen mit denen der für die Verbrennungsprozesse typischen Vertreter Pyren

und Fluoranthen waren für die letztgenannte Gruppe nur sehr geringe Konzentrationen vorhanden. Schwartzbauer verifiziert bereits für Elbesedimente eine charakteristische Abfolge homologer Reihen methylierter und höheralkylierter PAH.^[35] Für die Nordseesedimente im Einflußbereich der Elbe wurde ein ähnliches Muster gefunden. Die folgenden Abbildungen verdeutlichen die Vielzahl der vorhandenen alkylierten PAH. Dargestellt sind die charakteristischen Ionenspuren und Massenspektren für die omnipräsenten 1-3-Ring-Aromaten.

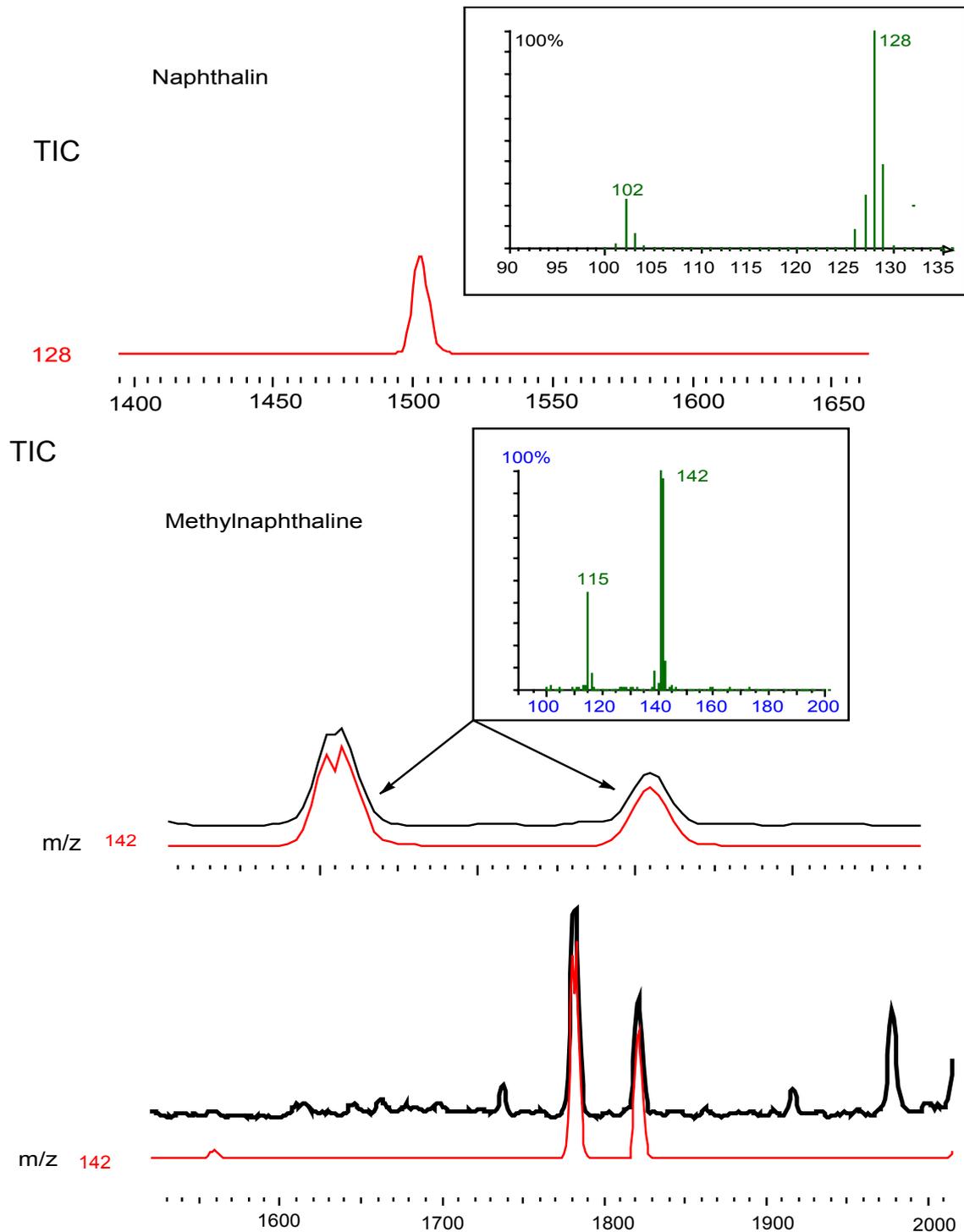


Abbildung 29: Charakteristische Chromatogramme (Ionenspuren) der in den Nordseesedimentproben dominierenden PAH (I)

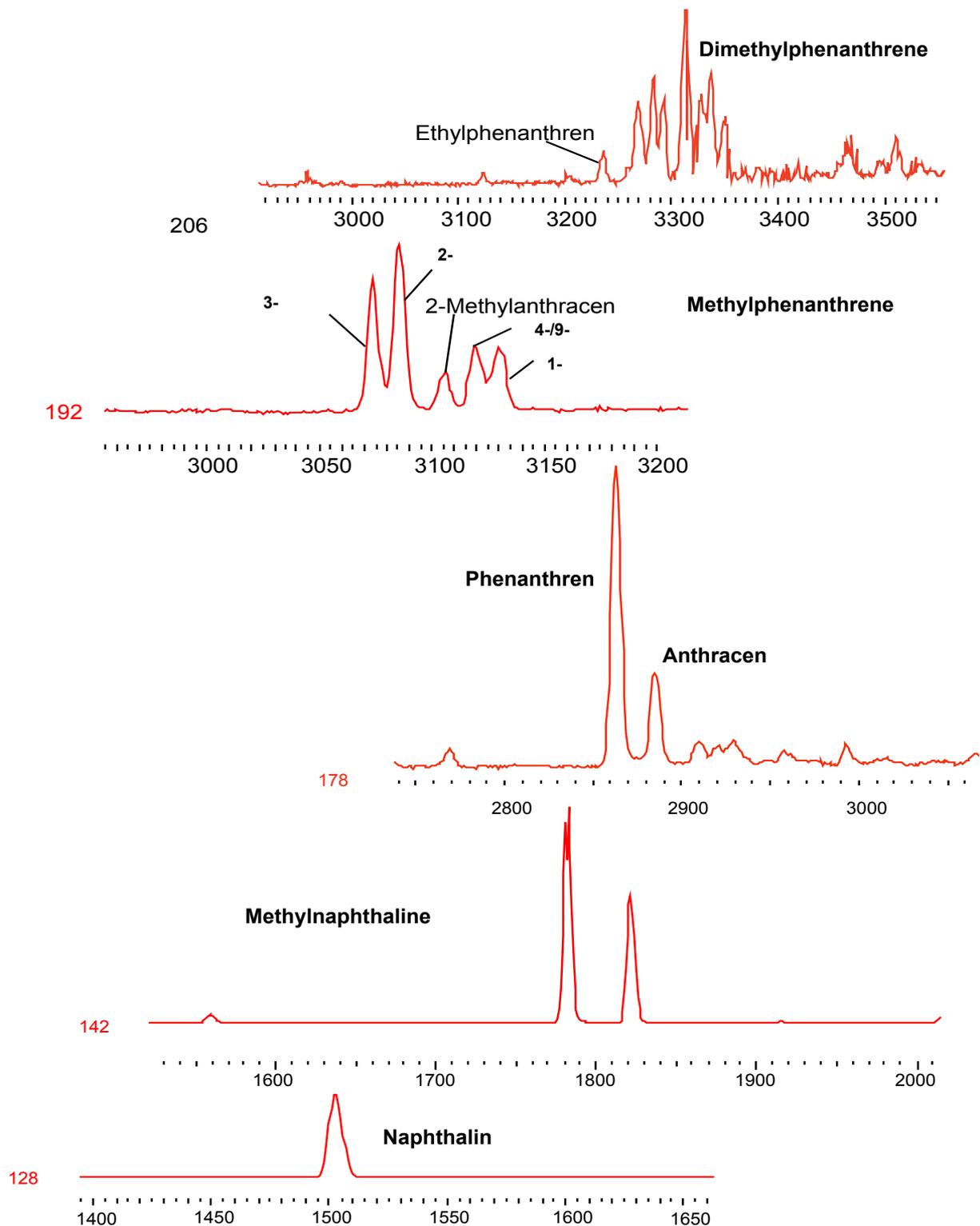


Abbildung 30: Charakteristische Chromatogramme (Ionenspuren) der in den Nordseesedimentproben dominierenden PAH (II)

Die dominierende Belastung durch PAH ist für die Analyse geringerkonzentrierter organische Spurenstoffe sehr problematisch. Einzige Ausnahme bildeten halogenierte Kohlenwasserstoffe vergleichbarer Lipophilie, deren Zuordnung aufgrund der auffälligen Chlor- bzw. Brom-Substitutionsmuster einfach vorgenommen werden kann. Generell würde eine Abtrennung der PAH (bzw. der KW allgemein) eine Charakterisierung weiterer Inhaltsstoffe für die Fraktionen 1-3

erleichtern. Des Weiteren konnten in allen Proben zahlreiche, in unterschiedlichem Grade alkylierte Thiophene und Thiazole zugeordnet werden. Diese Substanzen sind ebenso zum Großteil biogenen Ursprungs, da die Erdölentstehung und damit auch die organischen Schwefelverbindungen hauptsächlich auf bakterieller Zersetzung organischer Stoffe beruht. Die Grundstrukturen der häufigsten Organoschwefelverbindungen in den Sedimenten zeigt Abbildung 31.



R= Alkylketten unterschiedlicher Länge

Abbildung 31: Strukturen der in allen Nordseesediment-Proben analysierten Thiophene und Thiazole, mit unterschiedlichen Alkylresten substituiert

Ferner wurden eine Reihe verschiedener stickstoffhaltiger Basen (Pyrimidine, Pyridine, Indole und Chinolin-Derivate) detektiert, die sehr wahrscheinlich ebenso petrogenen bzw. biogenen Quellen entstammen. Pyridin findet sich zu 0,1 % im Steinkohleteer und ist - wie auch Pyrimidin, Purin und Indol - wichtiger Baustein verschiedener Naturstoffe. Indol ist Abbauprodukt des in den meisten Proteinen enthaltenen Tryptophans und kommt neben weiteren Transformationsprodukten u.a. in Fäkalien vor.

In Fraktion 4 des Sedimentproben-Extraktes Probe 3 wurde für eines der dominanten Signale, bei hoher Übereinstimmung des erhaltenen Massenspektrums mit den MS-Bibliotheksspektren, 5,5-Dipropylbarbital vorgeschlagen (Abbildung 32). Die Struktur entspricht dem Grundgerüst der Barbitursäure und ist demnach ein Pyrimidinabkömmling, das auch als Ureid bezeichnet wird. Auch hier zeigen sich wiederum Verknüpfungen biogener Quellen und anthropogener Anwendungen, denn etwa 20 Derivate der Barbitursäure werden als Schlafmittel eingesetzt. Sie unterscheiden sich, chemisch gesehen, lediglich durch unterschiedliche Substituenten an der C⁵-Position. Die folgende Abbildung zeigt einige bekannte Beispiele der Narkotika. Toxikologisch gesehen, haben Barbiturate in dreierlei Hinsicht Bedeutung erlangt: Sie sind die am häufigsten zum Selbstmord mißbrauchten Arzneimittel, bei Überempfindlichkeit lösen sie Allergien aus und zudem kann bei häufigem Gebrauch eine Abhängigkeit auftreten. Für das Vorkommen des identifizierten 5,5-Dipropylbarbitals in marinen Sedimenten wird allerdings nach Meinung der Autorin kein Zusammenhang zu Pharmarückständen gesehen. Die Wahrscheinlichkeit des biogenen Ursprungs als Pyrimidinverbindung erscheint hier realistischer. Das Screening der Probenfraktionen wurde unter dem Gesichtspunkt durchgeführt, Rückstände unterschiedlichster anthropogener Einträge (Industriechemikalien, Pharmazeutika, Pestizide) ausfindig zu machen. Folgerichtig wurden auch eine Reihe von Substanzen gefunden, die diesen Anwendungsbereichen zuzuordnen sind. Allerdings muß im Moment offenbleiben, ob das Vorkommen in den marinen Proben auf anthropogene oder eher auf biogene Ursprünge zurückzuführen ist.

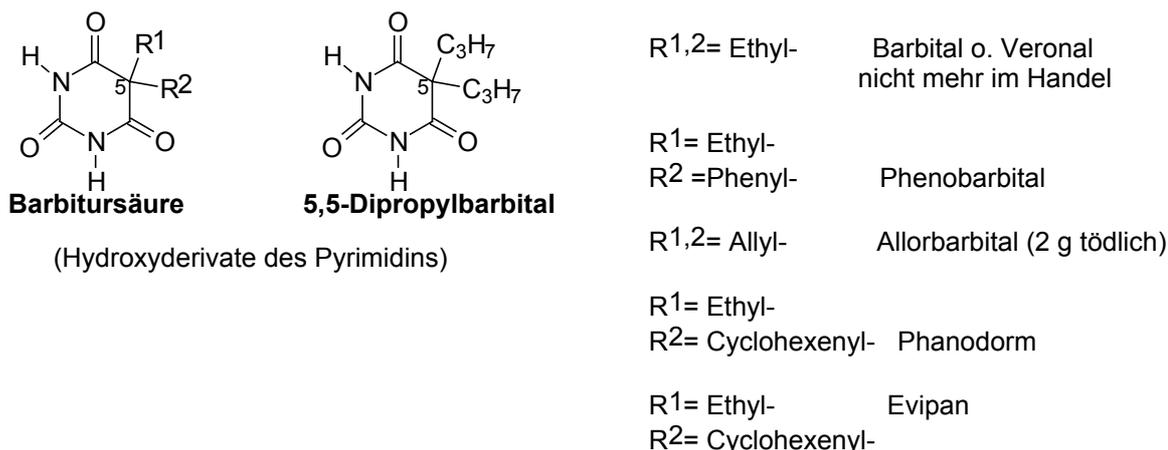


Abbildung 32: In den Nordseesediment-Proben gefundene Barbitursäure-Derivate

Als weitere Vertreter sollen an dieser Stelle eine Reihe terpenoider Verbindungen beschrieben werden. Als Vertreter der monocyclischen Terpene fiel der Blick vor allem auf β -Jonon, β -Cyclocitral und auch Limonen. Insbesondere die erstgenannten beiden Verbindungen weisen eine strukturelle Verwandtschaft zu Carotinoiden auf und finden breite industrielle Verwendung als Zusätze in Duft- und Aromakompositionen. Die Extrakte wurden ebenso auf mögliche Rückstände von α -Terpineol untersucht, da diesem aufgrund seiner hohen Toxizität besonderes Interesse galt. Allerdings deutet nichts auf meßbare Gehalte an dieser Verbindung hin. Mit *endo*-Methylborneol war aber ein Vertreter der Bornangruppe meßbar. Zusätzlich fiel mehrfach der Verdacht auf Campher-Derivate, die jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Calamenen und Cadalen (1-Methyl-ethyl-1,6-dimethylnaphthalin) gehören wiederum zu den sesquiterpenoiden Verbindungen und wurden in zwei der drei Proben nachgewiesen (Abb. 32). Eines der wichtigsten tricyclischen Diterpene bildet die Abietinsäure, woraus letztendlich in Sedimenten häufig vorkommendes Reten (1-Methyl-7-*iso*-propylphenanthren) entsteht. Reten ist in Sedimenten der Elbe und deren Nebenflüssen ubiquitär vorhanden, konnte allerdings nicht sicher in den Nordseeproben zugeordnet werden.^[35] Ferner trat ein weiteres Derivat der Abietinsäure auf: Die Vorschläge der Spektren-Bibliotheken entsprachen der Dehydroabietinsäure. Im Labor läßt sich diese zusammen mit der Tetrahydroabietinsäure in einer Disproportionierungsreaktion beim Erhitzen mit Palladium auf Aktivkohle aus der Harzsäure darstellen. Die Natriumsalze der erhaltenen Säuren dienen als Emulgatoren bei der Herstellung von Tieftemperaturkautschuk. Im übrigen ist das Vorkommen von Triterpenen wie der Hopanoide, die sich vom Squalen ableiten, in Sedimenten nicht ungewöhnlich.^[127] Die Gesamtmenge der v.a. in jüngeren Sedimenten (Ölschiefer, Alter bis zu 500 Mio. Jahren) enthaltenen Hopanoide beträgt ca. 10^{12} t. Damit stellen sie die neben Cellulose mengenmäßig bedeutendsten organischen Substanzen auf der Erde dar.¹²⁸ In den lipophilen Fraktionen konnten dementsprechend eine Reihe von MS-Spektren dieser Gruppe zugeordnet werden. In enger struktureller Beziehung zum Squalen stehen, als Umwandlungsprodukte der mono- bis pentacyclischen Triterpene, die Steroide. Neben der biochemischen Bedeutung, u.a. durch hormonelle Funktionen (Androgene, Östrogene), wird dieser Gruppe mittlerweile auch unter dem Gesichtspunkt „Umweltschadstoffe“ (Xenoöstrogene) zunehmend mehr Aufmerksamkeit entgegengebracht. In Abwasserproben und in der Nähe von

Klärwerksabflüssen werden sie in hohen Konzentrationen nachgewiesen. Sie stehen aufgrund ihrer hormonellen Wirksamkeit unter dem Verdacht, die aquatischen Organismen zu schädigen. Generell sollten sich durch das methodische Clean-up (GPC) Verbindungen mit molaren Massen > 400 nicht in den Fraktionen befinden. Indes entsprachen viele Spektren den Grundgerüsten des Cholestan oder Ergostan, und damit wurden zum Teil auch molare Massen von etwas über 400 identifiziert.

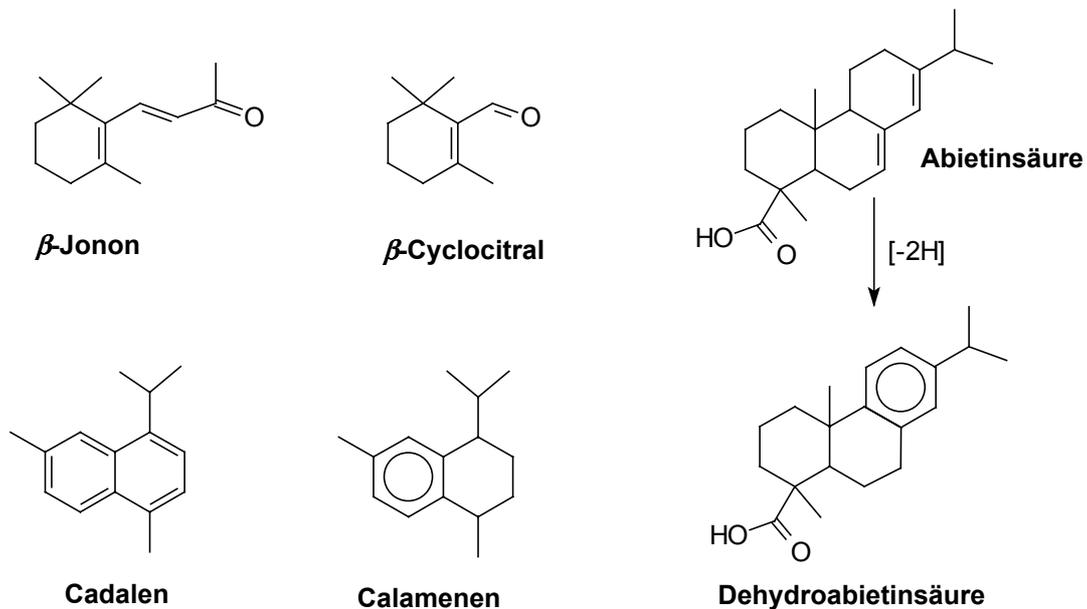


Abbildung 33: Terpenoide Verbindungen, die in einzelnen Nordseesediment-Proben zugeordnet wurden

Interessant erschien im besonderen bei der Analyse der Sedimentprobe 3 das Auftreten einiger bromierter Verbindungen, zum Teil in dominierenden Konzentrationen (Abb. 33). Für die Proben 1 und 2 konnte ein Isomer der Bromphenole identifiziert werden: Mit Konzentrationen zwischen 10 und 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TG gehört es in den eher polaren Fraktionen 5 und 6 zu den auffälligen Signalen. Für Probe 3 deutete sich dagegen an, daß einzelne bromierte Verbindungen in den Fraktion 3 und 4 Hauptkontaminanten darstellten.

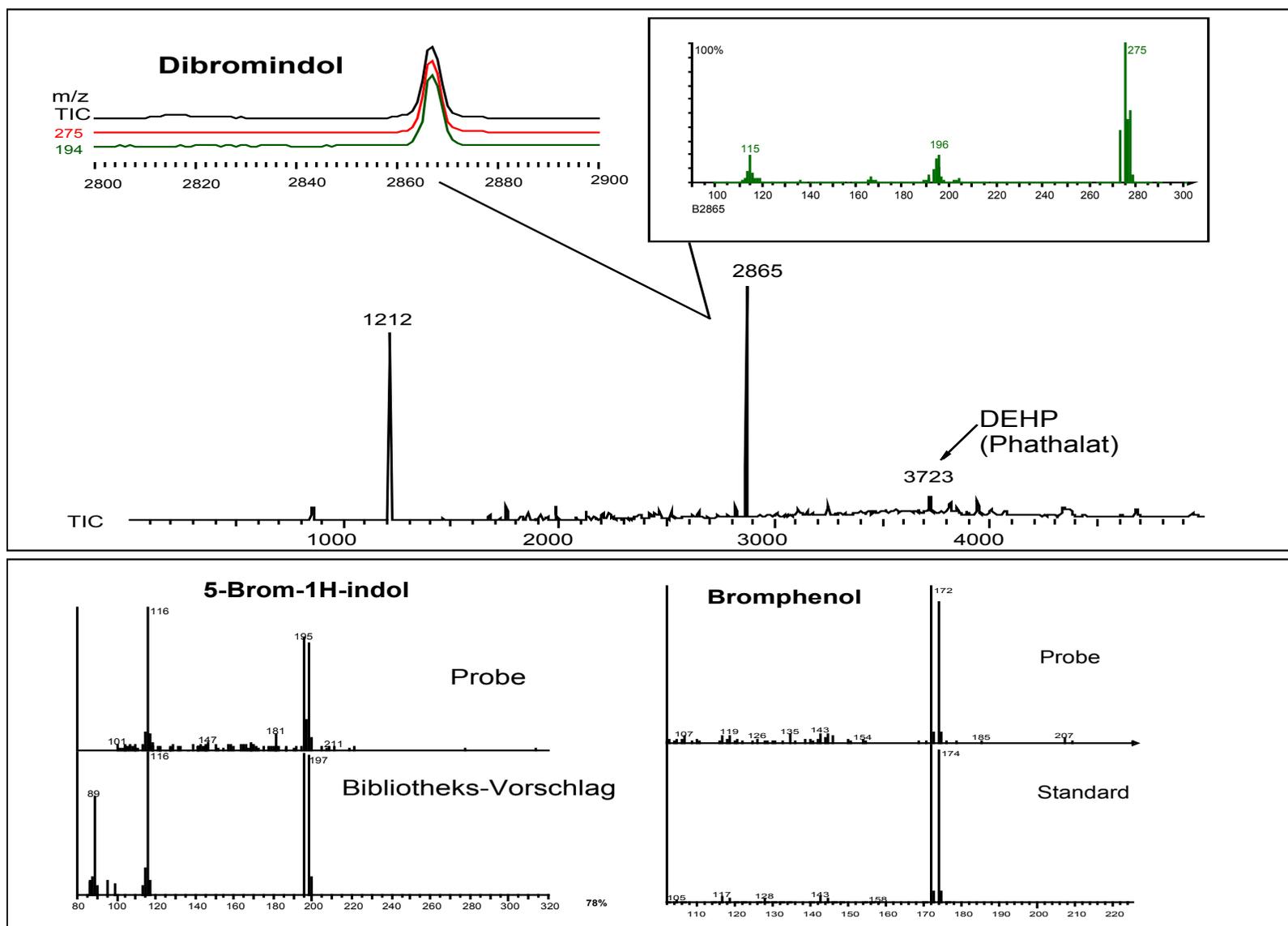


Abbildung 34: Chromatogramm und MS-Spektren bromierter Verbindungen der Sedimentprobe 3 (UE33)

Für das in allen drei Proben nachweisbare Bromphenol galt es aufzuschlüsseln, welches Isomer vorliegt. Jedoch konnte selbst durch Vergleich mit Referenzmaterial nicht abschließend festgelegt werden, ob es sich bei der Verbindung um 3- oder 4-Bromphenol handelt, da die beiden Isomere auf der verwendeten Säulenphase koeluierten. Sofern das Bromphenol anthropogenen Ursprungs ist, sollte es sich höchstwahrscheinlich um das 3-Bromphenol handeln, denn dies überwiegt mengenmäßig durch seine industrielle Verwendung (Flammschutzmittel bzw. Nebenprodukt der organischen Synthese). Ein biogener Zusammenhang ist jedoch mindestens ebenso wahrscheinlich. Heutzutage sind die sogenannten haloaromatischen, sekundären Transformationsprodukte mariner Invertebraten oder sedimentbewohnender Organismen im Zusammenhang mit mikrobiellen Abbauprodukten in Böden und Sedimenten vielfach untersucht. Vor allem Mono-, Di- und Tribromphenole, aber auch bromierte Pyrrole und Brombenzylalkohole wurden Mitte der achtziger Jahre im Gewebe mariner Sedimentwürmer, im Sediment, in Algen sowie in Invertebraten nachgewiesen.^[129] Weiterhin wurden extrem variierende Konzentrationen für ein Monobromphenol, das 4-Bromphenol, im marinen Sediment festgestellt. Die Gehalte lagen zwischen wenigen ng und Höchstmengen von etwa 800 µg/kg (TG), wobei mit zunehmendem Abstand zu den wurmdurchsetzten Sedimentschichten schon nach wenigen cm eine krasse Abnahme der Konzentrationen festgestellt wurde.^[130] Die Bromverbindungen entstehen u.a. auch in estuarinen Sedimenten der Nordsee als Metabolit einer Wurmspezies (*Lanice Conchilega*). Untersuchungen von Steward und Lovell in Sedimentkernen mit ¹⁴C-markierten Bromphenolen zeigten interessanterweise den relativ schnellen Abbau der Verbindung durch hohe Respirations- und Assimilationsraten der sedimentbewohnenden Bakterien.^[130] Die Haloaromaten stellen damit eine wichtige Energie- und Kohlenstoffquelle für die Bakterienfauna im Sediment dar. Dieser Prozeß ist aus zwei Gesichtspunkten enorm wichtig: Zum einen würde es ansonsten relativ schnell zu einer hohen Akkumulation der bromierten Komponenten kommen, zum anderen gelten die biogenen Bromaromaten auch als Toxine für Vertebraten; speziell für Bromphenole ist die Hemmung der Reproduktion sowie der mikrobiologische Aktivität in marinen Sedimenten nachgewiesen.^[129]

Tabelle 29 :Ergebnisse der Screening-Untersuchung dreier Nordseesedimente

Substanz	ES1	KS11	UE33	Fraktion
Alkylbenzole				
Diethylbenzol	▲	▲	▲	1,2
<i>n</i> -Propylbenzol	3	▲	▲	1,2
Ethylmethylbenzol	3	3	▲	2
Trimethylbenzol	▲	▲	▲	1,2
<i>n</i> -Butylbenzol/ <i>sec</i> -Butylbenzol	2	2	▲	2
Methyl- <i>iso</i> -propylbenzol	▲	▲		1,2
Methyl- <i>n</i> -propylbenzol	▲	▲		1,2
Ethyldimethylbenzol	▲	2	2	1,2
Tetramethylbenzol	▲	▲	▲	1,2
Di- <i>iso</i> -propylbenzol		▲		2
Tri- <i>iso</i> -propylbenzol	▲	▲	▲	1,2
Ethyltrimethylbenzol			▲	2
Methylhexylbenzol	▲	?	▲	1,2
Dimethylhexylbenzol		▲		1
PAH				
Naphthalin	▲ [ST]	▲	▲	2
Methylnaphthalin	3	3	3	2
Ethyl-naphthalin	▲	▲	▲	2
Dimethylnaphthalin	5-6	5	▲	2
Trimethylnaphthalin	4	2	▲	2
Propylnaphthalin	▲	▲		2
Ethylmethylnaphthalin	▲	▲	▲	2,3
Tetramethylnaphthalin	▲	▲		2,3
Di- <i>iso</i> -propylnaphthalin		▲		2,3
Biphenyl	▲	▲	▲	2
Methylbiphenyl	2	▲	▲	2
Dimethylbiphenyl	2-3	2-3	▲	2
Diethylbiphenyl		2		2
Acenaphthylen [ST]		?		2
Acenaphthen [ST]	▲	▲	▲	2
Methylacenaphthen	▲	?		2,3
Fluoren [ST]	▲ [ST]	▲	▲	2 (3)
Methylfluoren	2-3	2		2
Phenanthren [ST]	▲	▲	▲	1,2
Anthracen [ST]	▲	▲	▲	1,2
Methylphenanthren	5	▲	▲	2,3
Dimethylphenanthren	7-8	▲	▲	2
Ethylphenanthren	▲	▲	▲	2
Acenphenanthren [ST]		▲		2,3
Tetramethylantracen		▲		2,3
Fluoranthen [ST]	▲		▲	3
Pyren [ST]	▲	▲	▲	3

Substanz	ES1	KS11	UE33	Fraktion
Coronen [ST]	▲		▲	3
Hydrierte PAH				
Dihydronaphthalin				
Methyltetrahydronaphthalin (Methyltetralin)			▲	2
Dimethyltetrahydronaphthalin (Dimethyltetralin)		▲	▲	1
Diethyltetrahydronaphthalin (Diethyltetralin)	▲	▲	▲	1
Trimethyltetrahydronaphthalin (Trimethyltetralin)	▲	2	2	1,2
Dimethyldihydrophenanthren	▲			2
Dihidropyren				3
Tetrahydrofluoranthren			▲	3
S,O und N-haltige PAH				
Benzofuran		▲		3
Methylbenzofuran	▲	▲	▲	2,3
Dibenzofuran	▲		▲	3
Methyldibenzofuran	▲	▲	2	2,3
Tetrahydronaphthofuran		▲		3
Benzonaphthofuran (Tetramethylbenzopyran)	▲ (▲)	▲	▲	3
9H-Carbazol	▲	▲	▲	3
Methylcarbazol	▲		▲	3
Benzcarbazol			▲	3
Nitroethylcarbazol	(▲)			
Alkylierte Thiophene	▲	▲	▲	2-4
Dibenzthiophen	▲	▲	▲	2,3
Ethyl-dibenzthiophen	▲	▲	▲	2
Dimethyl-dibenzthiophen			▲	2
(Benzo(b)thiophen, 1,1'-Dioxid)	▲			5c
Phenylmethylthiophen	▲	▲		3
Phenylbenz(b)thiophen			▲	3
Benz(b)naphthothiophen	▲			4
Methylnaphthothiophen	▲			2
Methyl-tetrahydronaphtho(2,1-b)thiophen	▲	▲		4
Phenanthrothiophen				

Substanz	ES1	KS11	UE33	Fraktion
Ketone				
9H-Flurenon	▲	▲	▲	3,4
Anthracenon	▲		▲	3,4
Acetophenon				
Benzophenon				
Dimethylaminotrimethoxybenzophenon	▲			7
Anthracendion	▲	?	▲	4
Phenole				
(3 oder 4)-Bromphenol [ST]	▲	▲	▲	5a,5b
Dimethylethylphenol	▲	▲		3
Octylphenol-Isomer [ST]	▲	▲	▲	(4)
Nonylphenol (Isomerengemisch) [ST]	(▲)	▲	▲	(4)
Bis-dimethylethylphenol		▲		3
Methoxyaminophenol	▲			7
Aromatische Ether				
Isopropenylanisol (Anethol ?)	▲	▲	▲	3
<i>p</i> -Phenylanisol	▲			3
Diphenylether	▲	▲	▲	3
<i>tert</i> -Butylhydroxyanisol			▲	3
Methyldiphenylether*	▲	▲		3,2
Phenyl- <i>iso</i> -propylether*	(▲)	(▲)	(▲)	2,3
Trimethoxybenzol	▲	▲	▲	4,5
Dimethoxytoluol	▲		▲	5,6,(7)
Aldehyde				
Benzaldehyd	▲			3
Methylbenzaldehyd	▲			3
Ethylbenzaldehyd			▲	3,4
Methylethylbenzaldehyd		▲	▲	3,4
Dimethylbenzaldehyd			▲	4
4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd			▲	
Trimethylbenzaldehyd	▲	▲		3,4
Aniline				
2-Fluor-2-methylanilin	▲			5b
2-Chloranilin [ST]	▲	▲	(▲)	3
2,5-Dichloranilin [ST]	▲	▲	▲	3
2,4,5-Trichloranilin (bzw. 2,4,6-TCA, Koelution)	2	▲	2	3,4
2,6-Dichlor-4-nitroanilin [ST]	▲			5a
Methylphenylanilin	▲			3
Phenylethenylanilin (Amino-Stilben)			▲	3
Naphthalenamin			▲	4
Amide				
4-Ethylformanilid [ST]	▲	▲		5,6

Substanz	ES1	KS11	UE33	Fraktion
<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -phenylformamid		(▲)		5
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -phenyl-acetamid	(▲)		▲	5 (b),6
Dimethoxybenzacetamid			▲	5
Nitrile				
Naphthalincarbonitril		▲	▲2	4
9 <i>H</i> -Fluoren-2-Carbonitril			▲	4
Thienylphenylpropennitril		▲	▲	5
Nitroverbindungen				
Nitroethylcarbazol				
Nitroterphenyl	▲			3
Nitrophenol [ST]	▲		▲	3,4
Methylnitrophenol		▲		3
Nitrobenzol [ST]	(▲)	▲	▲	3
Monochlornitrobenzol [ST]	(▲)	▲		3
Phthalate				
Dimethylphthalat (DMP) [ST]	▲	▲	▲	
Diethylphthalat (DEP) [ST]	▲	▲	▲	
Di- <i>iso</i> -butylphthalat [ST]	▲	▲	▲	
Di- <i>n</i> -butylphthalat [ST]	▲	▲	▲	
Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) [ST]	▲	▲	▲	
Dioctylphthalat	▲			
Sulfide				
Dimethyltrisulfid		▲		2
Diphenyldisulfid	▲			2
Benzthiazole				
Benzothiazol [ST]	▲	▲		5
2-Methylthiobenzothiazol [ST]	▲			4
Phosphorsäureester				
Tri- <i>iso</i> -butylphosphat [ST]	▲	▲	▲	3-5
Tri- <i>n</i> -butylphosphat [ST]	▲	▲	▲	3-5
Triethylphosphat [ST]	▲	▲	▲	6,7
Tris(2-chlorethyl)phosphat (TCEP) [ST]	▲	▲	▲	5
Tris(2-chlorpropyl)phosphat (TCPP)	▲		▲	6
Triphenylphosphat (TPP) [ST]				4
Trimethyldithiophosphat (TMDTP) [ST]		(▲)		4,5
Trimethylthiophosphat (TMTP) [ST]				4,5

Substanz	ES1	KS11	UE33	Fraktion
Duftstoffe (synthetische + Naturstoffe)				
Galaxolid (HHCB) [ST]	▲	▲	▲	4,5
Tonalid (AHTN) [ST]	▲	▲	▲	5
Traseolid (ATII) [ST]				5
β -Jonon [ST]	▲		▲	5
β -N-Methyl-ionon			▲	
Lilial	▲			
Limonen				
Chlorierte Benzole				
Dichlorbenzol [ST]	3	3	▲	1
Trichlorbenzol [ST]	3	3	3	1
Tetrachlorbenzol [ST]	2	2	1	1
Pentachlorbenzol				1
Hexachlorbenzol [ST]			▲	1
Chlorierte Styrole				
Octachlorstyrol [ST]				1
Chlorierte Halogenalkane				
Trichlorbutadien				1,2
Tetrachlorbutadien				1,2
Pentachlorbutadien				1,2
Hexachlorbutadien [ST]			▲	1,2
Sonstige:				
3-Chlorbenzthiazol		▲		3
2,4-Dichlor-1-(chlormethyl)benzol	▲			1
Chlordiethylmethylbenzol	▲			1
Chlortriethylbenzol	▲			1
Tetrachlorethan			▲	2
Trichlormethylbenzol (Trichlortoluol)			▲	2
Chlormethylphenol (Chlor- <i>o</i> -Kresol)			▲	3
Dimethoxychlorbenzol			▲	3
3-Chlor-4-methoxy-1,1'-biphenyl			▲	4
Halogenierte PAH				
Monochlornaphthalin		▲		1
Dichloroanthracen			▲	2
Bromierte Verbindungen				
Bromindol			▲	3
Dibromindol			▲	3,4
Bromphenol [ST]	▲	▲	▲	5

Substanz	ES1	KS11	UE33	Fraktion
PCB				
(Chlorierungsgrad 3-7)			▲	2
Pestizide und Metabolite				
α -HCH [ST]				
β -HCH [ST]				
γ -HCH [ST]				
<i>o,p</i> -DDMU				
<i>p,p</i> -DDMU				
<i>o,p</i> -DDE [ST]				
<i>p,p'</i> -DDE [ST]			▲	2,3
<i>o,p</i> -DDD [ST]				
<i>p,p'</i> -DDD [ST]			▲	3
<i>p,p'</i> -DDT [ST]				
Dichlorbenzophenon (<i>o,p</i> + <i>p,p</i>)			▲ (<i>para</i>)	4

▲ = Substanz in der Probe nachweisbar Zahl = Entspricht der Anzahl nachgewiesener Isomere

? = Spektrum unsauber, Substanz nicht eindeutig zuzuordnen

[ST]= Substanz wurde verifiziert anhand einer Standard-Referenz

Abschließend ist festzustellen, daß aus den gewonnenen Massenspektren eine Reihe an Strukturvorschlägen abgeleitet werden konnte. Für die polaren Fraktion gestalteten sich die Untersuchungen jedoch sehr schwierig. So konnten einige Komponenten bereits identifiziert und biogener Herkunft zugeordnet werden, wie beispielsweise die bromierten Verbindungen. Andererseits sind viele der erhalten Massenspektren bisher ungelöst. Ferner deutet sich an, daß für eine Aufklärung polarer Inhaltsstoffe eine Derivatisierung oder HPLC-MS-Analysen notwendig sein werden.

Die nachfolgende Abbildung 35 soll noch einmal in etwa den Stand der Screening-Analyse für die Nordseesediment-Proben veranschaulichen und die prozentuale Verteilung der bisher identifizierten Substanzklassen zusammenfassend darstellen.

Im Interesse der Zuordnung möglicher toxikologischer Effekte sollte eine vollständige Aufklärung und Separation der erhaltenen Signale erfolgen. Dieses Ziel bedarf u.a. auch noch weiterer methodischer Fortschritte. Schon zum jetzigen Stand der Ergebnisse zeigen die zum Teil hohen Gehalte biogener Komponenten, daß für weitere toxikologische Studien der einzelnen Fraktionen nicht nur die Analyse anthropogener Industriechemikalien von Bedeutung ist, sondern immer diese biogenen Anteile zu beachten und in eine Risikobewertung einzubeziehen sind.

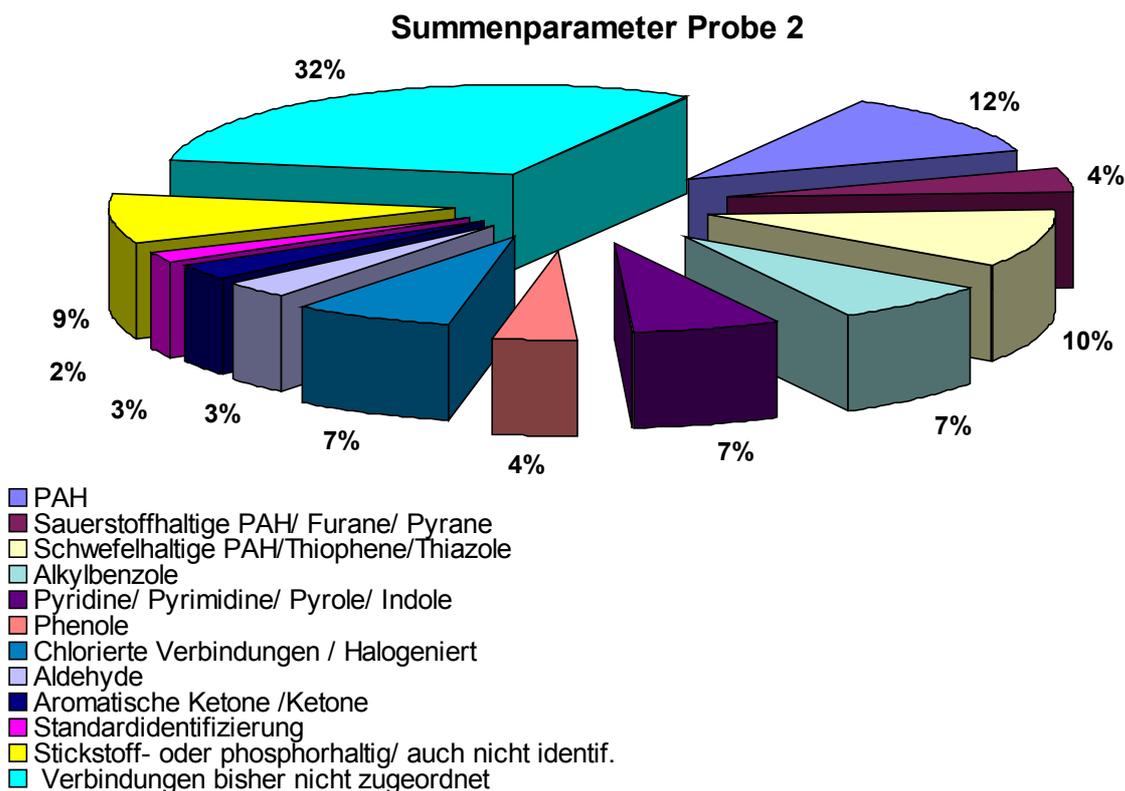


Abbildung 35: Prozentuale Verteilung der identifizierten Substanzklassen in der Nordseesedimentprobe 2

2.4.3.1 Fehlerbetrachtung und Problematik der Identifizierung:

In Tabelle 29 konnte für eine Reihe von Verbindungsklassen lediglich die Anzahl der nachgewiesenen Isomere angegeben, aber keine direkte Zuordnung vorgenommen werden. *Ortho*-, *meta*- oder *para*-Stellung substituierter Monochlornitrobenzole oder Monochloraniline ergeben z.T. nahezu identische Spektren. Ihre toxikologische Wirkung unterscheidet sich aber teilweise erheblich, weshalb eine Einzelbestimmung der verschiedenen Isomere notwendig ist. Eine Verifizierung ist ausschließlich über Retentionszeitenvergleich mittels externer Standards möglich.

Insgesamt ergaben sich folgende Limitierungen für die GC-MS-Analysen:

- ⇒ Niedermolekulare Substanzen werden zum Teil aufgrund ihrer Flüchtigkeit nicht identifiziert, zum anderen fehlen aber auch signifikante Massen-Fragmente bei einer Spektrenaufnahme ab m/z 100 für eine eindeutige Zuordnung.
- ⇒ In diesem Zusammenhang ebenfalls nicht näher untersucht wurde das Auftreten der Arylester der Alkylsulfonsäuren, die insgesamt in Sedimenten der Elbe und Mulde in hohen Konzentrationen von Schwarzbauer et al. bestimmt wurden und deren Vorkommen damit in Nordseesedimente nicht unwahrscheinlich erscheint.
- ⇒ Säuren sind zumeist nicht über GC-MS analysierbar. Da keine Derivatisierungen durchgeführt wurden, konnten diese nicht erfaßt werden.
- ⇒ Es konnte keine Bestimmung und Zuordnung von Verbindungen $m/z > 400$ erfolgen, da diese durch die GPC-Fraktionierung weitgehend abgetrennt sein sollten. Vorfraktionen der GPC wurden aufgrund störender Lipidmatrix nicht analysiert.

3 Methodenentwicklung zur toxizitätsgeleiteten Untersuchung von Sedimenten

Zielsetzung:

- ⇒ Erarbeitung einer Analysenmethode für ein integratives toxizitätsgeleitetes Verfahren zur Untersuchung von Sediment und Schwebstoffproben unter Berücksichtigung chemischer und bioanalytischer Methoden.
- ⇒ Über eine chemische Analyse der Probenextrakte soll eine möglichst vollständige Bestandsaufnahme der Inhaltsstoffe erfolgen. Zudem sollten, wenn möglich, Zusammenhänge zwischen den ermittelten toxischen Wirkungen und identifizierten Komponenten erfaßt werden.
- ⇒ Welche Art der Toxizität wird festgestellt ?
- ⇒ Bewertung der erarbeiteten Datenlage.

3.1 Vorstellung der verschiedenen Ansätze für die Sedimentqualitätsbewertung:

Sedimente sind integraler Bestandteil der aquatischen Umwelt. Sie sind Habitat, Brut- und Aufzuchtgebiet für zahlreiche aquatische Lebewesen. In der jüngsten Zeit konnte in vielfachen Untersuchungen gezeigt werden, daß für die Beurteilung der Belastung von Gewässern die alleinige Betrachtung von gelösten Wasserinhaltsstoffen nicht ausreichend ist.^[131] Vielmehr müssen im Hinblick auf eine langfristige Schädigung von Organismen im Ökosystem Sedimente und Schwebstoffe ebenfalls berücksichtigt werden.^[132,133,134] Mittlerweile unumstritten ist, daß die Sedimentqualität ähnlich der Wasserqualität einem Bewertungsverfahren unterzogen werden sollte.

Im Gegensatz zur Bewertung der Wasserqualität gibt es bis heute kein einheitliches Verfahren, die sogenannte Güte der Sedimente zu bestimmen. In der Bundesrepublik wird bisher durch Routine-Untersuchungsprogramme der einzelnen Bundes- und Länderüberwachungsanstalten für limnische und marine Sedimente ein geringer Anteil an Schadstoffbelastungen erfaßt.^[102] Die Priorität liegt mit ausgewählten KW, PAH (16 EPA), PCB, chlororganischen Pestiziden, Schwermetallen und Nährstoffen bei einer sehr geringen Anzahl akut toxischer Verbindungen bzw. Wasser gefährdender Stoffe. Über sogenannte Prioritätslisten wird versucht, weitere als besonders umweltgefährdend einzustufende Verbindungen zu erfassen und in ein Monitoring einzubeziehen. Eine umfassende Berücksichtigung aller wesentlichen Umweltschadstoffe stellt aber angesichts der etwa 64.000 chemischen Substanzen, die weltweit produziert, gehandelt und verwendet werden, nach wie vor ein völlig ungelöstes Problem da. Damit stellt sich die Frage, ob über das Spektrum der erfaßten Substanzen ein Einblick in reale Belastungssituationen oder – weitergehend - spezielle Erkenntnisse des ökologischen Zustandes gewonnen werden können. Screening-Verfahren in Form von chemisch-physikalischen Untersuchungen ermöglichen die Aufklärung über anthropogene Einträge, während die Konzentrationsermittlung sogenannter „Target-Verbindungen“ der Kontrolle bzw. Überwachung

dienen. Über den Weg des chemischen Screenings besteht die Möglichkeit, die Sedimentzusammensetzung und ihre Schadstoffbelastungen zu untersuchen; z.B. mit Hilfe von massenspektrometrischen Methoden. Diese sind oft sehr nützlich, liefern aber keine konkreten Hinweise auf biologische Effekte. Für die Beschreibung und Beurteilung der marinen Umwelt ist es eben nicht ausreichend, nur Stoffbestand und Konzentration zu bestimmen, sondern separate, biologisch orientierte Untersuchungen von beispielsweise äußerlich sichtbaren Fischkrankheiten, Leberveränderungen, Mißbildungen an Fischeiern sowie Veränderungen auf subzellulärer Ebene müssen damit einhergehen. Die Wirkung anthropogener Belastungen wird mit Untersuchungen zur Zusammensetzung und Dynamik von Lebensgemeinschaften erfaßt. Phytoplankton, Chlorophyll a sowie Zooplankton, Makrozoobenthos werden hinsichtlich ihrer Populationsdynamik, ihrer räumlichen Verteilung und auf langzeitliche Veränderungen hin untersucht.

Chemische und biologische Daten werden bislang meist in völlig unabhängig voneinander durchgeführten Messungen erhalten, so daß keine direkte Kausalbeziehung zwischen Schadstoffen und biologischen Effekten abgeleitet werden kann. Erstmals wurde 1989 für Abwasserproben das sogenannte „Toxicity-Identification-Evaluation“ (TIE)-Konzept von der EPA entwickelt und vorgestellt. Mittlerweile sind bereits auch für Sedimente Studien in Form dieses Ansatzes publiziert.^[10,15,132,135] Hierbei geht es um eine Umkehrung klassischer Denkweisen, um eine toxizitätsgeleitete Screening-Analyse, d.h. nach der Verifizierung von Toxizitäten wird eine Identifizierung von Schadstoffen durchgeführt, um schließlich über eine Evaluierung (Kausalbeziehung zwischen Schadstoff und biologischen Effekt) der ermittelten Ergebnisse in den untersuchten Proben neue Erkenntnisse zu gewinnen.

Es bestehen bereits die unterschiedlichsten Methoden, mit deren Hilfe die Schadwirkung kontaminierter Sedimente erfaßt werden sollen und die im Rahmen neuentwickelter Strategien zur Bewertung von Sedimenten angewendet werden können. Allerdings ist bisher kein einheitliches System etabliert. Von der EPA wurden für ausgewählte Substanzen, im wesentlichen PAH, sogenannte Sediment-Qualitätsziele formuliert. Neuere Beschlüsse der OSPAR-Kommission schlagen ein Verfahren unter Berücksichtigung sogenannter „Background-Level“ für eine Bewertung von Sedimenten vor. Dieser Ansatz ist bislang allerdings nicht unumstritten, da Hintergrundwerte für Schwermetalle möglicherweise verwendbar sind, für organische Substanzen derzeit aber kaum abgeleitet werden können.^[136] Die nachfolgend vorgestellten unterschiedlichen Herangehensweisen sollen einen groben Überblick geben.

3.1.1 Chemisch-physikalische Verfahren

Hierbei handelt es sich um Screening-Methoden, z.B. die Konzentrationsermittlung von Einzelsubstanzen, Summenparametern oder aber die Identifikation und Verifikation von bisher noch nicht erfaßten Substanzen in Umweltkompartimenten. Über toxikologische Effekte wird auf diese Weise keine direkte Aussage erhalten, hierfür müssen die ermittelten Konzentrationen mit unabhängig erhobenen ökotoxikologischen Daten korreliert werden. Beispiele hierfür sind der von Murdoch et al. 1986 eingeführte Background-Ansatz sowie das vielfach eingesetzte Gleichgewichtsverteilungs-

verfahren von Pavlou et al. 1987. Weitere bekannte Arbeiten hierzu wurden von Shea (1988) und di Toro (1989, 1991) publiziert.^[11,137,138] Über hochsensible, analytische Methoden ist eine Aufklärung von Sedimentinhaltsstoffen möglich. Die Anwendung chemisch-analytischer Verfahren ermöglicht die Auftrennung von komplexen Stoffgemischen und eine selektive Erfassung von Analyten im Ultraspurenbereich.

3.1.2 Biologisch/ökotoxikologisch

Der Biozönose-Ansatz ist ein Beispiel für ausschließlich ökologische und/oder ökotoxikologische Methoden. Hierbei handelt es sich um Verfahren zur Bestimmung der Gesamtsediment-Toxizität, Porenwasser-Toxizität, Eluat-Toxizität, aber auch Extrakt-Toxizität. Sie führen zu biologisch gewichteten Kriterien, d.h es wird die akute oder chronische Wirkung von komplexen Sedimentproben auf Organismen (Fische, Amphibien, Bodenlebewesen, Algen, Bakterien) untersucht. Bei diesem Ansatz werden zum Teil Untersuchungen von chemischen Leitparametern (Sauerstoffgehalt, Ammonium, Nitrat, TOC) sowie biologische Parameter (Saprobienindex) integriert.

3.1.3 Chemisch/ökotoxikologisch

Für Biotests ist es in der Regel notwendig, die partikelgebundenen Schadstoffe in eine gelöste Phase zu überführen, um diese für eine Untersuchung verfügbar zu machen. Dabei lassen sich verschiedene Verfahrensweisen voneinander abgrenzen:

- ⇒ Es kann das Porenwasser, dem viele sedimentbewohnende Organismen *a priori* ausgesetzt sind und das vermutlich den Hauptaufnahmepfad von Sedimentschadstoffen darstellt, auf seine Schädlichkeit untersucht werden.^[132] Das Schädigungspotential des Gesamtsediments wird dabei nicht erfaßt.
- ⇒ Die Überprüfung von wäßrigen Eluaten - die durch Schütteln von Sedimenten mit Wasser hergestellt werden - ist relativ gut standardisiert und ahmt oxidierende Umweltverhältnisse nach, wie sie bei einer Remobilisierung von Sedimenten zu erwarten sind. Für wäßrige Eluate ist jedoch bekannt, daß sie das tatsächlich bioverfügbare Maß an Schadstoffen unterbewerten.^[10]
- ⇒ Durch Sediment- oder Schwebstoff-Extrakte mit Hilfe von organischen Lösungsmitteln können mittels einer anschließenden Fraktionierung auch Aussagen über die Dominanz verschiedener Schadstoffgruppen getroffen werden. Mittels organischer Extrakte kann versucht werden, die langfristige Schädigung von Organismen durch „überwiegend“ fettlösliche Substanzen in einer kurzen Exposition mit den potentiell verfügbaren Schadstoffen nachzuahmen. Die langfristige Schädigung schon durch geringe Konzentrationen über eine kurzfristige Belastung mit Schadstoffen im akut wirkenden Konzentrationsbereich zu simulieren, ist in der Ökotoxikologie ein weit verbreiteter Ansatz, aber nicht immer unumstritten.^[139,140]

3.1.4 Integrierter Ansatz

Hier werden mehrere der bereits vorgestellten Verfahren kombiniert. Eingesetzt werden können zum einen Sedimenttoxizitätstest (Biotests), chemische Sedimentanalyse, Rückstandsanalyse an Organismen sowie pathologische und biozönotische Untersuchungen (Saprobiensystem). Für ein integriertes Bewertungsverfahren, angelehnt an die von Chapman et al. etablierte Sediment-Triade, werden mindestens drei unterschiedliche Tests verwendet. Integrierte Verfahren sind meist sehr umfangreich, es resultiert dementsprechend auch eine umfassende Sedimentbewertung.^[141]

Jedes der bereits etablierten Verfahren hat Vor-, aber auch Nachteile. Nach welchem Prinzip eine toxizitätsgeleitete Sedimentanalyse durchgeführt werden sollte, ist in der Regel von einer Reihe von Faktoren abhängig. Die folgende Tabelle 30 stellt einige allgemeine, aber auch individuelle Kriterien vor, die bei der Auswahl von Testsystemen eine Rolle spielen.

Tabelle 30: Kriterien, die bei der Auswahl der Biotests zur Bestimmung von Toxizitäten in Sedimenten zu berücksichtigen sind

Spezielle Kriterien:	Allgemeine Kriterien
– Ökosystem-Relevanz: wird das Gesamtsediment untersucht ?	- Werden nur spezielle Stoffgruppen erfaßt oder möglichst vielfältig organische Schadstoffe?
– Empfindlichkeit der Testspezies	- Wird Bioverfügbarkeit von Stoffen miterfaßt ?
– Eignung der jeweiligen Testphase	– Wird die Wirkung von Einzelsubstanzen erfaßt?
– Verfügbarkeit der Testorganismen	– Sind Substanz-Wirkungsbeziehungen zu beobachten ?
– Ausstattung des Labors	– Können Dosis-Wirkungs-Korrelationen aufgestellt werden ? (EC ₅₀ , LC ₅₀ , NOEC, TEC)
– Erforderlicher Sachverstand	– Ist die Integration vieler Stoffe möglich ?
– Kosten- und Zeiterfordernisse	– Ist der Kostenfaktor verträglich ?
– Vorliegen standardisierter Methoden	– Wie lassen sich methodische Unzulänglichkeiten einstufen?
– Vorliegen einer Basis von Referenzdaten	
– Validierung und Qualitätssicherheit der Methode	

Spezielle oder individuelle Kriterien sind häufig von größerer Relevanz und berücksichtigen unter anderem auch schon vorhandene Erfahrungswerte, die bei der Durchführung von Analysemethoden und Testverfahren in der jeweiligen Arbeitsgruppe zusammengetragen wurden. Zusammenfassend stellt die folgende Tabelle 31 die Vor- und Nachteile des chemisch-physikalischen und des biologisch-ökotoxikologischen Verfahrensansatzes gegenüber.

Tabelle 31: Vor- und Nachteile eines chemisch-physikalischen Verfahrensansatz

VORTEILE	NACHTEILE
⇒ Bei Anwendung von Fraktionierungstechniken ist die Stoffgruppenspezifität sehr hoch	⇒ Falls Effekte sich unterhalb der analytischen Nachweisgrenze ergeben, können diese Substanzen nicht identifiziert werden
⇒ In Kombination mit ökotoxikologischen Verfahren können Substanz-Wirkungsbeziehungen und Dosis-Wirkungsbeziehungen erfaßt werden	⇒ Chemische Umwandlung von Verbindungen, wie z.B. Metabolisierungsreaktionen, dabei kann es zu Wirkungsverstärkungen oder auch Abschwächungen kommen
⇒ Nur über die Herstellung von Extrakten sind genotoxische Untersuchungen möglich	⇒ Biologische Verfügbarkeit der Chemikalien begrenzt normalerweise die Effekte. Dies kann bei der Untersuchung von Extrakten nicht mehr rückgeschlossen werden
<p><u>Fazit:</u> Aufgrund der Aufklärung von Belastung und Belastungsschwerpunkten mit Hilfe von chemisch-physikalische Verfahren läßt sich auf diese nicht verzichten. Bei alleiniger Anwendung sind sie jedoch unzureichend für eine Sedimentqualitätsbewertung.</p>	

Tabelle 31b: Vor- und Nachteile eines biologisch/ökotoxikologischen Verfahrensansatzes

VORTEILE	NACHTEILE
⇒ Die Wirkung aller verfügbaren Stoffe wird erfaßt	⇒ keine Substanz-Wirkungs-Korrelation möglich
⇒ Kombinationswirkungen im nativen Sediment	⇒ Dosis-Wirkungs-Beziehungen gestalten sich zum Teil schwierig, da es sich um summarische Parameter handelt
⇒ Vielfach können Stoffe weit unterhalb chemisch-analytischen Nachweisgrenzen als Effekt detektiert werden	⇒ Biologische und geologische Störungen erschweren die Interpretation im Hinblick auf anthropogene Ursachen
⇒ Es werden nur bioverfügbare Stoffe erfaßt	⇒ Die zum Teil hohe Stoffspezifität der Tests bedingt u.a. eine Batterie von Testsystemen für die Erfassung verschiedener Verbindungsklassen
⇒ Kostengünstig	⇒ Für Problemflächen und Sedimentkartierung ist eine reine biologisch/ökotoxikologische Untersuchung unzureichend, d.h. um eine Qualitätsverbesserung zu erreichen, muß auch die genaue Schadensursache zugeordnet werden

Innerhalb der Methodenentwicklung wurde eine Kombination verschiedener (Öko)toxikologischer Testsysteme und der bereits erarbeiteten chemischen Analysenmethode angestrebt. Es war hierbei nicht das Ziel, eine umfassende Sedimentbewertung zu erreichen, vielmehr sollten möglichst umfangreiche Schadstoff-Effekt-Beziehungen für die Sedimentextrakte ermittelt werden. Es wurden drei unterschiedliche Biotests ausgewählt, welche sich zum einen gut ergänzten und zum anderen jeweils mit chemischen Extrakten durchgeführt werden konnten.

3.2 Bioverfügbarkeit und Gleichgewichtsverteilung von sediment- und schwebstoffgebundenen Substanzen

Die Konzentrationen chemischer Rückstände in Umweltproben lassen keine unmittelbaren Voraussagen über biologische und ökologische Wirkungen zu, da der bioverfügbare Anteil der Kontaminanten zwischen 0 bis 100 % variieren kann und von Stoff- und Umweltbedingungen abhängig ist.^[10] Ein Schadstoff wird als **bioverfügbar** bezeichnet, wenn: **„dessen Gegenwart im Sediment bzw. seine Mobilisation vom Sediment zu meßbaren adaptiven oder schädigenden biologischen Effekten in einem Organismus oder einer Nahrungskette einschließlich dieses Organismus führt.“**^[142] Faktoren, welche die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen (ausschließlich organische Schadstoffe) beeinflussen, sind zum einen von den Eigenschaften der Schadstoffe (Adsorptionsvermögen, Bindungscharakteristiken, Verteilungskoeffizienten) abhängig, aber auch von den Eigenschaften des Sedimentes selbst (Porenwasser, Partikelgröße, Gehalt an organischem Kohlenstoff, Huminsäuren, Redoxpotentiale).^[5,143] Weiterhin beeinflusst die mikrobielle Aktivität die Verteilung und Bioverfügbarkeit der Stoffe in Sedimenten (Oberflächen der Mikroorganismen sind potentiell bindungsfähig, Biotransformation, Veränderung der stofflichen Umweltbedingungen). Ein relativ bedeutender Faktor ist letztendlich der Expositionspfad, über den die benthischen Organismen gegenüber Xenobiotika exponiert sind, denn ein toxischer Effekt auf einen Organismus ist von der Sensitivität auf Schadstoffe im Porenwasser und auf partikulär gebundene Stoffe abhängig.

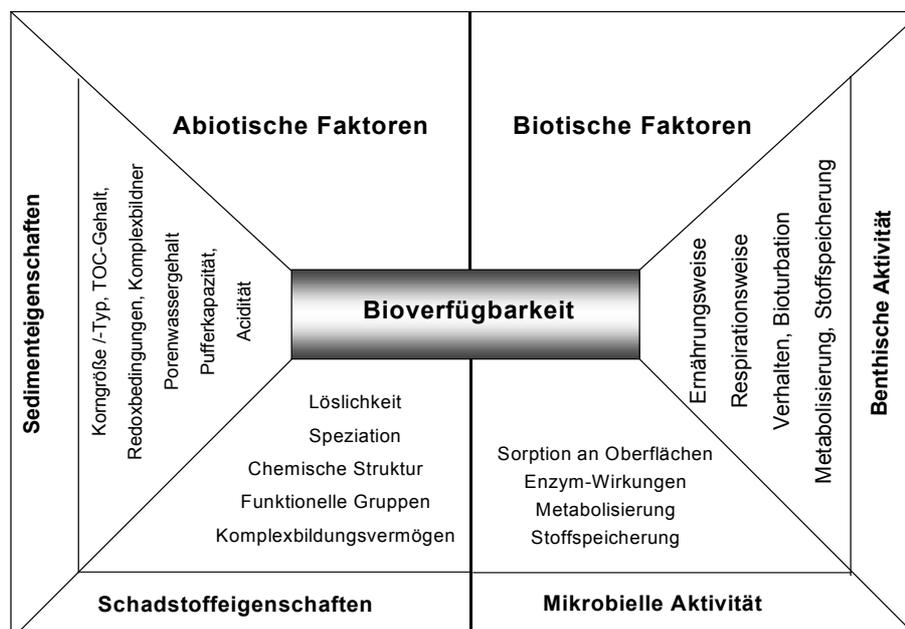


Abbildung 36: Faktoren, die die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen beeinflussen

Die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen ist von vielen Faktoren abhängig, in Sedimenten liegen hochkomplexe Verhältnisse vor. Abbildung 36 zeigt schematisch, inwiefern abiotische und biotische Faktoren zum einen die Schadstoffeigenschaften und zum anderen die Aufnahme sedimentgebundener Schadstoffe beeinflussen. Generell erscheinen sedimentsorbierte Schadstoffe persistenter, weniger mobil und höher konzentriert als in der Wasserphase. Ein Expositionspfad, welcher der Regeneration von Sedimenten behilflich sein kann, ist z.B. der Bioturbationprozeß. Auch über die Ernährungsweise der Mikroorganismen kann es zum Abbau von Schadstoffen kommen, wie es beispielsweise für die haloaromatischen Phenole im Abschnitt 2.4.2 erläutert wurde. Durch die Bioturbation werden allgemein Schadstoffe aus dem Sediment zur Wassersäule bewegt. In der Wasserphase wiederum sind weitere Mikroorganismen, die mittels Respiration die Schadstoffe aufnehmen. Ein Beispiel für die Exposition eines Organismus gegenüber Schadstoffen ist in Abbildung 37 dargestellt.

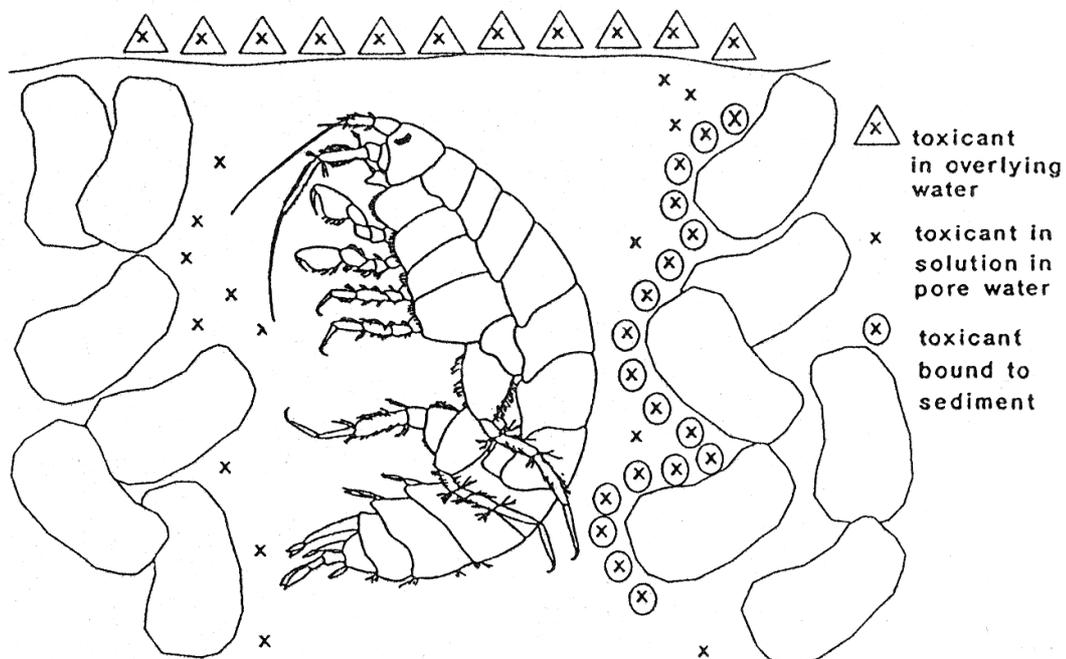


Abbildung 37: Exposition eines benthischen Organismus gegen Sedimentschadstoffe (aus Chapman und Power 1992, [141])

Bei einer Methodenentwicklung unter Verwendung von Lösungsmitteln zur Extraktion von Sedimenten ist der Aspekt der Bioverfügbarkeit und damit die Vergleichsmöglichkeit zwischen Konzentration und Effekt eine der Hauptschwierigkeiten. Generell existieren hier zwar Modelle, wie beispielsweise der Gleichgewichtsverteilungs-Ansatz bzw. Vergleiche zwischen der passiven Akkumulation und der Sedimentchemie (Akkumulationsfaktor, bezogen auf den Gehalt an organischem Kohlenstoff im Sediment bzw. auf den Fettgehalt für Biota), mit deren Hilfe man eine Vorhersage der Bioverfügbarkeit treffen kann. In Anbetracht der Komplexität, z.B. Ernährungsbiologie bei Kleinstorganismen, sind Vorhersagemöglichkeiten aber äußerst begrenzt. Angenommene Verteilungsgleichgewichte werden während der Analysen, beispielsweise bei der Probenvorbereitung (Trocknen) oder auch der Trennung durch Filtration oder Zentrifugieren, verändert.

Die meisten methodischen Ansätze zur Erfassung von Bioverfügbarkeit basieren auf der Aufnahme der Schadstoffe - mehr oder minder - über osmotische Prozesse und vernachlässigen das Ernährungsverhalten. Über den Einsatz von „Semipermeablen Membran Devices“ (SPMD) konnte gezeigt werden, daß diese für ein Modellieren der reinen Biokonzentration von Fischen sehr geeignet sind.^[49] Hierbei handelt es sich um Polyethylen-Folien-Schläuche, die mit Triolein gefüllt sind. Ihr Einsatz als Modell-System geht davon aus, daß die Diffusion durch sehr dünne Kunststoffolien dem passiven Transport durch Biomembranen entspricht. Triolein ist zudem Hauptbestandteil des Fischfetts und sollte diesem daher weitgehend entsprechen. Über ein Dialyse-Verfahren können die angereicherten Schadstoffe und daraus dann die resultierenden Verteilungsgleichgewichte ermittelt werden. Die Anreicherung durch Biomagnifikation ist dadurch ausgeschlossen. Der Einsatz der Polyethylenschläuche in Sedimenten wird bisher nur vereinzelt beschrieben. Cleveland et al. und Macrae und Hall konnten zeigen, daß zumindest die sehr lipophilen Komponenten, z.B. PAH und PCB, als bioakkumulierbare Stoffe aus Sedimenten mit dieser Methode erfaßt werden können.^[144,145] Die erstgenannten Autoren führten nach Anreicherung der Schadstoffe in den Membranen mit den chemischen Extrakten ein Screening auf akute Toxizität und Genotoxizität durch, und sie wiesen für einzelne SPMD-Extrakte akute Toxizität nach. Ein direkter Einsatz der Membran in Form eines Feldmonitorings, wie es für die Wasserphase praktiziert werden kann, ist für Sedimente eher schwierig, denn das Diffusionsvermögen der Schadstoffe im Sediment ist auf das Porenwasser beschränkt, und damit ist die Akkumulation der Verbindungen bereits limitiert. Ferner ist für Sedimentorganismen unklar, wie hoch der Anteil an aufgenommenen Substanzen über andere Pfade als den der passiven Akkumulation ist.

3.3 Beschreibung der verwendeten Testverfahren

Zur Bestimmung der akuten aquatischen Toxizität wurde der Leuchtbakterientest ausgewählt. Ferner wurden mit dem Arabinose-Resistenztest Untersuchungen zur Genotoxizität der chemischen Extrakte integriert. Weiterhin erschien es sinnvoll, ein Screening auf östrogenes/androgenes Potential (MCF7-*Luc*-Reporter-Gen-Assay) durchzuführen, da gerade in den letzten Jahren relativ viele Substanzen in den Verdacht einer hormonellen Wirkung gerieten. Hintergründe für das in jüngster Zeit gestiegene Interesse an Östrogenen (weibliche Sexualhormone) in der Umwelt sind Untersuchungen, die Störungen der Reproduktion und Geschlechterdifferenzierung bei Wildpopulationen von Schnecken, Fischen, Reptilien und Säugetieren beschrieben. Ein Eingriff in das Hormonsystem eines Organismus ist immer von großer human- und ökotoxikologischer Bedeutung. Xenoöstrogene industrieller Herkunft sind in Organismen in der Lage, die Biosynthese oder auch den Metabolismus der natürlichen Hormone zu stören (endokrine Disruptoren). Die Wirkung der endogenen Östrogene oder Androgene (männliche Sexualhormone) kann durch die Umweltchemikalien nachgeahmt bzw. blockiert werden, was zu verschiedensten Reproduktions- und Entwicklungsstörungen führt.^[146] Bei Betrachtung der potentiell wirksamen Xenobiotika existieren im konkreten Fall für einige halogenierten Phenole oder aber PAH sowie deren primäre oxidativen Metabolite, hohe strukturelle Ähnlichkeiten zu natürlichen östrogen wirkenden Steroid-Hormonen. Für die Metabolite der PAH besteht eine strukturelle Beziehung zu dem phenolischen A-Ring des natürlichen Östradiols. Es existiert der Verdacht, daß Xenobiotika nicht nur bei der Entstehung hormonabhängiger Erkrankungen

(Brustkrebs, Hodenkrebs) sowie Störungen der Fruchtbarkeit beteiligt sind, vielmehr ist in der Vergangenheit mit dem Diethylstilbestrol, als künstliches Östrogen, eine stark mutagene und kanzerogene hormonelle Verbindung bekannt geworden.^[147]

3.3.1 Aquatische Toxizität (Leuchtbakterien Test)

Es handelt sich hierbei um marine Bakterienstämme, welche über Stoffwechselfunktionen Licht emittieren (Biolumineszenz). Der erste Leuchtbakterientest (*Vibrio fischeri* früher *Photobacterium phosphoreum*) wurde 1977 unter dem Namen Microtox durch die Fa. Beckmann Inc. (Bulich 1984) als eine schnelle Screening-Alternative zu akuten Standard-Toxizitätstests mit Fischen oder Invertebraten entwickelt. Mittlerweile sind mehrere Testsysteme, basierend auf der Biolumineszenz der Leuchtbakterien, im Handel erhältlich, welche sich zum Teil noch durch die verwendete Bakterienspezies unterscheiden. Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Geräts „LUMISMINI“ in Kombination mit einem Thermostaten und Leuchtbakterien der Fa. B. Lange durchgeführt.

■ *Funktion:*

Das marine Bakterium emittiert während seines Energiestoffwechsels Licht der Wellenlänge 490 nm. Dieses wird in einer Photozelle des Luminometers nach zeitlich definierter Exposition der Bakterien mit der Probe gemessen. Testlösungen, die Trübungen oder auch starke Färbungen aufweisen, können nicht mittels „Lumimini“ vermessen werden. Der Test basiert auf einer substanzbedingten Beeinflussung des Energiehaushaltes: Es resultiert eine Inhibition der Biolumineszenz durch toxische Stoffe, wobei die Toxizität offenbar von der Lipophilie der Schadstoffe abhängig ist (Veränderungen in der Lipid-Doppelschicht der Zellmembran). Darauf bezogen, könnte man den Test als relativ unspezifisch einordnen. Neuere Untersuchungen zeigten hingegen, daß der Leuchtbakterientest ein eigenes spezifisches Sensitivitätsmuster besitzt.^[148] Für die Auswahl eines Biotests als Teil einer Batterie, liegt aber gerade auch die Bedeutung in der universellen Sensitivität, die hier durch den integralen Testparameter des Energiestoffwechsels für alle Organismen gegeben ist.

■ *Empfindlichkeit:*

Der Leuchtbakterientest wird zunehmend als Screening-Assay zur Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasserproben, aber auch Sedimentextrakten (und Porenwasser) eingesetzt. Hierbei handelt es sich zumeist um starkbelastete Proben. Die Begrenzung durch die Sensitivität eines Testverfahrens sollte, bezogen auf die jeweilige Problemstellung, vorher geprüft sein. Vergleiche des Leuchtbakterientests mit weiteren Testverfahren in der Sensitivität lieferten unterschiedliche Ergebnisse. Im Vergleich mit anderen Bakterienspezies zeigt sich der Leuchtbakterientest jedoch generell als empfindlicher und trennscharf.^[10,149] Durch eine erst kürzlich abgeschlossene Diplomarbeit innerhalb des Arbeitskreises konnte gezeigt werden, daß Lumistox selbst für die Untersuchung von Elbwasserproben ausreichend sensitiv war.^[150] Im Vergleich zu anderen Arbeiten und verwendeten Probenmatrices, wie beispielsweise Klärwerksabflüsse, spiegeln die Elbwasserproben eher geringere Belastungen wider. Für die Untersuchung von Elbschwebstoffen wurde aufgrund der ermutigenden

Ergebnisse von Reineke vorausgesetzt, daß potentiell vorhandene Toxizitäten in derartigen Schwebstoff-Extrakten mit Hilfe des Leuchtbakterientests detektiert werden können.

■ **Übertragbarkeit der Ergebnisse**

Es wurden mittlerweile viele Vergleichsstudien zur Übertragbarkeit der erhaltenen Toxizitätsdaten auf andere Arten durchgeführt.^[151] Allgemein läßt sich zusammenfassen, daß zwar Unterschiede in der Sensitivität zu einzelnen Substanzklassen bestehen, daß die ermittelte relative Toxizität aber meist gut korrelierbar war. In Fällen geringer Übereinstimmung eignen sich spezifische Testsysteme für einzelne Verbindungsklassen besser und sollten je nach Themenstellung auch angewendet werden.

■ **Eigenschaften, welche für die Integration des Tests in biotestgeleitete Untersuchungen speichern:**

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ⇒ Gute Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnissen mit externen Ergebnisse für Sedimentextrakte (da hohe Datenlage) ⇒ Standardisiertes Testverfahren (DIN 38412-34) ⇒ Kostengünstig ⇒ Geringer Zeitaufwand ⇒ Ethisch unbedenklich ⇒ Der Test ist für die biotestgeleitete Wasseruntersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe bereits eingesetzt worden, dementsprechend ist Sachkenntnis vorhanden ⇒ Statistisch sicher durch große Populationsdichte | <ul style="list-style-type: none"> ⇒ Eignung für Extrakte und für direkte Untersuchung wäßriger Phasen (Porenwasser) ⇒ Für Screening-Verfahren eignet sich gerade die unspezifische Detektion, da nicht nur einzelne spezielle Wirkungen erfaßt werden sollen, sondern eine möglichst hohe Anzahl toxischer Stoffe ⇒ Dosis-Wirkungsbeziehung sind durch Berechnung von Verdünnungs- bzw. Anreicherungsfaktoren möglich ⇒ Der Test betrachtet den Gesamtorganismus, d.h. die Stoffaufnahme (Toxikokinetik) wird mitberücksichtigt |
|--|--|

3.3.2 Genotoxizitätstests in Bakterien: Ara-Test, (Ames-Test, *Salmonella* T98, T100)

Im Laufe der Jahre haben sich bakterielle Testverfahren besonders bewährt. Sie zeichnen sich durch leichte Handhabbarkeit und schnelle Vermehrung der Test-Organismen in sehr großer Zahl aus. Der Mutagenitätstest nach Ames <Ames-Test> in Stämmen von *Salmonella typhimurium* ist der mit Abstand am besten erprobte und weltweit am meisten benutzte Test.

Zur Überprüfung des mutagenen Potentials von Wasser-, Schwebstoff- und Sedimentproben kann über chemische Extrakte der <Ames-Test> benutzt werden. Das Bakterium *Salmonella typhimurium his* ist eine Mutante, die das lebensnotwendige Histidin nicht synthetisieren kann und keine pathogenen Eigenschaften besitzt. Durch Behandlung mit einer chemischen Substanz können die Histidin-bedürftigen Mutanten durch Basensubstitution- oder Leserastermutationen zur prototrophen Form revertieren. *Salmonella typhimurium his* kann auf einem histidinhaltigen Agar gezüchtet werden und ist bei -70°C (203 K) lagerfähig. Im Mutagenitätstest werden die zu untersuchenden Proben und die Bakterien auf Histidin-Mangelnährböden aufgetragen und die Revertanten zu *Salmonella typhimurium his* über ihr Wachstum auf dem histidinfreien Nährboden

erfaßt. Die Anzahl der entstandenen Histidin-unabhängigen (his) Kolonien dient als Maß für mutagene Aktivität.

Verschiedene Stämme von *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* können zur Ermittlung von chemisch induzierten Genmutationen verwendet werden. Anfang der siebziger Jahre wurden dann auch Stämme entdeckt, die durch Verlust des Excisionsreparatursystems nicht mehr in der Lage sind, durch Chemikalien induzierte „fehlerhafte“ DNA-Bereiche auszubessern. Damit kommt es zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber mutagenen Substanzen. Durch die *rfa* (deep rough factor)-Mutation baut sich beispielsweise die Bakterien-Zellwand fehlerhaft auf, wodurch die Stämme in ihrer Virulenz geschwächt und nicht mehr pathogen sind. Zudem wird dadurch die Permeabilität der Zellwand erhöht, so daß Testsubstanzmoleküle leichter ins Innere der Zelle gelangen. Durch den Zusatz eines metabolisierenden Systems (S9-Mix) werden die Aktivierungsmöglichkeiten enzymhaltiger Organe des Säugetierorganismus für indirekte Mutagene mit einbezogen. Der zumeist verwendete S9-Mix entspricht dem Zentrifugen-Überstand eines Rattenleberhomogenats nach dem Zentrifugieren bei 9000 x g unter Zusatz eines NADPH-regenerierenden Systems. Über diese Möglichkeit der externen Beimengung von Metabolisierungs-Mischungen besteht die Möglichkeit, durch Variation derselben zusätzliche Hinweise auf mechanistische Zusammenhänge zu erhalten (Anwendung spezieller Homogenate aus unterschiedlichen Organen mit unterschiedlichen Enzymsystemen).

Hauptsächlich wurden bis heute Rückmutationssysteme, Vorwärtsmutationssysteme, die Veränderungen einzelner Basen (Basensubstitutionsmutation) oder Deletionen bzw. Insertionen einer oder mehrerer Basen (Leserastermutation) erfassen, entwickelt. Wichtig ist zudem noch, daß die Stämme verschiedene eigene Enzyme enthalten, wodurch eine sehr hohe Spezifität zu einzelnen chemischen Mutagenen bestehen kann (Nitroreduktase-Stamm).

Genotoxische Komponenten in Schwebstoffextrakten, Wasser- und Sedimentproben wurden mit Hilfe des AMES-Tests vielfach nachgewiesen.^[152,153,154] Für die Untersuchung zweier Elbe-Schwebstoffproben auf Genotoxizität wurde der **Arabinose-Resistenz-Test** verwendet, dabei wurden 3 verschiedene Zelllinien eingesetzt:

1. BA 9 Wild-Typ
2. BA 146 (Nitroreduktase) sensitiv für Nitroverbindungen
3. BA 149 (O-Acetyltransferase) sensitiv für Amino-Komponenten

Dieser Test verwendet Stämme, die sich aus *S. Typhimurium* LT2 ableiten. Sie weisen eine Deletion im Arabinose-Operon auf. Dieses Produkt wirkt bakteriostatisch und verhindert das Wachstum der Bakterienzellen, sofern keine Repressoren des Ara-Operons, wie „D-GLUCOSE“, vorhanden sind. In Gegenwart von Glycerol als Kohlenstoffquelle wird das Ara-Operon nicht reprimiert, so daß ausschließlich Mutanten wachsen können. Revertanten sind relativ selten. Treten Arabinose-resistente Zellen auf, so beruhen diese im wesentlichen auf Vorwärtsmutationen, die dazu führen, daß der Arabinose-Metabolismus zusätzlich an einer anderen, früheren Stelle gehemmt wird. Übergänge von Arabinose-empfindlichen zu Arabinose-resistenten Zellen spiegeln

Vorwärtsmutationen wider. Sie sind die Folge sowohl von Missense- und Nonsense-Basensubstitutionen als auch von Leserasterschüben und Deletionen.^[155]

Der in dieser Arbeit eingesetzte Ara-Stamm BA 9 wurde aus dem Ames-Stamm 100 erhalten, während aus dem Ames-Stamm TA 98 durch Konjugation der Ara-Stamm BA 14 konstruiert wurde.^[156]

Zur Detektion von mutagenen Nitro- und Aminoaromaten wurden die Gene für verstärkte Expression von „klassischer Nitroreduktase“ bzw. O-Acetyltransferase in den Stamm BA 14 eingeführt. Durch Transformation mit den R-Plasmiden pYG216 bzw. pYG219 entstanden die Ara-Stämme BA 146 und BA 149.^[157] Die beiden R-Plasmide tragen außerdem Gene für Tetracyclinresistenz. Eine Übersicht der Genotypen der in dieser Arbeit verwendeten Ara-Stämme gibt Tabelle 32.

Tabelle 32: Übersicht der in dieser Arbeit eingesetzten Ara-Stämme

Genetische Merkmale der in dieser Arbeit verwendeten Ara-Stämme von <i>S.typhimurium</i> .						
Stamm	his-Mutation	ara-Mutation	Zellwand	Reparatur	Plasmide	
BA 9	hisG46	araD531	rfa	Δ uvrB	pKM101	–
BA 14	hisD3052	araD531	rfa	Δ uvrB	pKM101	–
BA 146	hisD3052	araD531	rfa	Δ uvrB	pKM101	pYG216
BA 149	hisD3052	araD531	rfa	Δ uvrB	pKM101	pYG219

3.3.3 Testverfahren zur Untersuchung der Proben auf hormonelle Aktivität : MCF7-

Luciferase-Test:

Im Zusammenhang mit dem (anti)östrogenen bzw. (anti)androgenen Potential verschiedener Umweltschadstoffe werden in der Literatur biologische bzw. toxische Wirkungen sowohl für die Tierwelt als auch für den Menschen beschrieben. Zur Untersuchung von rezeptorvermittelten östrogenen Effekten stehen unterschiedliche *in vitro*- und *in vivo*-Testverfahren zur Verfügung. Wobei *in vivo*-Testverfahren von vornherein für die Anwendung als Kurzeittest zur Bestimmung der akuten Toxizität ausscheiden, da sie einen enorm hohen zeitlichen, materiellen und personellen Aufwand bedeuten. Zudem sollten *in vitro*-Tests auch aus ethischen Gründen bevorzugt verwendet werden. Im Bereich des toxizitätsgeleiteten Screenings bei Untersuchungen von Sediment- oder auch Wasserproben sind Aussagen, ermittelt anhand der Kurzeittests (*in vitro*) bezüglich östrogenen Aktivität (statt umfassend endokriner Wirkung), völlig ausreichend. Unterschiedliche Testsysteme sind mittlerweile für ökotoxikologische Screening-Verfahren, kombiniert mit chemischer Analyse für Sedimente, in der Anwendung. Relativ häufig wird die Stimulierung der Vitellogenin-Synthese als Biomarker für die Östrogenität von Chemikalien eingesetzt. Hierfür werden in der Regel Forellenhepatozyten (Leberzellen) verwendet, da es in der Leber der Fische viele Östrogenrezeptoren

(ER) gibt, welche eine ähnliche Aminosäuresequenz wie auch humane ER haben. Da es sich bei Forellenhepatozyten aber um Primärkulturen handelt, ist bei der Anwendung ein größerer Zeit- und Arbeitsaufwand notwendig als bei der Verwendung von stabilen permanenten Zelllinien. Diese Art des Biomarkers ist vor allem für Vergleiche unterschiedlicher Probenarten interessant, wie beispielsweise Wasser-, Sediment-Untersuchungen mit Felduntersuchungen ortstreuer Fische, denn die direkte Bestimmung des Vitellogenins kann im Blutplasma lebender Fische mit Hilfe monoklonaler Antikörper oder polyklonaler Seren erfolgen.

Rezeptor-Bindungsassays sind als eine Art Vortest anzusehen. Sie überzeugen durch geringen Arbeitsaufwand und liefern schnell Ergebnisse, sind aber auch meist sehr unspezifisch. Es wird lediglich qualitativ die Bindung an den Rezeptor gemessen, indem zumeist die Verdrängung von gebundenem isotope markiertem 17β -Östradiol (E₂) detektiert wird. In diesen Biotests kann daher keine Aussage bezüglich der biologischen Aktivität der Substanzen getroffen werden. MCF-7-Brustkrebszellen werden unter anderem auch im sogenannten E-Screen-Assay nach Soto et al. verwendet. Bei diesem Proliferationsassay wird an den östrogensensitiven Brustkrebszellen die Zunahme der Zellzahl in Abhängigkeit von der östrogenen Wirkung der getesteten Substanz bzw. Mischung bestimmt.

Prinzip des Testverfahrens zur Bestimmung östrogenener Potentiale:

Im Rahmen dieser Studie wurde ein Testverfahren eingesetzt, welches auf molekularer und zellulärer Ebene auf einer Wirkungskette basiert. Als Primärreaktion wird die Bindung eines Signalstoffes (Liganden) an den ER in Form eines aktiven Komplexes angesehen. Unterstützt von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, katalysiert dieser die Expression von östrogen-abhängigen Genen. Im Falle des Rezeptor-Reporter-Gen-Assays wird entsprechend das künstlich eingefügte Reporter-Gen reguliert und die Produktion von Luciferase induziert. Die Aktivität dieses Enzyms wird durch ein luminometrisches Verfahren bestimmt. Die Leuchtaktivität, die unter dem Einfluß von Fremdstoffen oder Stoffgemischen induziert wurde, wird mit der Wirkung einer Standardmenge des natürlichen Hormons 17β -Östradiol (E₂) verglichen. Entsprechend ist die gemessene Luciferase-Aktivität proportional zur Aktivierung der vorhandenen ER.

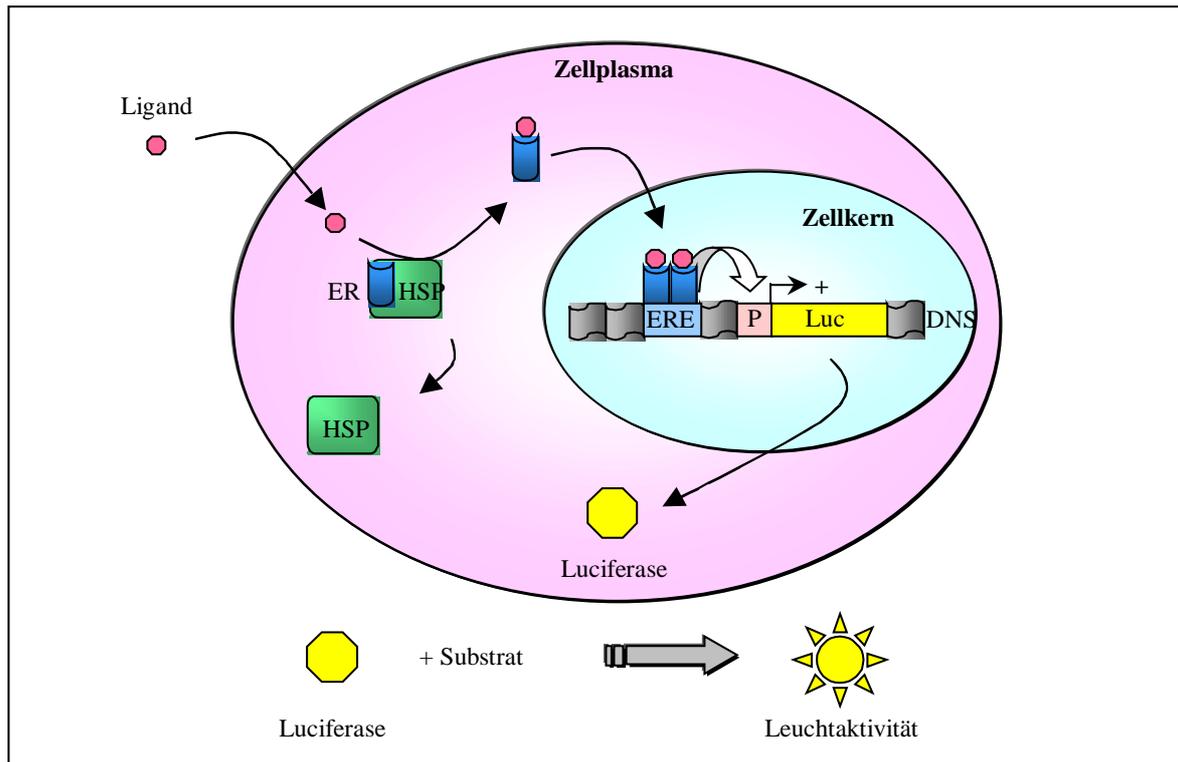


Abbildung 38: Schematische Darstellung des Testverfahrens zur Bestimmung östrogenener Potentiale. ER: Östrogen-Rezeptor; HSP: Heat Shock Protein; ERE: Östrogen Responsive Element; P: Promoter; Luc: Luciferase Reporter-Gen; DNS: Desoxyribonucleinsäure

Testorganismen

Es können verschiedene genetisch modifizierte Zelllinien eingesetzt werden:

- ⇒ MCF7-luc oder MVLN-Zelllinie: Hierbei handelt es sich um humane MCF-7-Brustkrebszellen, die mit einem Luciferase-Reporter-Gen stabil genetisch verändert wurden. Die Zelllinie beinhaltet von Natur aus Östrogen-Rezeptoren (*ER-alpha*, *ER-beta*) und stammt als adhären wachsende Zelllinie ehemals von einer Patientin mit einem metastatierende Adenokarzinom der Brust (SOULE et al. 1973). Diese Ziellinie ist sehr gut erforscht und wird daher vielfach in unterschiedlichen Testsystemen und Forschungslabors eingesetzt.
- ⇒ MELN-Zellen: Sie stammen von derselben Krebszelllinie, wie oben beschrieben. MELN-Zellen beinhalten jedoch einen stärkeren Promotor, wodurch eine höhere Expression des Reporter-Gens bei gleicher Stimulation ermöglicht wird. Daher eignen sich diese Zellen besonders für Untersuchungen an Stoffen oder Stoffgemischen mit niedrigen östrogenen Potentialen.

Auswertung der Ergebnisse:

Als Maß für die Stärke des netto-Wirkungspotentials der Proben wurden relative Wirkungsindizes bestimmt. Diese berechnen sich aus dem Quotienten zwischen der gemessenen Lumineszenz des Extraktes gegen die Lumineszenz, welche maximal durch E2 ausgelöst wurde. Der Wirkungsindex wird insgesamt noch mit den Lumineszenzen die für die Lösungsmittel-Kontrollen erhalten wurden abgeglichen.

Die unterschiedlichen Zelllinien können als Modelle für Körperzellen dienen, die sich hinsichtlich ihrer Reaktion auf Signalstoffe unterscheiden.

3.4 Anwendung der Methode und Überprüfung einzelner Arbeitsschritte anhand zweier Schwebstoffproben

Im folgenden sollen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit parallel Methodenentwicklung für ein biotestgeleitetes Screening erhaltenen Ergebnisse präsentiert werden. Ziel der Methodentwicklung war die Integration aller drei vorgestellten Testsysteme und der chemisch analytischen Arbeiten in einem einzigen Verfahren. Es wurden hierfür die einzelnen Verfahrensschritte anhand von organischen Extrakten zweier Schwebstoffproben der Elbe aus den Jahren 1995 und 1998 stufenweise untersucht. Um eine Methode für ein integratives, biotestgeleitetes Screening zu etablieren und die Funktionalität zu überprüfen, war es für die Vorversuche wichtig, Proben mit einer hohen Belastung durch verschiedene Schadstoffe zu untersuchen. Aus älteren Untersuchungen der gleichen Proben waren bereits orientierende Daten für zwei der hier beschriebenen toxikologischen Testsysteme vorhanden, was die Weiterentwicklung des Verfahrens erleichterte. In der ersten Testphase wurden daher Schwebstoff-Wochenmischproben aus der Elbe untersucht, welche bereits in den reinen toxikologischen Untersuchungen als auffällig erkannt worden waren.

Der in dieser Arbeit erreichte Stand der Analysenmethode schuf eine geeignete Basis für ein Zusammenspiel mit toxikologischen Biotests. Über die Mini-Kieselgel-Chromatographie wird bereits eine gute Auftrennung der extrahierten Substanzen in unterschiedliche Schadstoffklassen erreicht. Die über das analytische Clean-up erzielte Aufteilung der Schadstoffe, zum einen nach Polarität, zum anderen nach molekularer Größe, schafft die Möglichkeit, Kontaminanten, aber auch toxikologische Effekte in ein und demselben Proben-Eluat zu untersuchen. Es wird somit eine höhere Substanz-Wirkungs-Korrelation erreicht als für das Arbeiten mit Rohextrakten. Ein Bezug auf extern ermittelte Toxizitätsdaten ist dann nur noch von ergänzender Bedeutung. Die wesentlichen Modifikationen der hier erarbeiteten Methode stellen, im Vergleich zur traditionellen Rückstandsanalytik lipophiler Stoffe in Sedimenten, entscheidende Vorteile in bezug auf die Vielfalt der erfaßten Stoffe dar:

- Extraktion des Feuchtsedimentes (inkl. Porenwasser)
- keine Reduzierung der Extrakte bis zur Trockne
- schonende Abtrennung des elementaren Schwefels mit Hilfe der Größenausschluß-Chromatographie (GPC)

Für eine parallele Bestimmung von Schadstoffen und toxikologischen Effekten war es unerlässlich, die gesamten methodischen Abläufe vorab auf ihre Verträglichkeit auch für die ökotoxikologisch relevanten Testsysteme (Bioassays) zu prüfen. Ein besonderes Augenmerk galt dabei der Randbedingung, daß die Untersuchung mit Sediment-Extrakten durchgeführt werden mußte. Ökotoxikologische Verfahren, bei denen das sogenannte „native Sediment“ direkt eingesetzt wird, wurden nicht einbezogen. Die verwendeten Lösungsmittel weisen häufig schon in geringen Konzentrationen toxische Effekte in den Biotests auf. Daher war in jedem Fall zu überprüfen, ob die Lösungsmittel direkt eingesetzt werden können oder ob vor den toxikologischen Tests ein Austausch erfolgen mußte.

Die Unverträglichkeit zwischen chemischer Analyse und biologischem Screening zeigt sich immer wieder in relativ hohen Zelltoxizitäten der Probenextrakte. Für hohe Anreicherungen ist dies meist der limitierende Faktor, da hierdurch ein Test auf spezifische Toxizitäten nicht mehr möglich ist. Über eine hohe Verdünnung der Probenextrakte können cytotoxische Effekte verringert werden, jedoch werden möglicherweise Konzentrationsbereiche übersprungen, in denen Effekte zu erwarten wären.

Die zu entwickelnde Methode sollte sich mit den bereits etablierten ökotoxikologischen Testsystemen kombinieren lassen bzw. diese sinnvoll ergänzen. Durch Kooperationen mit toxikologischen und ökotoxikologischen Arbeitsgruppen standen die bereits vorgestellten Biotests zur Verfügung. Dies bedeutete, daß an einigen Punkten für die unterschiedlichen Testsysteme geeignete Kompromisse gefunden werden mußten.

Die bei jeder chemischen Analyse notwendigen Aufreinigungsschritte dienen der Schadstoffanreicherung und Matrixabtrennung (störende Begleitstoffe, biogene Komponenten). Es ist nicht ausgeschlossen, daß durch Abtrennung von Begleitstoffen wie Huminsäuren, Chlorophyll oder auch Lipiden gleichzeitig toxikologische Effekte reduziert bzw. verändert werden. Gagné et al. konnten nach Abtrennung makromolekularer Bestandteile eine Toxizitätserhöhung feststellen und führten dies auf vorherrschende Maskierungseffekte zurück.^[158] Ein abgestuftes Screening-Verfahren erschien daher am geeignetsten, um so Zeit- als auch Kostenaufwand gering zu halten. Eventuell auftretende Toxizitätsveränderungen als Effekt einzelner Aufarbeitungsschritte wurden durch das Stufen-Schema fortlaufend beobachtet. Abbildung 39 zeigt die Vorgehensweise, die hierfür erarbeitet wurde. Die speziell zum Clean-up und Fraktionierungsverfahren durchgeführten Versuche werden im Ergebnisteil für die Biotests abschließend beschrieben und diskutiert.

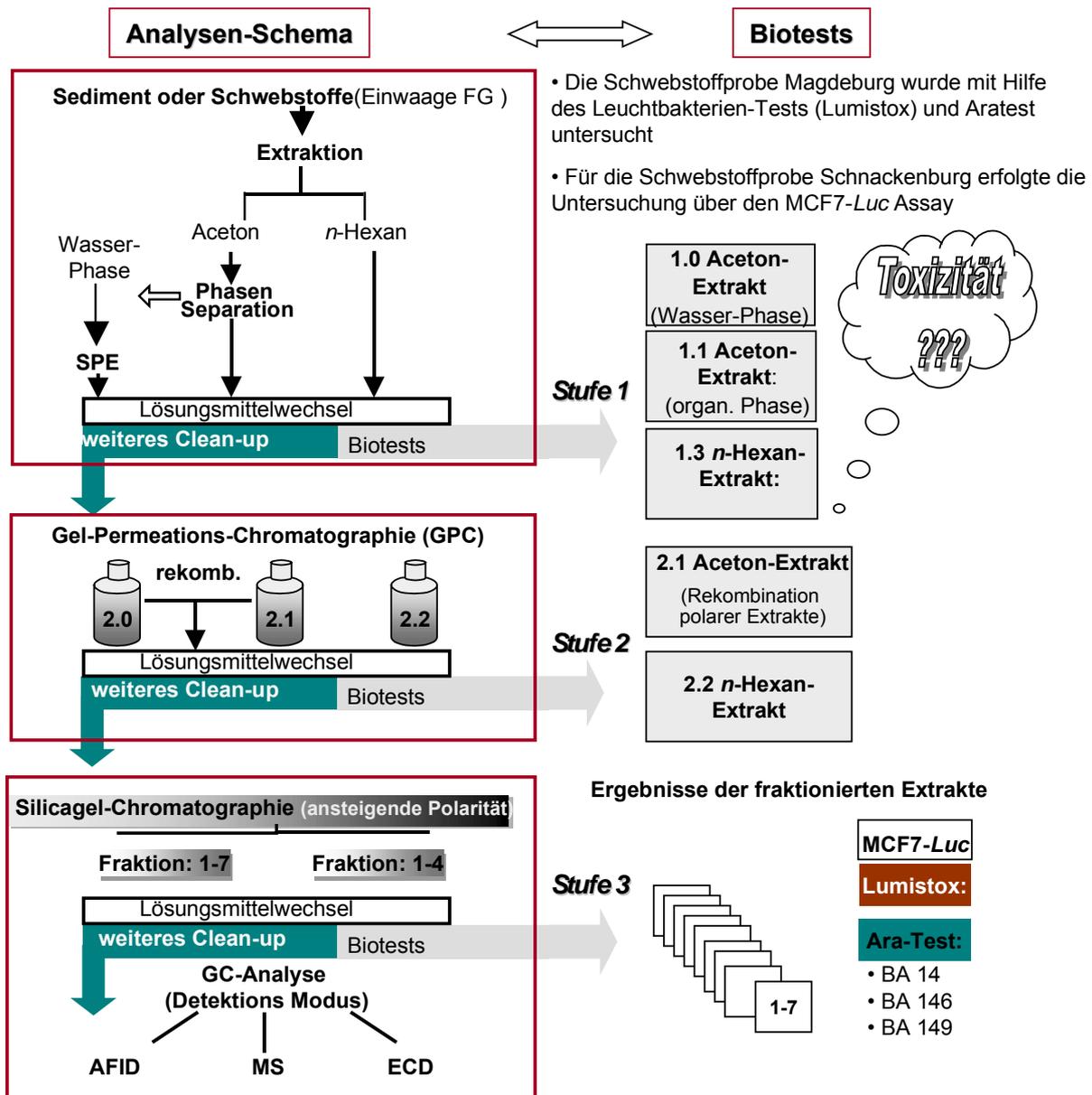


Abbildung 39: Analysen-Schema für die toxizitätsgeleitete Analyse

Allgemein stellte sich die Frage, ob Material, das für ein analytisches Clean-up benötigt wird, möglicherweise Toxizität auslöst. Die nachfolgend aufgelisteten Fragestellungen gilt es hierbei erneut zu berücksichtigen:

- ⇒ Probenahme: Welches Verfahren ist am ehesten geeignet, ohne mögliche toxische Effekte hervorzurufen oder zu beeinflussen?
- ⇒ Probenlagerung: Welche Rolle spielt die Probenbehandlung vor der Extraktion? (Homogenisierung und Abtrennung von Porenwasser)
- ⇒ Welche Rolle spielt die Labor-Hintergrundbelastung ?
- ⇒ Verträglichkeit der verwendeten Lösungsmittel für die Biotests.

- ⇒ Extraktion: Werden eventuell durch die Extraktionsmethode Substanzen diskriminiert ? Kann es zu chemischen Reaktionen während der Extraktion kommen, welche die Toxizität des Extraktes verringert oder verstärkt ?
- ⇒ Ergeben sich durch die notwendigen Clean-up-Schritte Verluste im Hinblick auf toxikologische Effekte ?

3.4.1 Probenahme

Die generell zur Verfügung stehenden Methoden der Sediment-Probenahme wurden bereits im einführenden Kapitel der Sedimente beschrieben. Für die toxikologischen Untersuchungen gelten ähnliche Kriterien, um eine ausreichende Qualität der Probe zu erhalten.

Grundsätzlich hängt die Wahl eines geeigneten Probenahmeverfahrens vom Untersuchungsziel ab. Für toxikologische Untersuchungen sollten nach Angaben der „American Society for Testing and Materials“ (ASTM) Sedimente verwendet werden, deren Zustand soweit wie möglich Freilandverhältnissen entsprechen.^[159] Dies gewährleisten am ehesten Sedimentausschnitte über Sedimentkerne (Corer).^[160] Stemmer, Burton et al. und die EPA kamen zu dem Ergebnis, daß die gemessene Toxizität nach Probenahme mit Corern deutlich höher lag als für Proben, die mit Hilfe eines Ekman-Rechens genommen worden waren. Sedimente sind häufig sehr inhomogen und dadurch sind die Tiefe, Korngröße und allgemeine Zusammensetzung des Sedimentprofils von entscheidender Bedeutung. Die Wahl der Geräte sollte unter Berücksichtigung dieser Kriterien erfolgen. Aus der Sedimentoberfläche (ca. 2 cm) können die „aktuellsten“ Informationen zur Schadstoffbelastung erhalten werden, daher ist für eine „momentane Bestandsaufnahme“ diese Probentiefe am gebräuchlichsten. Tiefer gelegene Schichten spiegeln Schadstoffgehalte für definierte Zeiträume wider. Die potentielle Kontaminationsgefahr durch den Probensammler und das Probenbehältnis muß für jede Technik der Probenahme zuerst geprüft werden, um so mögliche Hintergrundeffekte auszuschließen. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß keine chemischen Interaktionen (Redoxreaktionen) mit Behältern bzw. Änderungen in der biologischen Aktivität entstehen können.

Die hier beschriebenen Arbeiten wurden mit Schwebstoff-Wochenmischproben aus sogenannten Sedimentfallen (Durchfluß-Aquarien) durchgeführt, welche für die Phasen der Methodenentwicklung und der Vorversuche aus den bereits genannten Gründen am geeignetsten erschienen.

3.4.2 Probenlagerung

Die Sedimentproben können entweder bei – 20 °C (253 K) oder auch –70 °C (203 K) tiefgekühlt werden oder alternativ wenige Tage bei 4 °C (277 K) im Dunkeln gelagert werden. Eine Tiefkühlung unmittelbar nach der Entnahme der Proben gilt vor allem für Sedimentkerne als die beste Konservierungsmethode, da so die Zusammensetzung und Struktur des geschichteten Sedimentes am besten erhalten bleibt.

Schuyttema et al. beobachteten für tiefgekühlte Sedimente jedoch eine signifikante Änderung der Toxizität im Vergleich zur Kaltlagerung bei 4 °C (277 K), was die Autoren auf unpolare halogenierte Kohlenwasserstoffe (Endrin, DDT) zurückführten.^[161] Diese Veränderungen sind wahrscheinlich sehr

von den verwendeten Biotests, den speziellen Substanzcharakteristiken sowie dem Gehalt an organischen Kohlenstoff abhängig. Signifikante Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung des Porenwassers konnten hingegen auch bei einer Lagerung schon nach 24 h (4°C, 277 K) nachgewiesen werden.^[162]

Die Proben sollten möglichst gering durch das Probenaufbewahrungsgefäß belastet werden. Eine Konservierung der frischen Proben in Plastikgefäßen, welche zumeist einen hohen Gehalt an Phthalsäureestern und anderen organischen Weichmachern aufweisen, sollte daher grundsätzlich vermieden werden. Es besteht dabei immer die Gefahr einer Kontamination der Probe durch entweichende Substanzen, wie z.B. der organischen Phosphorsäureester, wobei die entsprechenden Stoffmengen dieser Plastikzusätze durchaus Effekte in einer bioanalytischen Untersuchung auszulösen vermögen.^[163] Die hier verwendeten Schwebstoffproben wurden kurzzeitig in PE-Falkon-Röhrchen zwischengelagert, da diese sich als erheblich einfacher in der Handhabung erwiesen. Die Röhrchen wurden daher vor ihrer Verwendung auf einen potentiellen Effekt hin geprüft, wobei in allen Fällen ein negativer Befund erhalten wurden.

Der zeitliche Aufwand, um eine Probe insgesamt zu bearbeiten, ist hoch, eine Zwischenlagerung der Proben ist damit unumgänglich. Es erschien am sinnvollsten, die Proben tiefzugefrieren bei -70 °C (203 K) bzw. -20°C (253 K). Eventuelle Verluste der toxischen Aktivität mußten unter den gegebenen Umständen hingenommen werden.

3.4.3 Prüfung auf potentielle Effekte durch vorhandene Laborbelastungen

Zu jeder untersuchten Schwebstoffprobe wurde unter den gleichen Bedingungen ein Kontroll-Extrakt für die Hintergrundbelastung erstellt, der sowohl über GC-MS als auch als Negativ-Kontrolle in den verwendeten Biotests untersucht wurde. Die Prüfung auf Mutagenität verlief für alle „Kontrollen“ (BW) negativ, ebenso wurden keine Effekte im MCF7-Luciferase Assay festgestellt. Für einzelne Blindproben wurde jedoch eine Hemmung der Lumineszenz im Leuchtbakterientest beobachtet, deren Ursache auf die Eigentoxizitäten der verwendeten Lösungsmittel zurückgeführt wurde. Für die Untersuchung unter Verwendung von Leuchtbakterien war es daher unbedingt notwendig, das im Testmedium eingesetzte Wasser von Lösungsmittelresten vollständig zu befreien. Weitere Untersuchungen werden im Kapitel 3.4.6 besprochen.

Tabelle 33 : Durchgeführte Überprüfungen auf Hintergrundbelastungen, hervorgerufen durch das Extraktionsverfahren

Extraktionsverfahren*	Ara-Test	Lumistox	MCF7-Luc
Soxhlet-Extrakt (Aceton)	-	-	-
Soxhlet-Extrakt (n-Hexan)	-	-	-
Soxhlet-Extrakt (Toluol)	-	Nicht untersucht	Nicht untersucht

*Alle Blindextrakte wurden vor ihrem Einsatz im Biotest in DMSO überführt

3.4.4 Prüfung der Lösungsmittel auf ihre Verträglichkeit in den Biotests

Die in der Analytik gängigen Lösungsmittel sind häufig aufgrund ihrer hohen Toxizität für den direkten Einsatz in Biotests ungeeignet. Darüber hinaus sind viele organische Lösungsmittel nicht wasserlöslich, biologische Tests hingegen werden im wässrigen Milieu durchgeführt. Vor dem Einsatz der Lösungsmittel Aceton/*n*-Hexan und weiterer Solventien im biologischen Test mußte zum einen geprüft werden, ob sie bei Verwendung eines sogenannten „Keepers“ restlos entfernt werden können, und zum anderen mußte die Toxizität des verwendeten Keepers in den einzelnen Biotests untersucht werden. Für Biotests geeignete Lösungsmittel (außer Wasser) sind DMSO, Methanol, Ethanol und teilweise auch Aceton. DMSO erschien zunächst aufgrund der Eigenschaft, viele lipophile und hydrophile Substanzen zu lösen, am besten geeignet. Die nachfolgende Tabelle stellt die durchgeführten Lösungsmittel-Verträglichkeitstests mit DMSO als „Keeper“ aller verwendeten Bioassays dar. Hierbei wurden nach „SOP-LW-DMSO“ Lösungsmittel-Kontrollen in DMSO überführt, so daß die verschiedenen Lösungsmittel rückstandslos entfernt wurden. Ferner wurden für alle Testverfahren maximale Toleranzen für DMSO bestimmt, bei deren Überschreitung eine Toxizität ausgelöst wird. Der maximal einsetzbare Gehalt an DMSO ist in der folgenden Tabelle in Prozent angegeben.

Tabelle 34: Durchgeführte Prüfungen auf Lösungsmittelverträglichkeit der Biotests, jeweils nach Überführung in DMSO

EXTRAKTIONSMITTEL	MCF-7-LUC	Genotox.-Tests	Leuchtbakterien-Test
Anteil DMSO in der Biotestlösung	1 %	max 5 %	1 %
Ethanol	-	-	-
Dichlormethan (DCM)	-	-	-
Aceton	-	-	-
<i>n</i> -Hexan	-	-	-
Essigester (EE)	-	-	-
Methanol	-	-	-
Cyclohexan/EE (1:1)	-	-	-
<i>n</i> -Hexan/DCM (4:6)	-	-	-
DCM/EE (1:1)	-	-	-
<i>iso</i> -Octan	-	-	-

Die Untersuchungen ergaben, daß für die in Tabelle 34 angegebenen Lösungsmittel ein Wechsel in DMSO im Rahmen der vorher ermittelten maximalen Toleranz (in %) möglich ist. Die jeweiligen Lösungsmittel wurden vollständig entfernt, daher wurde keine Toxizität in den DMSO-Lösungen beobachtet. Somit können die untersuchten Solventien während des Clean-ups verwendet werden, sofern vor toxikologischer Prüfung ein Lösungsmittelwechsel zu DMSO erfolgt.

Der Leuchtbakterientest erwies sich als sehr lösungsmittelsensibel. Hierfür wurde eine maximale DMSO-Toleranz von 1 % ermittelt, wodurch die Anreicherung der Extrakte stark eingeschränkt wird. Generell ist eine Limitierung auf 0,5 – 2 % DMSO in dem jeweiligen Testmedium keine ideale Lösung, da über eine Aufkonzentrierung der Extrakte erzielte hohe Anreicherungsfaktoren hierdurch wieder

aufgehoben werden. Tabelle 35 zeigt Ergebnisse für die Toxizität verschiedener Lösungsmittel im Leuchtbakterientest, die aus unterschiedlichen Arbeiten zusammengestellt wurden. Die ermittelten EC₅₀-Werte unterliegen je nach Publikation Schwankungen um zum Teil eine Zehnerpotenz.

Tabelle 35: EC₅₀-Werte verschiedener Lösungsmittel im Leuchtbakterien-Test (übernommen aus [150])

Lösungsmittel	EC ₅₀ (mg/L)	Testzeit (min)
Aceton	28900	5
	28900	15
Ethylacetat	5200	5
	5900	15
Acetonitril	22300	15
DMSO	56700	15
Methanol	124700	5
	11400	15
Ethanol	55400	5
	23000	15
Toluol	52	5
	20	15
Dichlormethan	2800	15
Benzol	214	5
	238	15

Speziell für den Leuchtbakterien Test wurden von Reineke erweiterte Versuche zur Überführung der erhaltenen chemischen Fraktionen in Wasser durchgeführt. Die Verwendung von Aceton als Lösungsvermittler in Wasser erwies sich schließlich als die am besten geeignete Methode, um hohe Anreicherungsfaktoren zu erhalten. Bei Lösungsmittelwechseln von organischen Extrakten zu wässrigen Lösungen besteht allerdings eine starke Begrenzung durch die zum Teil sehr geringe Löslichkeit lipophiler Substanzen. Generell lösen sich die Stoffe meist weit weniger gut in Wasser, als in organischen Lösungsmitteln. Bei hoher Anreicherung kann es zur Ausbildung fester Rückstände kommen, die dadurch für den Biotest nicht verfügbar sind. Die Kompatibilität zu den Ergebnissen der chemischen Analytik wird hierdurch aufgehoben.

3.4.5 Vergleich unterschiedlicher Extraktionsmethoden und Extraktionsmittel

Für Sedimenttoxizitätstests stehen prinzipiell verschiedene Testphasen zur Auswahl:

- Sediment-Extrakte: Es werden organische Lösungsmittel verwendet und sie können im Zelltest oder auch in Reinkulturen von Mikroorganismen eingesetzt werden.
- Sediment-Eluate: Sediment wird mit Wasser geschüttelt. Sie eignen sich vorwiegend für die Simulation von Baggereffekten und werden vor allem für Testorganismen wie benthische Invertebraten, Reinkulturen von Mikroorganismen oder auch Fische verwendet.

- ➔ Sediment-Porenwasser: Wird durch Zentrifugieren oder über Porenwasserpressen erhalten. Metalle sind aufgrund ihres ionischen Charakters häufig hoch im Porenwasser konzentriert. Ebenso weist das Wasser hohe Gehalte an anorganischen Salzen auf, welche ebenfalls toxische Effekte auszulösen vermögen.
- ➔ Gesamtsediment (Festphase + Porenwasser): Die Verwendung des Gesamtsedimentes als Testphase dient der Bestimmung der gesamten Toxizität, welches auch Sediment-Ingestierer, benthische In- und Epifauna und benthische Fische einbezieht.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen mit Extrakten des Gesamtsedimentes durchgeführt. Hierfür standen unterschiedliche Extraktionsmittel und Extraktionsmethoden zur Verfügung:

1. Soxhlet-Extraktion; Temperatur und Extraktionszeit werden durch das verwendete Lösungsmittel vorgegeben (30°-80°C/303 – 353 K).
2. Kalt-Extraktion unter Verwendung einer Schüttel-Apparatur: Die Extraktion erfolgt bei Raumtemperatur oder bei zusätzlicher Kühlung (4°-21°C/277 – 294 K).

Die beteiligten Arbeitsgruppen des Kooperationsprojektes nutzten bis zu diesem Zeitpunkt jeweils unterschiedliche Extraktionsmethoden bzw. Extraktionsmittel. Für die sehr verschiedenen Methoden mußte über geeignete Kompromisse ein einheitliches Verfahren gefunden werden. Die Auswahl des Extraktionsverfahrens hängt von dessen Eignung für das jeweilige Testsystem, aber auch vom zeitlichen und praktischen Aufwand ab. Bisher wurde für die Untersuchungen von schwebstoffbürtigen Sedimenten auf hormonelle Aktivität ein Kaltextraktions-Verfahren mit EtOH/DCM bei 4 °C (277K) bevorzugt, um u.a. thermisch labile Komponenten, wie z.B. einzelne Steroide nicht bereits durch das Extraktionsverfahren zu eliminieren.^[164] Da eine Reihe von Analyten bzw. Wirkstoffen zum Teil leicht flüchtig, aber auch thermisch labil sein können, eignen sich hier vorwiegend schonende Verfahren. Die besten Ergebnisse im Hinblick auf die Untersuchungen zur Genotoxizität wurden bisher mit Methanol/Toluol-Soxhlet-Extrakten erzielt.

Intention der Zusammenarbeit war es, über die Erweiterung der einzelnen Methoden und durch Einführung von Fraktionierungstechniken konkrete Ursachen für beobachtete Effekte zu ermitteln. Im Idealfall sollte die Fraktionierung der Probe bis zur Isolierung von Einzelstoffen führen. Dies setzt voraus, daß sich die erhaltenen Extrakte für weitere Fraktionierungstechniken eignen (HPLC, Silica, Alox etc.), was zumeist einen hohen Aufwand durch Lösungsmittelwechsel erfordert. Verschiedene Extraktionsmittel wurden auf ihre chemisch-analytische Eignung und die jeweilige Verträglichkeit im Biotest geprüft.

Für einen Methodenvergleich mit der Arbeitsgruppe des Institutes für Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft wurden verschiedene Extraktionen der Schwebstoffprobe "Schnackenburg" (Elbe) vorgenommen. Es wurde eine sequenzielle Kalt-Extraktion unter Verwendung von a) Ethanol (EtOH-Extrakt) und b) Dichlormethan (DCM-Extrakt) durchgeführt und entsprechend dem in Abbildung 39 gezeigten Analyse-Schema aufgearbeitet. Anschließend wurden die Fraktionen dieser Probenextrakte mit den entsprechenden Fraktionen der Soxhlet-Extrakte a) Aceton und b) *n*-Hexan (HE) vergleichend untersucht. Letztere wurden nach dem Verfahren der vorliegenden Arbeit erhalten. Die Methode der vorliegenden Arbeit wurde zudem mit dem bisher verwendeten Verfahren der

Arbeitsgruppe des Instituts für Experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (Abteilung für Toxikologie) verglichen, welche die Mutagenität der Probenextrakte untersuchte: Hierfür wurde eine gefriergetrocknete Elbe-Schwebstoffprobe (Schmilka) sequenziell extrahiert, wobei zuerst mit dem lipophilen Lösungsmittel Toluol (Toluol-Extrakt TE) und anschließend mit dem polaren Lösungsmittel Methanol (MeOH-Extrakt) extrahiert wurde.

Tabelle 36: Für Vergleichsuntersuchungen ausgewählte Extraktionsmittel und -verfahren

EXTRAKTIONSMITTEL	KALTEXTRAKTION (4 °C/277 K)	SOXHLET-EXTRAKTION
Ethanol	Primärextrakt	75 °C (198 K), 24 h, Primärextrakt
Dichlormethan	Sekundärextrakt	40 °C (233 K), 12 h, Primärextrakt
Aceton	-	40 °C (233 K), 8 h, Primärextrakt
Methanol	-	40 °C (233 K), 12 h, Sekundärextrakt
<i>n</i> -Hexan	-	40 °C (233 K), 8 h, Primärextrakt

3.4.5.1 Vergleich polarer Lösungsmittel für die Primärextrakt-Gewinnung:

■ *Alkohole und Aceton*

Alkohole sind gut mischbar mit Wasser und zeigen eine stärkere Hydrophilie als viele andere organische Lösungsmittel. Durch Verwendung von Methanol oder Ethanol als erstes Extraktionsmittel, wird dem Feuchtsediment Wasser entzogen, und es kann im folgenden Extraktionsschritt mit einem lipophileren Extraktionsmittel nachextrahiert werden. Für sequenzielle Extraktionsverfahren ist dies Voraussetzung. Die gute Mischbarkeit mit Wasser stellt allerdings auch ein großes Problem dar: Es ist bei Alkohol-Wasser-Gemischen unmöglich, Wasserphase und alkoholische Phase schonend für eine getrennte weitere Bearbeitung zu isolieren. Schwierigkeiten bei der Handhabung der Extrakte führten insgesamt zu Diskriminierungen der Analyten bzw. auch zum Verlust der wäßrigen Phase. Ebenso mußten lange Extraktionszeiten für Methanol (12-24 h) und Ethanol (24-48 h) gewählt werden. Die Extraktion mit Ethanol muß überdies bei ungünstig hohen Temperaturen von 80 °C (353 K) durchgeführt werden. Proben mit sehr hohen Wassergehalten erfordern zudem noch eine weitere Erhöhung der Temperatur.

Im Vergleich zu anderen organischen Lösungsmitteln erscheinen Alkohole durch ihre hohe Hydrophilie und der damit verbundenen Fähigkeit, hochpolare Verbindungen zu extrahieren, anderen organischen Solventien überlegen. Für die Handhabbarkeit der Methode insgesamt wurden sie hier aber als eher ungeeignet eingeschätzt:

- ⇒ Die GC-MS-Analyse der erhaltenen Fraktionen für den Ethanol-Extrakt zeigte im Vergleich zu den Fraktionen des Aceton-Extraktes besonders für die unpolaren Fraktionen größere Unterschiede in der stofflichen Zusammensetzung.
- ⇒ Für typische Vertreter der chlororganischen Verbindungen, wie die chlorierten Benzole oder aber auch Butadiene, wurden entweder Koelutionen mit langkettigen Kohlenwasserstoffen und Terpenen beobachtet oder sie wurden möglicherweise auch weniger gut erfaßt, wodurch

insgesamt eine Zuordnung bzw. Identifikation dieser Substanzen in Fraktion 1 des EtOH-Extraktes erschwert war. In Fraktion 1 des Aceton-Extraktes waren die Verbindungen im vorderen Retentionsbereich jedoch deutlich erkennbar.

Die Abbildung 40 stellt die Total-Ionenstrom-Chromatogramme beider Extrakte für Fraktion 1 gegenüber.

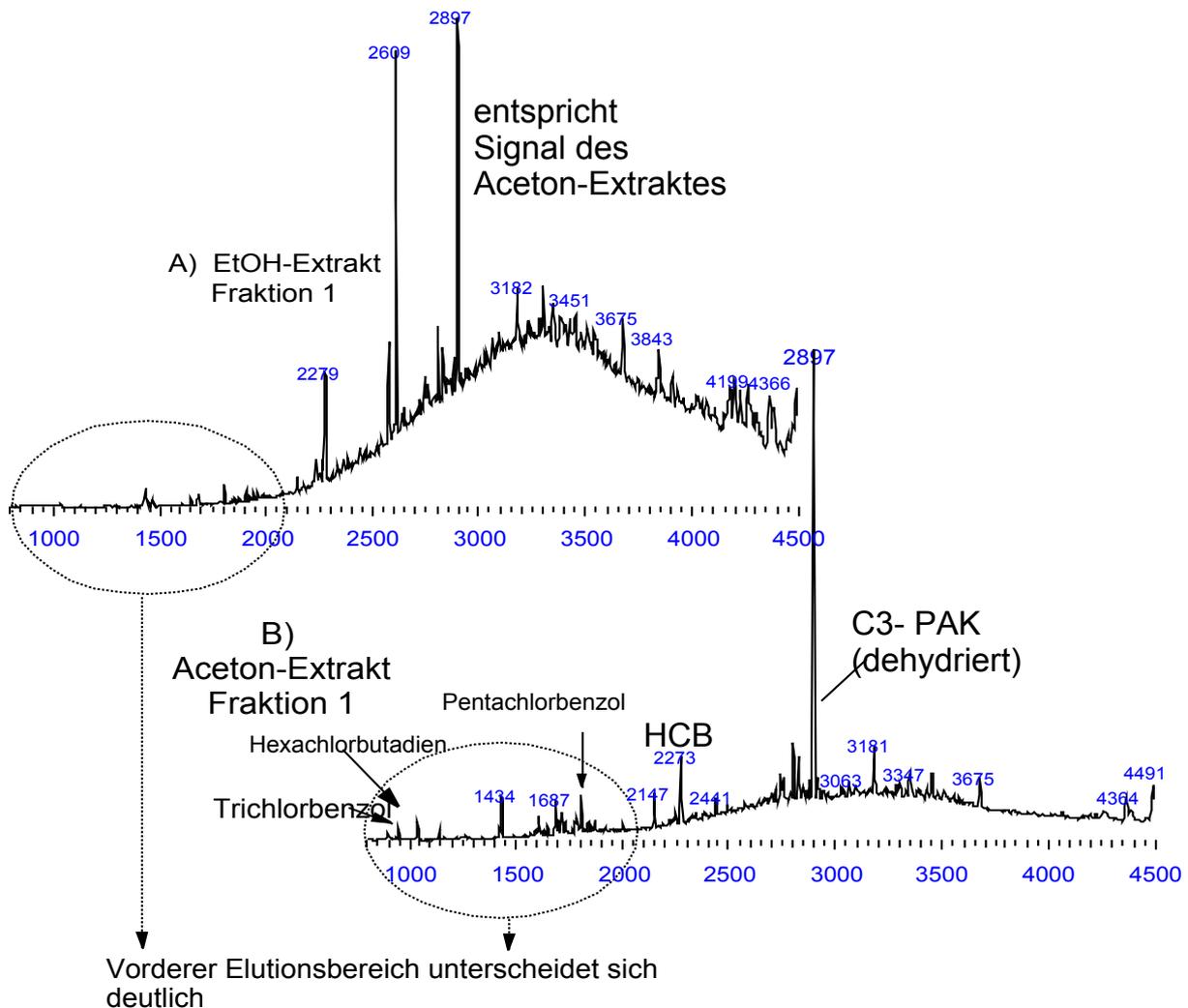


Abbildung 40: Vergleich der erhaltenen Chromatogramme für den A) Ethanol- Extrakt und B) Aceton-Extrakt der Schwebstoffprobe 2 (Schnackenburg); Silica-Fraktion 1

Methanol wird häufig als Extraktionsmittel für Tests zur Prüfung auf Mutagenität verwendet.^[10,152,154] Es galt zunächst zu prüfen, ob durch die Verwendung von Methanol zum einen Wirkstoffe erfaßt werden, die ein besonders hohes mutagenes Potential aufweisen, und zum anderen ob jene durch Aceton nicht erfaßt werden. Der hierzu durchgeführte Screening-Versuch ergab keine signifikanten Hinweise auf Unterschiede (siehe auch Abschnitt 3.4.7.2). Insgesamt wurde im MeOH-Extrakt ein höherer Anteil an Methylestern und alkylierten aromatischen Aldehyden im Vergleich zum Aceton-Extrakt nachgewiesen. Es ist nicht auszuschließen, daß eine Reihe an Substanzen durch die höheren Temperaturen der Soxhletextraktion im Sedimentextrakt erst entstehen.

Für die chemische Analyse entspricht Aceton am ehesten den gestellten Anforderungen (siehe auch Kapitel 2). Durch die spezifischen Eigenschaften des Acetons, wie z.B. ein geringer Siedepunkt und hoher Dampfdruck, bietet dieses Solvenz eine schonende Möglichkeit, polare als auch unpolare Substanzen aus der Probe anzureichern und anschließend für die einzelnen Analyseverfahren verfügbar zu machen. Lösungsmittelwechsel gestalten sich mit Aceton wesentlich unkomplizierter als bei Verwendung der Alkohole. Aceton ist ein polares Extraktionsmittel und mit Wasser mischbar. Durch Solvenzwchsel zu *n*-Hexan wird eine Phasentrennung in wäßrige und organische Phase mit separater Aufarbeitung, Fraktionierung und Analyse möglich. Einziger Nachteil im Vergleich zu den Alkoholen ist die relativ hohe Eigentoxizität, die Aceton in den meisten Biotests aufweist, während sich EtOH und MeOH häufig als weniger toxisch erwiesen und damit auch in größeren Mengen in der Testlösung enthalten sein können. Dies bedeutet insgesamt, daß die vollständige Entfernung von Aceton aus den wäßrigen Proben für die Biotests eine entscheidende Rolle spielt.

Einige Testsysteme tolerieren geringe Anteile von Aceton (1 - 2 %) in den wäßrigen Probenfraktionen. Ferner eignet es sich gut als Lösungsvermittler für lipophilere Inhaltsstoffe bei der Umwandlung der organischen Probenextrakte in Wasser für die toxikologischen Untersuchungen.

3.4.5.2 Vergleich von lipophilen Extraktionsmitteln für den Sekundärextrakt

Dichlormethan wird trotz des von ihm ausgehenden gesundheitlichen Risikos häufig eingesetzt. Die Leistungsfähigkeit als organisches Extraktionsmittel ist hoch, was sich in kurzen Extraktionszeiten bemerkbar macht. Vorteilhaft aus chemisch analytischer Sichtweise ist der niedrige Siedepunkt und Dampfdruck, wodurch DCM schonend aus den Probenextrakten entfernt werden kann. Zum Schutz der Umwelt und aus gesundheitlichen Gründen sollte aber auf die Anwendung größerer Mengen halogener Lösungsmittel (200 mL für Soxhlet-Extrakte) verzichtet werden.

Für den Methodenvergleich wurde ein Dichlormethan-Kaltetextrakt fraktioniert und über eine GC-MS-Analyse vergleichend untersucht. Die „Rohextrakte“ der Kalt- und Soxhletextraktionen wurden zuvor auf ihre hormonelle Wirkung hin untersucht (s.a. Abschnitt 3.4.8). Das Ergebnis der GC-MS Untersuchung zeigte, daß zum einen im DCM-Nachextrakt Substanzen auftraten, die zuvor bereits im ethanolischen Extrakt nachgewiesen worden waren. Daher ist anzunehmen, daß die primäre Kaltextraktion nicht vollständig verlaufen ist. Jedoch konnten zudem im DCM-Extrakt lipophile Substanzen zugeordnet werden, die im primären EtOH-Extrakt nicht enthalten waren. Insgesamt war auch in diesem Fall die Analyse der zweiten (sekundären) Extrakte durch eine geringere Gesamtbelastung vereinfacht. Dies galt in der vorliegenden Arbeit jedoch generell für einen Zweitextrakt einer Sedimentprobe. Über ein kombiniertes Extraktionsverfahren mit Ethanol und DCM kann somit ebenso wie mit der sequenziellen Extraktion Aceton/*n*-Hexan ein breites Substanzspektrum erfaßt werden. Jedoch erschien der Anteil sogenannter biogener Komponenten bzw. nicht abtrennbarer Matrix im ethanolischen Extrakt insgesamt höher als im acetonischen Extrakt.

Toluol wird eher selten als Extraktionsmittel eingesetzt. Die gefriergetrocknete Schwebstoffprobe aus Schmilka (Elbe) wurde im ersten Schritt mit Toluol extrahiert und anschließend mit Methanol nachextrahiert. Beide Probenextrakte wurden für die Analyse fraktioniert und mit Hilfe des GC-MS analysiert. Die erzielten Ergebnisse sind im Abschnitt 3.4.7. dokumentiert. Toluol besitzt grundsätzlich ein sehr hohes Extraktionsvermögen für aromatische Verbindungen, daher ist es das Lösungsmittel

der Wahl für die genotoxikologischen Tests. Ein sehr hoher Siedepunkt und leichte Oxidierbarkeit sprechen aus chemisch-analytischer Sicht gegen eine Verwendung. Die Analyse zeigte wiederum eine extrem hohe Anreicherung organischer Komponenten im Primärextrakt (Toluol) und eine wesentlich geringere Belastung für den Sekundärextrakt. Signale polarer Komponenten, die im MeOH-Extrakt erkennbar waren, können möglicherweise ebenso auch schon im Toluolextrakt vorhanden gewesen sein, wurden jedoch aufgrund der insgesamt stärkeren Belastung von Signalen anderer Komponenten überlagert.

n-Hexan ist direkt und universell für chromatographische Trennungen und Analysen einsetzbar, und es ist daher als unpolares Zweitextraktionsmittel sehr empfehlenswert. Seine Eignung für ökotoxikologische Untersuchungen war hingegen noch es zu prüfen. Vorteil der Verwendung von *n*-Hexan ist der geringe Siedepunkt, zudem bildet es mit Aceton ein niedrig siedenderes Azeotrop, wodurch eine schonende, einfache Aufkonzentrierung der Extrakte ermöglicht wird. Die Ergebnisse der durchgeführten Screening-Verfahren in toxikologischer als auch chemischer Hinsicht zeigten allerdings auch, daß sich im *n*-Hexan-Extrakt überwiegend nur „Substanz-Reste“ sowie vor allem elementarer Schwefel befanden. Für eine Vereinfachung des Verfahrens einer sequentiellen Extraktion wurden die erhaltenen Extrakte für eine weitere Aufarbeitung vereinigt, um den Arbeitsaufwand möglichst gering zu halten. Tabelle 37 faßt die Ergebnisse des Extraktionsmittel-Vergleiches zusammen. Im Hinblick auf eine Verträglichkeit für die ökotoxikologischen Testsysteme und eine chemische Analytik wird daher der Einsatz einer sequentiellen Extraktion über Aceton und nachfolgend *n*-Hexan als am geeignetsten angesehen.

Tabelle 37: Zusammenfassende Bewertung der unterschiedlichen Lösungsmittel für die Sedimentextraktion

Lösungsmittel	chemisch-analytisch	ökotoxikologisch
Methanol	(+)	++ (GT) / - (ÖW)
Ethanol	-	+ / ++(ÖW)
Aceton	+++	+++
Dichlormethan	++	++
Toluol	+	+ (GT) / -
<i>n</i> -Hexan	+++	+

+++ = sehr gut ++ = gut += gut, mit Einschränkungen -= schlecht

GT = Genotoxische Wirkung ÖW = Östrogene Wirkung

3.4.6 Ergebnisse Leuchtbakterientest

Durch die Extraktion des Sediments kommt es zu einer Anreicherung, aber auch zur Freisetzung einiger Stoffe, die im nativen Sediment für Organismen nicht verfügbar wären (s.a. Bioverfügbarkeit, Kap. 3.2). Ein Beispiel dafür ist elementarer Schwefel, der im Sediment für die meisten Organismen nicht frei verfügbar ist, sich aber in hohem Maße in den Extrakten anreichert. Da die Leuchtbakterien äußerst empfindlich auf Schwefel reagieren, stellte dies für Untersuchungen mit Hilfe dieses Biotests ein großes Problem dar. Wird der Schwefel vor der Analyse im Biotest nicht vollständig aus den Extrakten entfernt, ist automatisch die Toxizität der Extrakte hoch.^[165,166] Ermittelte EC₅₀-Werte für elementaren Schwefel lagen zwischen 15 bis 36 µg/L, d.h. die Empfindlichkeit für Schwefel ist,

verglichen mit anthropogenen Sedimentkontaminanten wie z.B. PAH, PCB oder anderen chlororganischen Verbindungen, relativ hoch und könnte dadurch mögliche Effekte durch anthropogene Inhaltsstoffe überlagern. Daher ist diese Stufe der Probenextraktaufreinigung besonders problematisch beim Einsatz des Leuchtbakterientests.

3.4.6.1 Untersuchung der Schwebstoffprobe Magdeburg auf akute Toxizität (Stufe 1,2)

Für ein erstes toxizitätsgeleitetes Screening wurde unter Einsatz zweier Biotests (Ara- und Leuchtbakterien-Test) eine Schwebstoffprobe aus der Elbe bei Magdeburg untersucht. Die Analyse der Probe erfolgte entsprechend dem in Abbildung 39 gezeigten Schema in drei Stufen. An dieser Stelle sollen die Ergebnisse der Untersuchungen der Stufe 1 (Rohextrakte) und 2 (nach GPC) separat von denen der letzten Stufe 3 diskutiert werden.

Der Trennmechanismus der GPC-Chromatographie beruht auf der Klassifizierung nach Molekülgröße. Die Fraktionsgröße wurde in Vorversuchen mit Hilfe von Standardmischungen für die Rückstandsanalytik in Sedimenten ermittelt. Die erhaltenen Fraktionen müssen jedoch auf eine mögliche akute Toxizität erneut geprüft werden. Es wurden eine Reihe an Vorfraktionen unterschiedlicher Zusammensetzung sowie eine größere Nachfraktion erhalten, die im wesentlichen durch den elementaren Schwefel belastet war. Über die Fraktionierung nach Molekülgröße sollte der Schwefel vollständig abgetrennt werden. Es kann daher möglicherweise auch zur Aufhebung bzw. Minderung der Toxizität der Probenextrakte kommen.

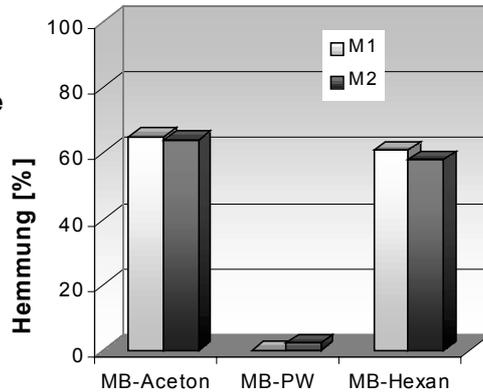
In der folgenden Abbildung 41 sind die Ergebnisse dargestellt die unter Verwendung von DMSO als „Lösungsmittel-Keeper“ erzielt wurden. Parallel wurden alle Probenfraktionen außerdem noch direkt in Wasser überführt und auch in dieser Form untersucht. Bei einer Verwendung von DMSO ist die eingesetzte Stoffmenge sehr limitiert (max. 1 % DMSO), über die Verwendung wäßriger Extraktlösungen sollte eine höhere Aufkonzentrierung erzielt werden. Bei diesem Verfahren besteht jedoch die Einschränkung, daß lipophile Inhaltsstoffe nicht oder nur zum Teil im Wasser gelöst sind.

Stufe I ROHEXTRAKTE

Soxhlet-Extraktion Schwebstoffprobe Magdeburg (MB)

- Aceton
- wäßrige Phase (Porenwasser PW) n. RP18-Extraktion
- *n*-Hexan

Extrakte wurden gemessen in DMSO



Stufe II (nach GPC)

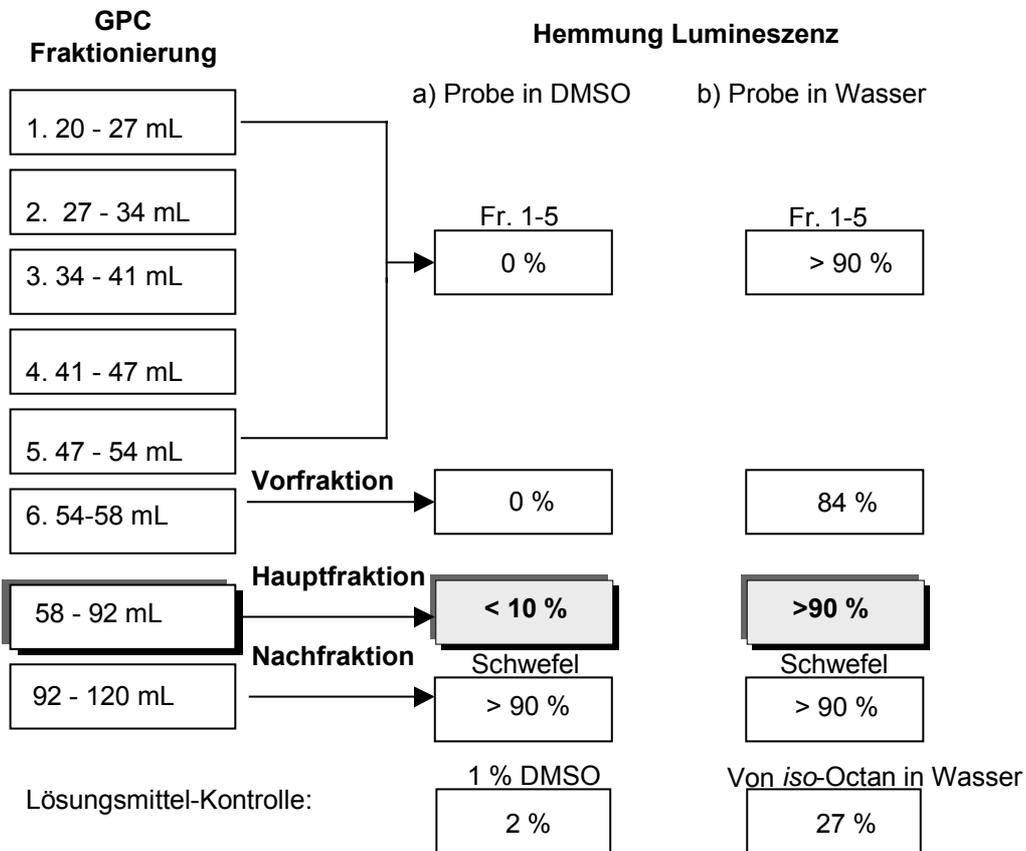


Abbildung 41: Ergebnisse der Untersuchung der Rohextrakte *n*-Hexan, Aceton, Wasser (Stufe I) und nach der GPC-Fraktionierung (Stufe II) auf akute Toxizität im Leuchtbakterientest.

Abbildung 41 zeigt die Aufteilung der Sedimentextrakte in Vor-, Haupt- und Nachfraktion. Die Abtrennung des Schwefels konnte anhand der Dotierung einer Modellmischung mit gelöstem S₈ mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 254 nm belegt werden. Haupt- und Nachfraktion wurden mittels GC-MS auf Schwefelrückstände überprüft, eine Analyse der Vorfraktion mit Hilfe des GC-MS ist aufgrund der makromolekularen Begleitstoffe nicht möglich. Dargestellt sind ferner die über

den Leuchtbakterientest erhaltenen Lumineszenz-Hemmungen für die Roh- und fraktionierten Probenextrakte der Schwebstoffprobe (Magdeburg) sowie das Trennvolumen aller GPC-Fractionen.

Diese Versuche zeigen ein eher uneinheitliches Bild. Besonders gut erkennbar ist, daß allein die verschiedenen verwendeten Verfahren für einen Lösungsmittelwechsel des Probenextrakts unterschiedliche Ergebnisse im Biotest ergeben: während die in DMSO gelösten Teilproben keine bzw. sehr geringe Toxizität zeigten, ergaben die Teilproben in Wasser hohe Werte. Im Unterschied zu DMSO wurde bei Verwendung von wäßrigen Lösungen in erster Linie zwar eine höhere Aufkonzentrierung der Probe erreicht, allerdings waren die gemessenen Toxizitäten in den parallel durchgeführten negativ-Kontrollproben für den Lösungsmittelwechsel ebenfalls sehr hoch (siehe hierzu Tabelle 38). Es wurden vereinzelt Hemmungen der Lumineszenz von > 90 % für eine negativ-Kontrollprobe erhalten, was höchst wahrscheinlich auf eine unzureichende Entfernung von Aceton-Rückständen (wurde als Lösungsvermittler eingesetzt) zurückzuführen war.

Für die direkte Überführung des Probenextraktes in Wasser (rechts gezeigt in Abbildung 41), wurde auch für die GPC-Vorfraction eine hohe Hemmung der Lumineszenz erhalten. Hingegen zeigte die in DMSO überführte Probe im Leuchtbakterientest keinen signifikanten Effekt mehr. Die Größenausschlußchromatographie sollte eigentlich nicht zur Minderung toxikologischer Effekte führen, da normalerweise eine Aufkonzentrierung der Analyten und damit der potentiellen Wirkungen anzunehmen ist. Somit ist dieses Verfahren zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig optimiert. Weitere Versuche durch „negativ-Kontrollproben“ zum Lösungsmittelwechsel der Extrakte zeigten zudem, daß es von entscheidender Bedeutung ist, die Proben jeweils in ein Volumen von 1 mL Wasser zu überführen. Bei Überführung in 2 mL Wasser wurden ausschließlich hohe Toxizitäten erhalten, da hierbei wahrscheinlich noch größere Restmengen Aceton im Wasser gelöst sind. Zur Zeit konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ob durch direktes Lösen der eingeeengten Probenextrakte in Wasser mit Aceton durch höhere Anreicherungsfaktoren eine bessere Empfindlichkeit des Tests erreicht werden konnte oder aber durch Artefakte dieses Verfahren unabhängig von der Probenbelastung zu starken Reaktionen im Testsystem führt.

Tabelle 38 : Ergebnisse (Leuchtbakterientest) für die unterschiedlichen Verfahren zur Überführung von Lösungsmittelkontrollproben in Wasser.

Kontrolle (Blindwert)	Mittelwert M1	Mittelwert M2
⇒ Überführung von 500 µL <i>iso</i> -Oktan in 2 mL Wasser unter Zugabe von 2 mL Aceton als Lösungsvermittler, Einengen unter N ₂ -Strom auf 1900 µL		
Kontrolle 1 (Endvolumen 2 mL)	> 90 %	> 90%
Kontrolle 2 (Endvolumen 2 mL)	89 %	88 %
⇒ Überführung von 500 µL <i>iso</i> -Octan in 1 mL Wasser unter Zugabe von 2 mL Aceton als Lösungsvermittler, Einengen unter N ₂ -Strom auf 900 µL und Auffüllen zu insgesamt 2 mL G-Vol.		
Kontrolle 3 (Endvolumen 2 mL)	0 %	0 %
Kontrolle 4 (Endvolumen 2 mL)	1 %	1 %

Als Ergebnis der in Tabelle 38 dargestellten Versuche bleibt vorerst festzuhalten: Für die Lösungsmittelwechsel gilt es zu berücksichtigen, daß die Proben nur in 1 mL Wasser überführt werden können und nach Entfernung der Lösungsmittel Aceton und *iso*-Octan auf ein 2 mL Endvolumen aufgefüllt werden muß. Bei dem momentanen Entwicklungsstand der Methode ist eine parallele Untersuchung der Probenfraktionen zum einen in DMSO, zum anderen in Wasser überführt, weiterhin sinnvoll.

Die in Stufe III erhaltenen Fraktions-Eluate wurden daher wiederum für den Biotest und die chemische Analyse halbiert. Das Probenaliquot für die Biotests wurde nochmals aufgeteilt und jeweils eine Hälfte aus *iso*-Oktan mit Hilfe von Aceton in Wasser bzw. direkt in DMSO überführt. Die erhaltenen Probenfraktionen wurden anschließend jeweils einer Prüfung auf akute Toxizität im Leuchtbakterientest unterworfen (DMSO/Wasser), die in DMSO überführten Probenfraktionen wurden auch auf genotoxische Wirkung im Arabinose-Resistenz-Test untersucht. Das anfangs erstrebte Ziel, in allen Biotests DMSO als Lösungsmittel für die erhaltenen Extrakte einzusetzen, erwies sich im Hinblick auf die hohe Verdünnung der Eluate vor allem im Leuchtbakterientest als schwierig. Die Gesamtergebnisse für die Schwebstoffprobe Magdeburg für die Fraktionen 1-7 werden im nachfolgenden Kapitel 3.4.7.2 diskutiert und in Abbildung 56 zusammengefaßt.

Alle Fraktionen lösten nach Überführung in Wasser bei der Untersuchung eine deutliche Hemmung der Lumineszenz aus. Durch eine Verdünnung der Extrakte wären möglicherweise deutlichere Unterschiede zwischen den Fraktionen erkennbar gewesen, da die jeweiligen Proben allerdings vollständig für den Test eingesetzt wurden, war dies nach der ersten Messung nicht mehr möglich.

3.4.7 Ergebnisse der genotoxikologischen Untersuchung ausgewählter Schwebstoffproben

3.4.7.1 Vorversuche zum biotestgeleiteten Screening: Schwebstoffprobe der Elbe bei Schmilka

Anhand einer gefriergetrockneten Schwebstoffprobe aus der Elbe bei Schmilka wurden erste Vorversuche für ein kombiniertes Screening auf genotoxische Komponenten durchgeführt. Für die Gesamtextrakte der Probe wurde bereits in einer 1995 von Vahl durchgeführten Untersuchung ein genotoxisches Potential erkannt.^[152] Zu diesem Zeitpunkt wurde parallel jedoch keine chemische Untersuchung der gleichen Probenextrakte durchgeführt. Für einen Vergleich der Ergebnisse mit dem vorhandenen Schadstoffpotential mußte seiner Zeit auf extern ermittelte Monitoring-Daten (PCB, PAH, KW, Metalle) der ARGE ELBE für diese Probenahmestation Bezug genommen werden. Allerdings ist nur für wenige der üblicherweise im Routine-Messprogramm untersuchten Schadstoffe eine mutagene bzw. allgemein genotoxische Wirkung bekannt (einzelne PAH; s.a. Kapitel 3.4.7.2). Daher galt das Interesse der hier beschriebenen chemisch-analytischen Untersuchungen besonders elektrophilen Komponenten, die in der Lage sind, an die DNA, zu binden und dadurch Mutationen hervorrufen können. Nitroaromatische Verbindungen gelten aufgrund der Möglichkeit zur Bildung sogenannter Nitreniumionen als potentielle mutagene bzw. kanzerogene Verbindungen. Daher galt diesen in den toxizitätsgeleiteten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit eine besondere Aufmerksamkeit.

Für eine detaillierte chemische Analyse wurde eine Probe erneut untersucht, für die bereits aus einer früheren Studie von Vahl Ergebnisse im Hinblick auf eine genotoxische Wirkung vorlagen (Probe Schmilka, 1995)^[152]. Damit die Ergebnisse beider Untersuchungen vergleichbar bleiben, wurde die Probe nach der Vorgabe der älteren Untersuchung mit Toluol (TE) und Methanol (ME) extrahiert. Anschließend wurden die Probenextrakte entsprechend dem Analyse-Schema nach Abbildung 39 aufgetrennt und die resultierenden Fraktionen erneut im Biotest auf ein genotoxisches Potential sowie über GC-MS/AFID untersucht.

Zusätzlich wurden die Fraktionen durch Verwendung einer speziellen Alkali-Ionenquelle („Enhance-Nitro-Sensitive-Mode“; ENS-Modus) mit hoher Sensitivität für nitrogruppenhaltige Verbindungen analysiert. Mutagene Komponenten dieser Substanzklasse werden sehr selektiv und empfindlich durch den verwendeten Bakterienstamm BA 146 des Arabinose-Resistenz-Tests detektiert. Es wurde erhofft, daß durch die Analyse im ENS-Modus die Nachweismöglichkeit speziell für diese Verbindungsgruppe noch erhöht wird und möglicherweise für diese spezielle Substanzklasse ein direktes Zusammenspiel zwischen „Bio-Detektor“ und instrumentellem Detektor erzielt werden kann.

Die folgende Abbildung 42 stellt die Ergebnisse der Untersuchung mit den verschiedenen Bakterienstämmen (BA 14, BA146, BA 149) vor, welche für die Rohextrakte der Schwebstoffprobe „Schmilka“ (von 1995) erhalten wurden. Ferner werden die ermittelten Induktionsfaktoren der Gesamtextrakte den Resultaten des fraktionierten Screenings gegenübergestellt. Bei der Fraktionierung des MeOH-Probenextrakts wurde erneut (siehe auch Kapitel 2) die fünfte Fraktion in 5a, b und c unterfraktioniert. Fraktion 5a entspricht von der Zusammensetzung nach GC-MS-Analyse eher der 4. Fraktion; bei 5 b handelt es sich um eine tiefschwarz gefärbte, nur etwa 400 µL große Fraktion, deren Inhaltsstoffe sich im vorderen Retentionsbereich des Chromatogramms von der letzten Fraktion 5c deutlich unterscheiden. Die stoffliche Zusammensetzung der Fraktion 5b scheint weit weniger komplex und wird im GC-MS Chromatogramm durch zwei Hauptkomponenten dominiert.

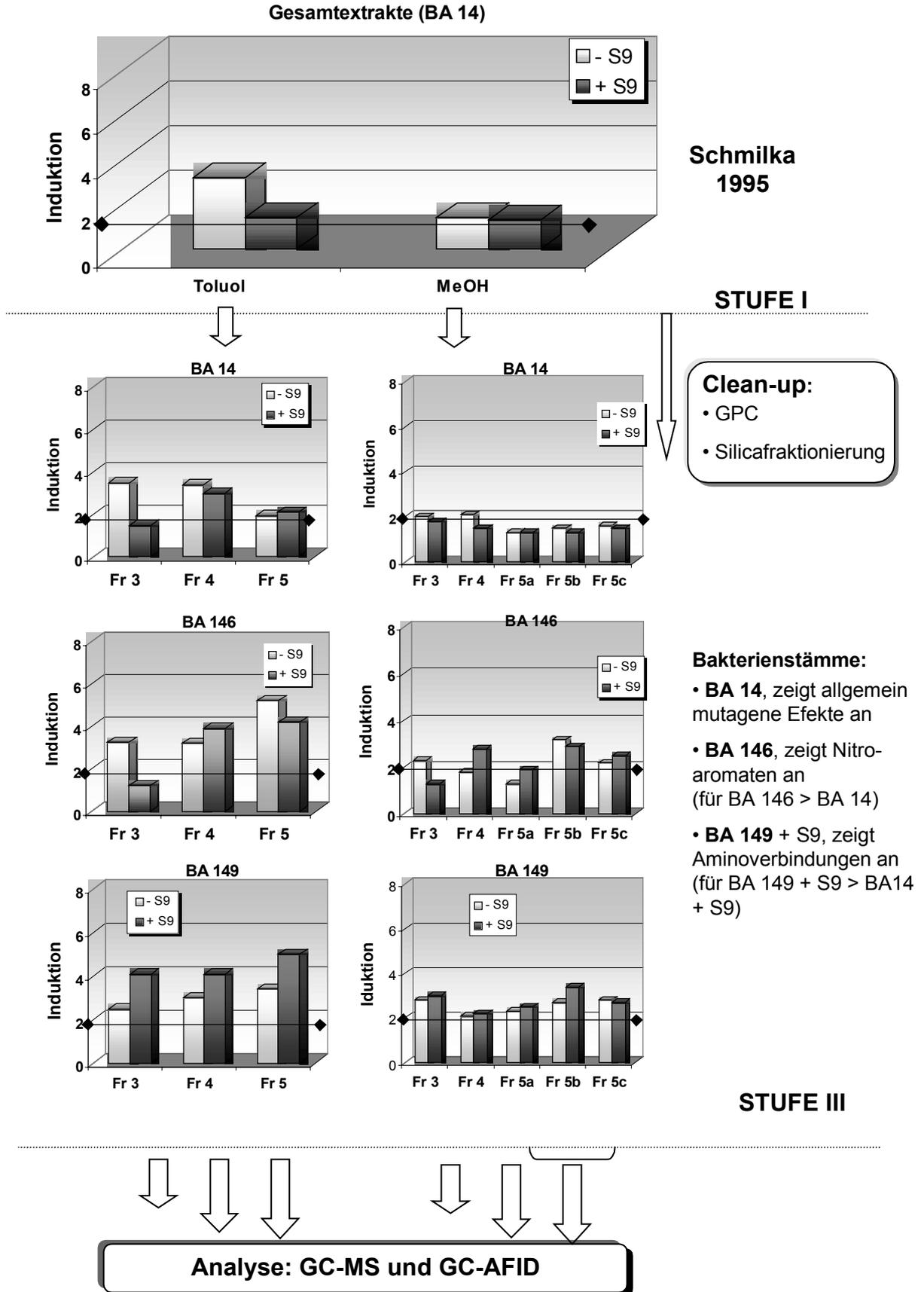


Abbildung 42: Ergebnisse der bioanalytischen Untersuchung der Schwebstoffprobe Schmilka, auf mutagene Wirkung im Ara-Test (BA 14, 146, 149)

Die Induktionsfaktoren sind relative Effekte, ausgedrückt als Vielfache des Spontanwertes, bei der jeweils höchsten eingesetzten Dosis. Ein signifikanter Effekt ist erst ab einer Induktion größer 2 gegeben, und bei einem Faktor >3 handelt es sich bereits um einen deutlichen mutagenen Effekt der Probe. Durch den Bakterienstamm BA 14 werden unspezifisch mutagene Effekte angezeigt. Wenn außerdem der Induktionsfaktor des BA 146 stärker als BA 14 ausfällt, kann durch die Spezifität dieses Stammes ein mutagener Effekt auf Nitroaromaten zurückgeführt werden. Zeigt sich wiederum ein Effekt bei BA 14 + S9-Mix und ein noch stärkerer im Stamm BA 149 + S9-Mix, deutet dies auf mutagene Aminoverbindungen hin. Aus den Untersuchungen können insgesamt folgende Resultate und Schlußfolgerungen gezogen werden:

- ⇒ Für die Fraktionen 3, 4 und 5 des Toluol-Extraktes (TE) wurden jeweils höhere Effekte im Vergleich zum Gesamtextrakt erhalten.
- ⇒ Für alle geprüften Fraktionen des TE wurden im direkten Vergleich zu den jeweiligen MeOH-Extrakt-Fraktionen eine deutlich stärkere Induktion gemessen.
- ⇒ Die Induktionsfaktoren für die Fraktionen 3 und 4 lagen in den Tests mit BA 14 und BA 146, 149 in etwa in der gleichen Größenordnung, während für die Fraktion 5 eine signifikante Erhöhung der Induktion aus den Untersuchungen der spezifischeren Stämme (146 und 149) erhalten wurde.
- ⇒ BA 14 (+/- S9): Für alle Fraktionen des TE wurden signifikante Hinweise auf eine mutagene Wirkung erhalten. Die erzielten Induktionsfaktoren für die einzelnen Probenfraktionen waren deutlich größer als die zuvor für den Gesamtextrakt ermittelten. Für Fraktion 3 und 4 des ME wurden in etwa die gleichen relativen Effekte im Vergleich zum Rohextrakt erhalten (~ IF 2). Es wurden zudem jeweils höhere Effekte ohne Zugabe von S9-Mix erhalten, was eher auf eine Mutagenität der organischen Komponenten direkt, d.h. ohne Metabolisierung, schließen läßt. Das Effektmuster welches für den Gesamtextrakt erhalten wurde, wird weitgehend durch Fraktion 3 wiedergespiegelt.
- ⇒ BA 146: Für den TE ist gut erkennbar, daß die relativen Effekte mit steigender Polarität der Probenextrakt-Fraktionen zunehmen. Die Fraktionen des ME zeigen, wie auch vorher bereits der Gesamtextrakt, deutlich geringere Effekte. Der stärkste relative Effekt wurde sowohl für den TE als auch für den ME für Fraktion 5b erhalten. Für Fraktion 4 wurde ein ähnliches Effektmuster bei TE und ME erhalten. Nach Zugabe des Metabolisierungsmixes wurde für diese Fraktion jeweils eine höhere Induktion ermittelt. Diese Wirkung ist möglicherweise auf mutagene Nitrokomponenten zurückzuführen, die zu Aminen reduziert, einen mutagenen Effekt auszulösen vermögen. Vergleicht man die relative Induktion der Fraktion 4 des Toluol-Extraktes nach Zugabe von S9-Mix, so ist bei BA 146 eine Erhöhung im Vergleich zu BA 14 festzustellen. Auch dieser Befund gilt als Hinweis für das Vorkommen von mutagenen Nitroaromaten in dieser Fraktion. Das Bild der ME-Probenfraktionen sieht uneinheitlicher aus, aber auch hier wird eine deutlich stärkere Induktion durch Fr 4 + S9 in BA 146 im Vergleich zu BA 14 + S9 hervorgerufen.

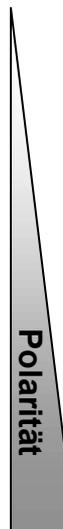
- ⇒ BA 149: Hier wurde jeweils die höchste Induktion nach Zugabe von S9 ausgelöst. Dieses Ergebnis gilt sowohl für die Fraktionen des TE als auch ME mit Ausnahme der Fraktion 5c. Zudem wurden, wie auch schon in der Untersuchung mit BA 146, in Fraktion 5 (bzw. 5b + c) insgesamt die höchsten Effekte gemessen. Die relativen Effekte überschreiten wiederum diejenigen, die im Test mit dem Wild-Typ (BA 14) ermittelten wurden. Auch hier konnte wieder eine Zunahme der Induktionsfaktoren mit steigender Polarität der Fraktionen festgestellt werden.

Zusammengefaßt kann aus der toxikologischen Untersuchung über den Arabinose-Resistenztest auf das Vorkommen sowohl mutagener Nitro- als auch Aminoverbindungen im TE und ME der Schwebstoffprobe Schmilka geschlossen werden. Ein Vorkommen dieser Substanzklassen in den entsprechenden Fraktionen erscheint nach den im ersten Teil der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen als möglich. In den bereits im Kapitel 2.4 dargestellten Screening-Untersuchungen wurden (Chlor-)Nitrobenzole, (Chlor-)Aniline, (Chlor-)Nitroaniline, Nitrophenole oder auch z.B. die Nitrososulfonverbindungen als Inhaltsstoffe dieser Fraktionen der Sedimentprobenextrakten erkannt. Es galt zu überprüfen, ob Nitro- oder Aminoverbindungen gleichermaßen in den jeweiligen Extrakt-Fraktionen der Schwebstoffprobe Schmilka identifiziert werden können.

Die chemische Analyse der relevanten Probenextrakt-Fraktionen gestaltete sich infolge einer Reihe an Reaktionsprodukten, die bei der Soxhlet-Extraktion der gefriergetrockneten Probe mit Toluol entstanden sein könnten, als äußerst schwierig. Die Stoffmenge bzw. der Gehalt an organischer Substanz in den Fraktionen war, im Vergleich zu üblicherweise in der Sediment-Analytik vorkommenden Konzentrationsbereichen in etwa zehnfach höher, wodurch das durchgeführte Clean-up deutlich an Effektivität verlor. In den GC-MS-Chromatogrammen des Toluolextraktes führte die hohe Stoffmenge zu schlecht aufgelösten Signalen, so daß viele Verbindungen durch starke Peak-Überlagerungen nicht sicher zugeordnet werden konnten. Eine Auswertung konnte daher nur zum Teil erfolgen (siehe Abbildung 43). Gleiches galt für die Untersuchung auf nitrohaltige Verbindungen im ENS-Modus des AFID. Durch die wesentlich höhere Sensitivität dieses spezifischen Detektors war eine Interpretation aufgrund der zahlreichen sich überlagernden Signale nicht mehr möglich. Trotz der hier beschriebenen Schwierigkeiten konnte eine Reihe an spezifischeren Ergebnissen durch die Auftrennung der Rohextrakte und die sequentielle Untersuchung gewonnen werden. Dies ist ein erster Schritt für eine Zuordnung der im Biotest festgestellten Mutagenität zu einzelnen Stoffen, die in der chemischen Analyse nachgewiesen werden konnten. Eine Zusammenfassung der mit hoher Wahrscheinlichkeit identifizierten Verbindungen wird in Abbildung 43 gezeigt. Die „Fett“ gedruckten Verbindungen haben nachweislich in Untersuchungen mit *Salmonella-Typhimurium* TA 98 und TA 100 signifikante mutagene Effekte induziert.

**ZUSAMMENFASSUNG DER CHEMISCH-ANALYTISCHEN ERGEBNISSE
FÜR DIE FRAKTIONEN DES TOLUOL-EXTRAKTES**

<p>Fr. 3: Aromatische Aldehyde, Diöle und Ketone, Benzoesäure, Bithiophen, Pyridincarbothioamid, PAK, CKW, Methylthio-nitropyrimidin, Acridin, Xanthenon, Methyl-di-nitrobenzamin, Dimethylaminobiphenyl</p>
<p>Fr. 4: Naphthalincarbonitril, Chloraniline, aromatische Alkohole und Aldehyde, Amide, Anilide, polycyclische Moschusduftstoffe</p>
<p>Fr. 5: Alkylquinoline, Triaminotoluol, Phenylpropenal, Dimethylpyrimidinamin, Aminofluoren, Methylthiazoloquinolin, Dimethoxynaphthalin, Acetylamino-methylthiophencarbonitril, Ethyldibenzothiophen</p>



**ZUSAMMENFASSUNG DER CHEMISCH-ANALYTISCHEN ERGEBNISSE
FÜR DIE FRAKTIONEN DES METHANOL-EXTRAKTES**

<p>Fr. 3: Aromatische Aldehyde, Ketone, Methoxy-Verbindungen und Amine, Alkylquinolin, Monochlornitrobenzol, Dichloranilin, Methylnitrophenol, Nitrobiphenyl, Nitrophenylheptanol, (Methyl-) N-phenylbenzamine, Methylbenzanilid, Methoxyphenyl-N-methylanilin, Diphenylether, Sulfide,</p>
<p>Fr. 4: Aminophenylacetamid, Chlordiphenylethanon, aromatische Alkohole und Aldehyde, Anilide, Duftstoffe, Alkylphenole, organische Phosphorsäureester, Phthalate, O-PAK, Anthracendion</p>
<p>Fr. 5b + c: Aldehyde, Alkylphenole (NP, OP), Fluorverbindungen, Ethylthiopyridin, Benzoesäureester, Benzothiophene, Diöle, Benzopyrane, Alkylthiophene, Methylthio-acetophenon, Aminofluoren, Dimethoxybenzacetamid, Pyridine, Indane, Cholestane, Ergostane</p>

Abbildung 43: Ergebnisse der GC-MS-Analyse für die Fraktionen 3, 4, 5b und 5c des Toluol-Extraktes und der entsprechenden Fraktionen des MeOH-Extraktes (Fr. 5b + c sind zusammengefaßt) der „Schwebstoffprobe Schmilka“; Die fettgedruckten Komponenten stellen potentiell mutagene Substanzen dar ^[169]

Insgesamt können aus der Analyse der Schwebstoffextrakte für die Probe Schmilka folgende Ergebnisse zusammengefaßt werden:

- ⇒ Die Fraktionen des Toluolextraktes sind alles in allem deutlich stärker belastet als die entsprechenden Fraktionen des MeOH-Extraktes. (Primärextrakt > Sekundärextrakt).
- ⇒ Die Analyse des MeOH-Extrakts war zum Teil durch die etwas geringere Gesamtbelastung vereinfacht, jedoch war trotzdem eine zehnfache Verdünnung der erhaltenen Fraktionen im Vergleich zur eingesetzten Stoffmenge in den Biotests notwendig. Dieser extreme Unterschied sollte bei nachfolgenden Versuchen berücksichtigt werden. Es gilt zu prüfen, ob eine toxikologische Untersuchung auch mit einer wesentlich geringeren Stoffmengen möglich ist, damit für mögliche quantitative Schlußfolgerungen die Ergebnisse besser direkt vergleichbar werden.
- ⇒ Für beide Extrakte konnten keine direkten Zuordnungen zu bekannten Verbindungen durch die GC-AFID (ENS-Modus) Analyse erhalten werden. Dazu hätte es einer weiteren Fraktionierung bis hin zu den Einzelsubstanzen bedurft, was den Zeitrahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt hätte. Insgesamt war jedoch eine Zunahme der Signalintensität mit steigender Polarität der Fraktionen festzustellen.
- ⇒ Unter den bereits beschriebenen Schwierigkeiten wurde in den relevanten Fraktionen eine Dominanz aromatischer Aldehyde, Ketone, Alkohole und phenolischer Verbindungen als Ergebnis der GC-MS-Analyse erkannt. Zudem konnten einzelne aromatische Nitro- und Aminoverbindungen zugeordnet werden (s.a. Abbildung 43), die teilweise bereits als mutagen bekannt sind. Die Fraktionen 5b und 5c des ME wiesen im wesentlichen 2-3 dominante Signale auf, wovon eines der Verbindung Ethylthiopyridin nach Vergleich mit Bibliotheksspektren zugeordnet wurde.

3.4.7.2 Ergebnisse der biotestgeleiteten Untersuchung der Schwebstoffprobe Magdeburg

Unter Berücksichtigung der gewonnenen Erkenntnisse aus der Analyse der „Schwebstoffprobe Schmilka“ wurde ein weiteres schwebstoffbürtiges Elbesediment (Station Magdeburg) auf Mutagenität und akute Toxizität hin überprüft. Durch die Verwendung von Aceton und *n*-Hexan als organische Extraktionsmittel, sollte die chemische Analyse vereinfacht werden. Die Probe wurde wiederum einer abgestuften Analyse unterworfen, da bereits die Untersuchung der Probe aus Schmilka gezeigt hatte, daß über eine sequentielle Untersuchung zusätzliche Informationen erhalten werden können. Im Leuchtbakterientest hatte sich lediglich der Aceton-Extrakt als akut toxisch erwiesen, während für den *n*-Hexan-Extrakt und den RP 18-Extrakt der wäßrigen Phase keine Effekte beobachtet wurden. Dennoch wurden alle drei „Rohextrakte“ auch auf ein mutagenes Potential hin überprüft.

In den folgenden Abbildungen 43 und 44 werden die Ergebnisse des Arabinose-Resistenz-Tests dargestellt. In Ergänzung hierzu sind die Ergebnisse für die dritte Stufe der Untersuchungen auf akute Toxizität im Leuchtbakterientest in der zusammenfassenden Abbildung 56 (Kapitel 3.4.6.1) dokumentiert.

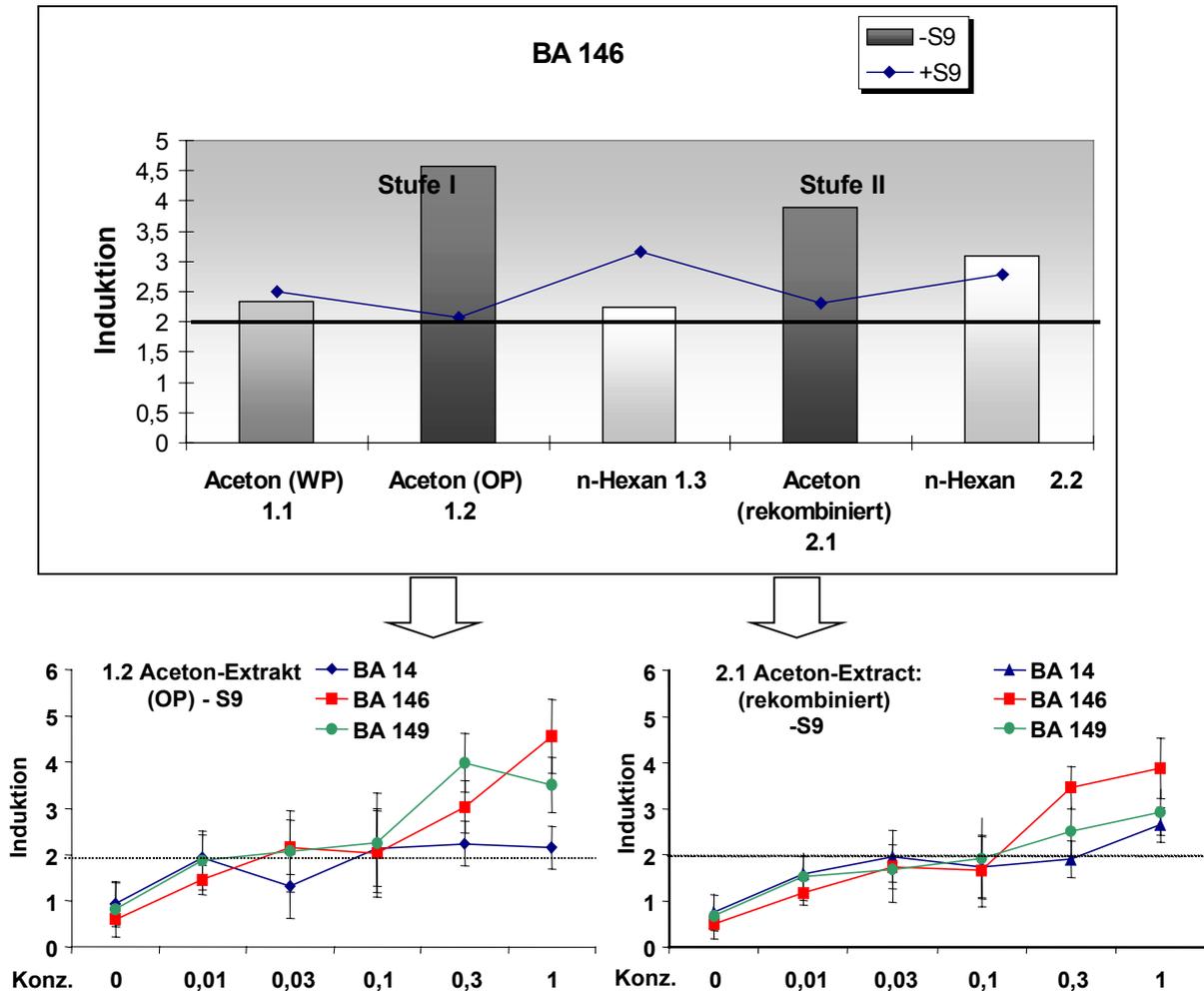


Abbildung 44: Ergebnisse der bioanalytischen Prüfung einer Schwebstoffprobe aus der Elbe bei Magdeburg. Darstellung der Ergebnisse (Stufe I, II Ba146) der Prüfung auf Mutagenität. Ein Effekt gilt bei Überschreitung eines Induktionsfaktors von 2 als signifikant (horizontale Linie)

Die Rohextrakte erwiesen sich in der ersten Stufe der Untersuchung alle als genotoxisch, wobei für den Aceton-Extrakt die stärkste Induktion ausgelöst wurde. In der zweiten Stufe nachdem nach der GPC-Reinigung die polaren Extrakte vereinigt waren, wurde für den Aceton-Extrakt (2.1) ein etwas geringerer Effekt beobachtet, wobei der *n*-Hexan-Extrakt (HE) eine deutlich höhere Induktion auslöste als noch zuvor in Stufe 1. Möglicherweise führte die Extraktvortrennung über die GPC hier zu einer Aufhebung eventueller Maskierungseffekte durch Makromoleküle. Bemerkenswert sind zudem die Resultate, die nach Zugabe des Metabolisierungsmixes (S9) erhalten wurden, denn für den HE waren deutlich stärkere Effekte nach Metabolisierung der Inhaltsstoffe meßbar. Wiederum könnte die Ursache im Vorkommen von mutagenen Aminoverbindungen liegen, welche sich erst durch eine Metabolisierung bilden. Da alle untersuchten Extrakte ein genotoxisches Potential aufwiesen, wurde die bioanalytische Untersuchung auf die Fraktionen der dritten Stufe erweitert (siehe Abbildung 45). Die zuvor durchgeführte Prüfung der Extrakt-Fraktionen auf akute Toxizität im Leuchtbakterientest

ergab, daß alle Fraktionen eine Toxizität auszulösen vermögen. Die stärkste Hemmung der Leuchtaktivität wurde für die polaren Fraktionen 6 und 7 festgestellt.

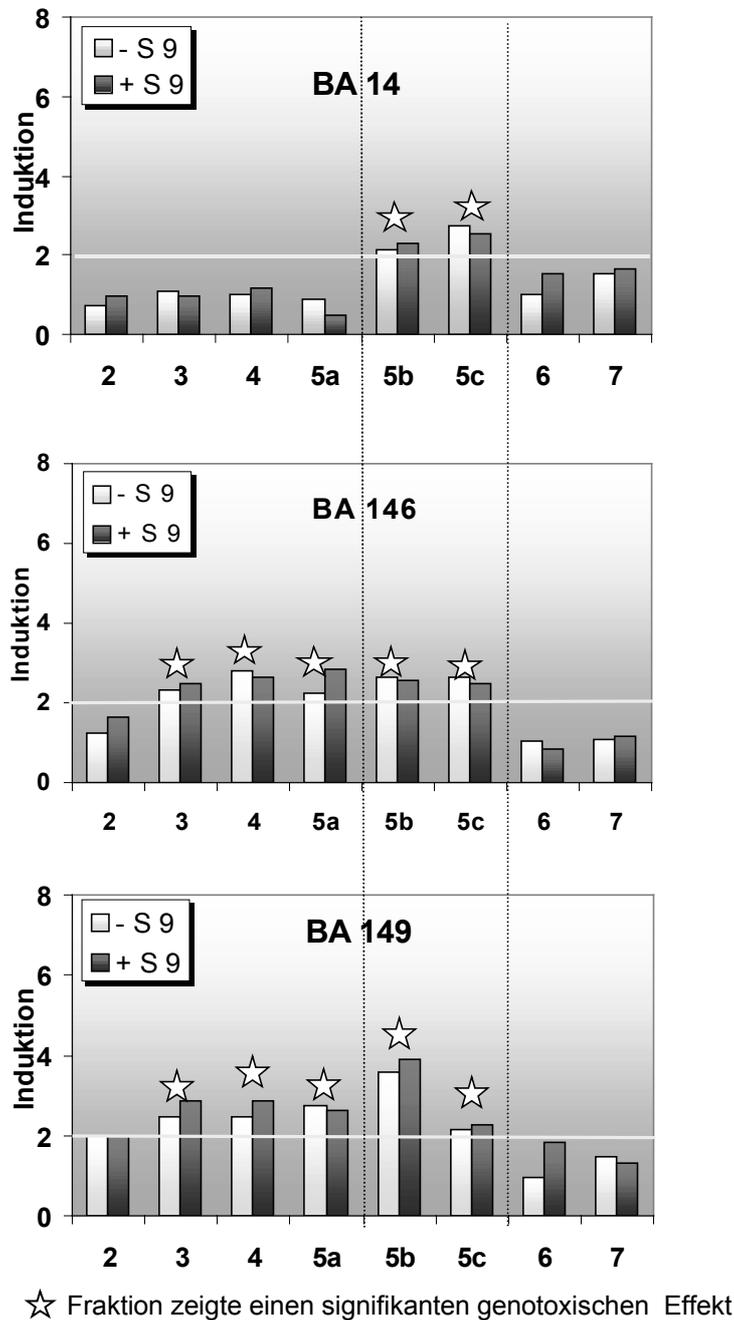


Abbildung 45: Ergebnisse des Ara-Tests für die Stufe III nach Silica-Fraktionierung der biotestgeleiteten Analyse für die Schwebstoffprobe Magdeburg.

Für die durch einen Stern gekennzeichneten Probenextrakt-Fractionen wurden signifikante Effekte (Induktion > 2) im jeweils verwendeten Bakterienstamm erhalten. Zusammengefaßt ergeben sich aus der genotoxikologischen Untersuchung der Elbschwebstoffprobe bei Magdeburg in der dritten Stufe folgende Ergebnisse:

- ⇒ **BA 14:** In der Prüfung auf allgemeine Genotoxizität wurde lediglich eine signifikante Induktion durch die polaren Fraktionen 5b und 5c ausgelöst, alle weiteren untersuchten Probenfraktionen blieben inaktiv. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Gesamtextrakte in den Stufen eins und zwei waren keine größeren Unterschiede in den ermittelten Effekten nach der Zugabe des S9-Mix erkennbar (Differenz blieb innerhalb der Schwankungsbreite). Eine separate Untersuchung der Fraktionen des HE ergab für diesen keine meßbaren Effekte. Die zuvor in den Gesamt-Extrakten 1.3 und 2.2 nachgewiesene Toxizität, beruht daher möglicherweise auf Kombinationswirkungen der Einzelkomponenten, die durch die Aufteilung der Inhaltsstoffe in Fraktionen aufgehoben werden.
- ⇒ **BA 146 und 149:** Beide Bakterienstämme zeigten eine deutlich höhere Sensitivität im Vergleich zu BA 14. Es konnte jeweils für die Fraktionen 3, 4 und 5a – c eine mutagene Wirkung beobachtet werden. Die stärkste Induktion überhaupt wurde für Fraktion 5b (BA 149) erhalten. Insgesamt wurden nur geringe Unterschiede der Effekte bei Zugabe von S9-Mix beobachtet, wobei aber eine leichte Verstärkung im Vergleich zu den Untersuchungen mit den Bakterienstämmen BA 14 und BA 149 ermittelt wurde. In den nachfolgenden GC-MS-Analysen der Extrakt-Fraktionen wurde daher besonders auf das Auftreten von Aminoverbindungen geachtet. Wie für einzelne Nitro-PAH ist auch für die entsprechenden Amino-PAH bekannt, daß sie schon in geringsten Konzentrationen eine stark mutagene Wirkung ausüben. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden daher die Verbindungen 1-Nitropyren und 2-Aminoanthracen in den entsprechenden Testsystemen (BA 146 und BA 149) jeweils als Positiv-Kontrolle eingesetzt.

Abbildung 46 zeigt noch einmal im direkten Vergleich die Ergebnisse für die polaren Fraktionen 4, 5b und c, die mit Hilfe aller drei Bakterienstämme nach Zugabe von S9-Mix erhalten wurden. Für Fraktion 5b ist hier eine signifikante Erhöhung der Induktion, gemessen über BA 149 + S9 im Vergleich zu den anderen Stämmen, klar zu erkennen. Insgesamt wurden in dieser Untersuchung im Vergleich zum Toluol-Extrakt der „Schwebstoffprobe Schmilka“ wesentlich geringere Effekte gemessen. Die eingesetzte Stoffmenge war jedoch mit etwa 5 g Trockengewicht deutlich geringer und entsprach damit nur einem Viertel der vorher verwendeten Menge.

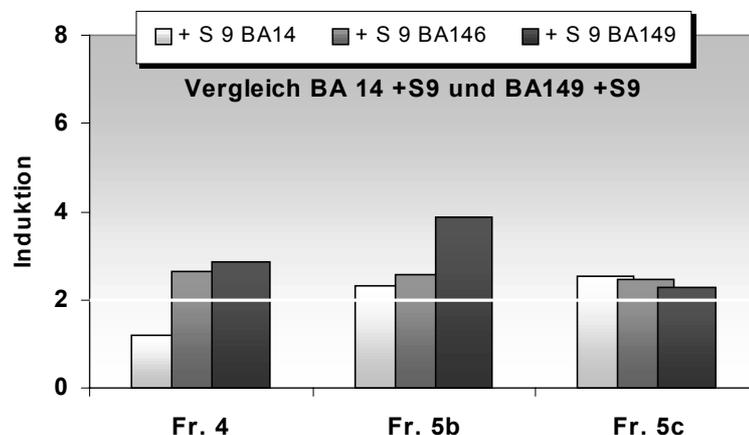


Abbildung 46: Vergleich der beobachteten Effekte für die Bakterienstämme BA 14, 146, 149, ausgelöst durch die "polaren" Fraktionen 4, 5b und c der Schwebstoffprobe Magdeburg

Die Analyse der Probenextrakt-Fractionen im Leuchtbakterientest ergab, wie bereits einleitend erwähnt, für die Fraktionen 2-7 jeweils Hinweise auf eine akute Toxizität. Daher wurde für die Schwebstoffprobe bei Magdeburg eine umfassende qualitative und auch semiquantitative Bestandsaufnahme der Extraktinhaltsstoffe für alle Fraktionen durchgeführt. Die Fraktionen 3, 4 und 5 wurden zudem unter besonderer Berücksichtigung elektrophiler Komponenten bzw. potentiell mutagener Nitro- und Aminoverbindungen analysiert. In Abbildung 47 werden die Ergebnisse der GC-MS-Analyse für die einzelnen Probenfraktionen der Schwebstoffprobe Magdeburg dargestellt. Eine Reihe von Verbindungen wurden mit Hilfe von externen Standard-Referenzen verifiziert, und ihre Konzentration wurde semiquantitativ ermittelt. Die verifizierten Substanzen wurden in Verbindungsklassen eingeteilt, die im einzelnen ermittelten Konzentrationen summarisch im dargestellten Säulendiagramm zusammengefaßt. Hierdurch soll ein grober Überblick für die unterschiedlichen Konzentrationsbereiche der Probe mit den verschiedenen „anthropogenen Belastungen“ vermittelt werden. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, daß die aufgeführten Verbindungsklassen insgesamt nicht die Hauptinhaltsstoffe der Sedimentextrakte widerspiegeln. Wesentlich dominanter waren auch in dieser Probe Belastungen mit Komponenten biogener Herkunft.

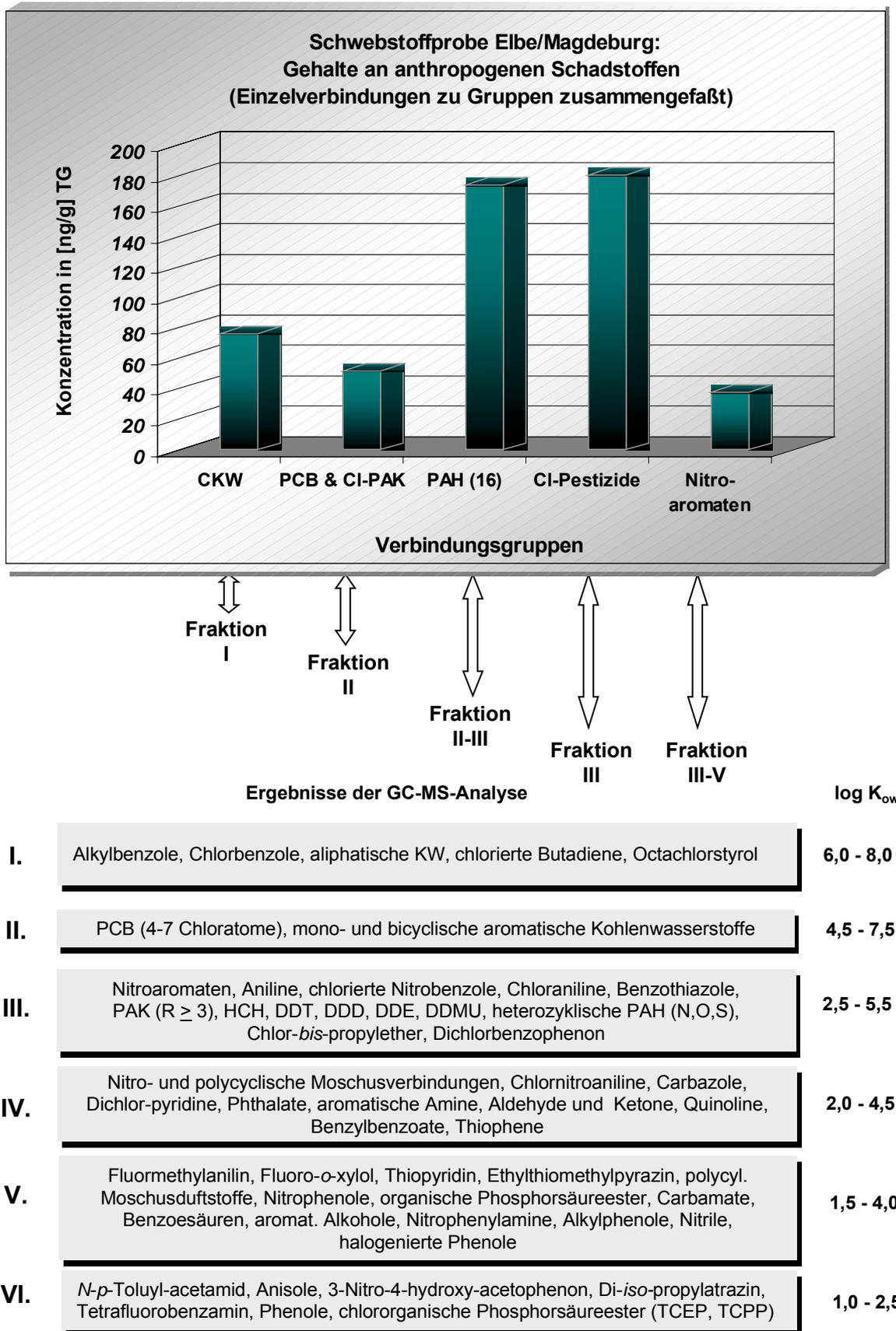


Abbildung 47: Identifizierte Komponenten in der Elbe-Probe bei Magdeburg sowie die ermittelten Konzentrationen ausgewählter Zielverbindungen, die als Summen der jeweiligen Substanzklasse zusammengefaßt wurden.

Interessanterweise wurden in den Fraktionen 1 und 2, in denen die klassischen chlororganischen Schadstoffe und die mono- bis bicyclischen PAH vertreten sind, keine meßbaren mutagenen Effekte induziert. Versucht man die Inhaltsstoffe der Probenextrakte nach einem denkbaren biogenen bzw. anthropogenen Ursprungs zu ordnen, scheint der Anteil an Verbindungen anthropogener Herkunft in den unpolaren Fraktionen (1-3) deutlich höher zu sein als in den eher polaren Fraktionen 4-7. Die nachfolgenden Tabellen dokumentieren die in der „Schwebstoffprobe Magdeburg“ identifizierten Verbindungen, die aus Gründen der Übersichtlichkeit nach Verbindungsklassen zusammengefaßt nacheinander diskutiert werden. Die Fraktionszugehörigkeit einer Verbindung wird in der ersten Spalte wiedergegeben.

Tabelle 39 : Auswahl in der Schwebstoffprobe Magdeburg identifizierter Alkylbenzole

Fraktion	Verbindung
2	Toluol
2	Ethylbenzol
2	Diethylbenzol
2	Ethylmethylbenzol
2	Dimethylethylbenzol
2	Trimethylbenzol
1	Propylbenzol
1,2	Butylbenzol
2	Di- <i>iso</i> -propylbenzol
2	Methylhexylbenzol
2	Tetramethyldihydroinden
3	Tetramethylindan
3	1-Methyl-1 <i>H</i> -inden
2	Dihydroinden
2	2- <i>tert</i> -Butyltoluol
3	1,1'-Bis- <i>p</i> -tolylethan

Alkylaromaten und aliphatische Kohlenwasserstoffe machen zusammengefaßt etwa einen Anteil von 60 % der insgesamt identifizierten Verbindungen in den Sedimentextrakten aus. Alkylierte Benzole finden u.a. Verwendung in Treibstoffen (Antiklopffmittel; Ottokraftstoffe). Außerdem wurden lineare Alkylbenzole (Phenyldecane) identifiziert, deren Vorkommen in Sedimenten der Elbe nicht ungewöhnlich ist. Sie bilden die Vorstufe der synthetischen linearen Alkylbenzolsulfonate.^[35] Ihre eher lipophilen, adsorptiven Eigenschaften bedingen hohe Akkumulationen in Sedimenten und Böden. Betrachtet man ausschließlich das genotoxische Potential für diese Substanzgruppe, sind bis auf wenige Ausnahmen keine mutagenen Wirkungen bekannt. Die Genotoxizität einer Verbindung steht im Zusammenhang mit der Elektrophilie der Substanz, wodurch eine DNA-Adduktbildung ermöglicht wird.

Neben den alkylierten Benzolen war ebenso der Gehalt an polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH) in den Fraktionen 1-3 sehr hoch (siehe auch Abbildung 47). Diese Substanzgruppe wird als eine der wichtigsten Umweltcarcinogene überhaupt angesehen. Sie entstehen im wesentlichen bei jedem Verbrennungsprozeß und auf natürliche Weise durch Pyrolysereaktionen von Aminosäuren, Fettsäuren, Kohlenhydraten und mikrobielle Prozesse. Dementsprechend sind die zu messenden Konzentrationen in Böden und Gewässersedimenten sehr hoch, wobei allein durch landwirtschaftlichen Dünger und Torf ein Boden einen Gehalt bis zu

1300 [µg/kg] erreichen kann. Die durchschnittliche Konzentration von Benz[*a*]pyren im Elbesediment bei Magdeburg lag 1996 bei 880 µg/kg TG^[106].

Für eine große Zahl von PAH sind mutagene Effekte nachgewiesen worden, wobei hier wiederum den Transformationsprodukten (Metaboliten) eine besondere Bedeutung zukommt. Sie müssen metabolisch in reaktive Elektrophile (Epoxide) überführt werden. Die Abbildung 48 zeigt mögliche Umwandlungswege am Beispiel des Benzo[*a*]pyrens. Es wird die Bildung der *trans*-Dihydrodiol aus Arenoxiden schematisch aufgezeigt. Epoxide sind hierbei die reaktiven Intermediärprodukte und bilden die Vorstufen von Phenolen und Dihydrodiolen. Es ist bekannt, daß hauptsächlich „non *K*-region-Metabolite“, wie die Bay-Region-Diolepoxide, eine kovalente Bindung mit der DNA eingehen können. Ein weiterer metabolischer Umwandlungsweg führt zu den alkylierten (+methyl) PAHs durch cytosolisches *S*-Adenosyl-*L*-methionin. Substitutionen der Ringe mit Methylgruppen können zum Teil auch eine Wirkungsverstärkung auslösen (z.B. 7,12-Dimethylbenz(*a*)anthracen).

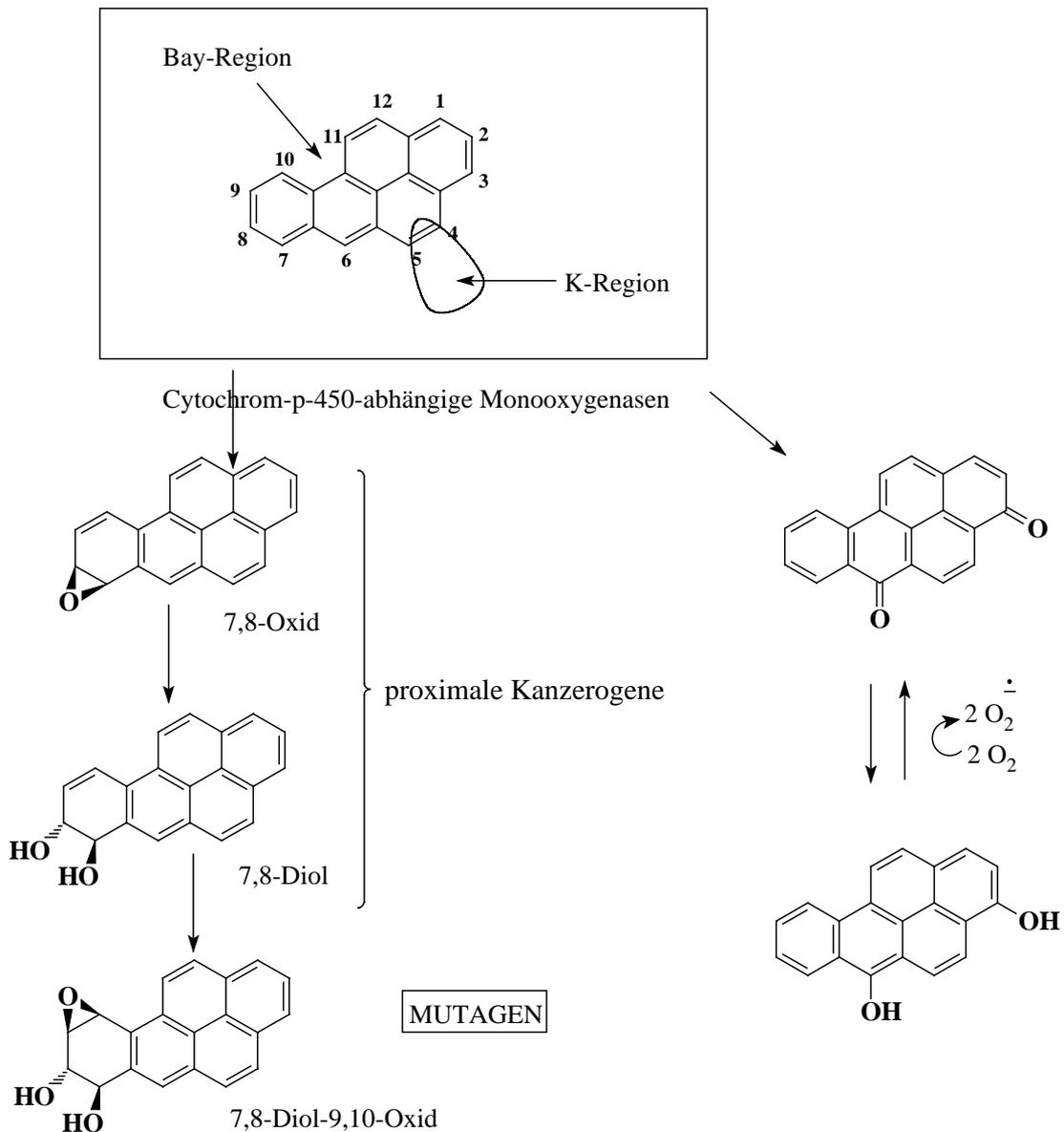


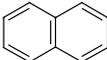
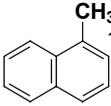
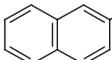
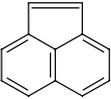
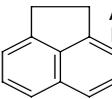
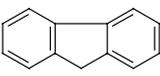
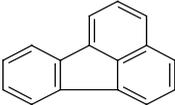
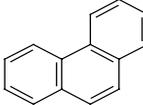
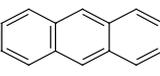
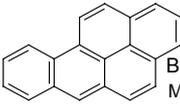
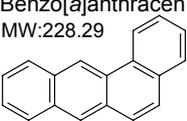
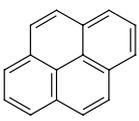
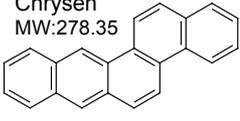
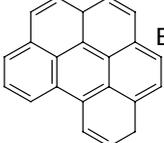
Abbildung 48: Mögliche Umwandlungswege und Aktivierung des Benzo[*a*]pyrens zum mutagenen Diol^[167]

In den ersten beiden Fraktionen der Probenextrakte wurde keine mutagene Wirkung festgestellt, jedoch erwies sich Fraktion 3 im Test in Gegenwart von BA 146 und 149 mit und ohne S9-Zusatz als mutagen. Über die katalytische Aktivität der Nitroreduktase im Testbakterium BA 146 wirken Nitroaromaten direkt mutagen. Aufgrund dieser besonders spezifischen und empfindlichen Detektion wurde zunächst einmal die Ursache der ausgelösten Effekte im Vorkommen dieser Verbindungen vermutet. Die ubiquitär meist mitentstehenden Nitroanaloge der PAH, die sogenannten Nitro-PAH, wie z.B. Nitropyren, sind theoretisch ebenso Eluenten in der dritten und vierten Fraktion, konnten aber hier nicht nachgewiesen werden.

Trotzdem sind die ermittelten Konzentrationen der in der Probe untersuchten 16 PAH (EPA) beachtlich. Vor allem tricyclische aromatische Kohlenwasserstoffe gehörten zu den dominierenden Inhaltsstoffen der dritten Fraktion. In einer Studie zur biotestgeleiteten Analyse hochkontaminierter und mäßig kontaminierter Sedimente (Hamilton Harbour, Elbe) von B. Schmidt^[135] wurden organische Probenextrakte auf akute und mutagene Toxizität untersucht. Die Effekte, welche für Sedimentextrakte der Elbe ermittelt wurden, waren relativ gering, hingegen ergab die Analyse der wesentlich stärker belasteten kanadischen Sedimente eine signifikante toxikologische Wirkung. Die beobachteten Effekte konnten nach Verifizierung über Reinsubstanzen einem Gemisch von PAH zugeordnet werden. Die Autorin führte vor allem die hohe akute Toxizität auf die Aromaten zurück, wobei eine Auswahl der 16 EPA-PAH, darunter Naphthalin, Phenanthren, Acenaphthen, Fluoren und Pyren, als Einzelsubstanzen und auch als binäre Mischungen über den Microtoxtest untersucht wurden. Die auf diese Weise erhaltenen Effekte korrelierten in etwa mit der gemessenen Toxizität der Probenextrakte.

In Tabelle 40 sind einige der wichtigsten PAH aufgelistet, die mit Hilfe von Standard-Referenzmaterial verifiziert wurden. Eine große Anzahl weiterer PAH konnte ebenso identifiziert werden, darunter u.a. auch sauerstoffhaltige Aromaten wie die Benzofurane. Eine Auflistung aller weiteren polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe der Magdeburger Probe ist dem Anhang beigelegt.

Tabelle 40 : Eine Auswahl der in der Elbe-Schwebstoffprobe bei Magdeburg verifizierten PAH

Fraktion	Verbindung	Mutagenität
2,3	 Naphthalin MW:128.17	-
2,3	 1-Methylnaphthalin MW:142.20	-
2,3	 2-Methylnaphthalin MW:142.20	-
2,3	 Acenaphthylen MW:152.19	-
2,3	 Acennaphten MW:170.25	-
2,3	 Fluoren MW:166.22	-
2,3	 Fluoranthren MW:202.25	+
2,3	 Phenanthren MW:178.23	(+)
2,3	 Anthracen MW:178.23	
3	 Benzo[a]pyren MW:252.31	+
3	 Benzo[a]anthracen MW:228.29	-/+
3	 Pyren MW:202.25	+
3	 Chrysen MW:278.35	-/+
3	 Benzo(g,h,i)perylene MW: 276.33	+

Die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der Fraktion 3 des Schwebstoffprobenextrakts ist insgesamt noch sehr komplex (s.a. Abbildung 47). Neben den PAH, konnten ebenso hohe Belastungen durch chlorierte Pestizide und deren Transformationsprodukte, nitroaromatische und schwefelorganische Verbindungen, chlorierte Aniline und verschiedene Isomere der halogenierten Bis-propylether nachgewiesen werden. Die zuletzt genannten Verbindungen zeigen im Ames-Test eine mutagene Wirkung.^[168]

Im physiologischen Intermediärstoffwechsel kommen C-Cl Bindungen nur in Ausnahmefällen vor. Auch bei toxisch wirkenden Naturstoffen ist diese Bindungsart eine Seltenheit^[167], daher können die im folgenden aufgelisteten chlororganischen Verbindungen weitgehend als anthropogene Stoffe bezeichnet werden. Eine mutagene Wirkung im Ara-Test ist für die meisten Substanzen nicht bekannt.

In der nachfolgenden Tabelle 41 sind die in der „Schwebstoffprobe Magdeburg“ identifizierten CKW aufgelistet, wobei über die in Spalte 2 angegebene Nummer eine Zuordnung der Substanzen zu den im Anhang abgebildeten Chromatogrammen (Probenfraktionen 3, 4, 5) ermöglicht wird.

Tabelle 41 : Chlororganische Verbindungen, identifiziert in der Schwebstoffprobe Magdeburg (Fraktionen 1-3)

Fraktion	Nr.	Verbindung	Fr.	Nr.	Verbindung
		Chlorbenzole			
1,2	1	Dichlorbenzole (3 Isomere)	3	55	α -HCH
1,2	17	Trichlorbenzole (3 Isomere)	3		β -HCH
1,2	34	Tetrachlorbenzole (2 Isomere)	3		γ -HCH
1,2		Pentachlorbenzol	3		DDMU (2 Isomere)
1,2		Hexachlorbenzol	3,2		<i>o,p</i> -DDE
		Halogenalkane			
1,2		Trichlorbutadien	3	76	<i>p,p'</i> -DDE
1,2		Tetrachlorbutadien (Isomere)	3	75	<i>o,p'</i> -DDD
1,2		Pentachlorbutadien (Isomere)	3		<i>p,p'</i> -DDD
1,2		Hexachlorbutadien	3	81	<i>o,p'</i> -DDT
2		Octachlorpenten	3	77	<i>p,p'</i> -DDT
			4	61	4,4'-Dichlorbenzophenon
1		Octachlorstyrol	4		2,4-Dichlorbenzophenon
					Haloether
			3	8	2,3-Dichlor-1-propyl-1,3-dichlor-2-propylether (oder anderes Isomer)
		PCB und chlorierte PAH			
1,2		Trichlorbiphenyle (2 Isomere)			2 weitere Isomere (nicht zugeordnet)
1,2		Tetrachlorbiphenyle (2 Isomere)			
1,2		Pentachlorbiphenyle (7-8)			
1,2		Hexachlorbiphenyle (8)			
1,2		Hepatachlorbiphenyle (7)			
1		3-Chlor-methoxy-PCB			
2		2-Chlor-naphthalin			
2		Dichloraphthalin (2 Isomere)			
2		Hexachlornaphthalin			

Aufgrund der Befunde für die Fraktionen 3, 4 und 5 in den Mutagenese-Tests BA 14, 146 und 149 wurden aromatischen Amine und Nitroaromaten im Rahmen der vorliegenden Arbeit intensiver untersucht. Sie gelten häufig als potentielle Carcinogene, 90 % der aromatischen Amine und 70 % der bekannten Nitroaromaten sind als krebserregend eingestuft und stellen damit ein hohes Gesundheitsrisiko für den Menschen dar. Anilin z.B. ist eines der wichtigsten Zwischenprodukte der organischen Chemie und wird für die Herstellung von Farben; Pharmazeutika, Harzen, Isocyanurstoffen, Kautschukchemikalien und Bioziden verwendet. Nitroaromatische Verbindungen sind ebenfalls in dem Probenextrakt nachweisbar, wenn auch in relativ geringen Mengen in den Fraktionen 5b und c.

Die folgende Tabelle 42 sowie die Abbildung 49 zeigen eine Auswahl der in den polaren Fraktionen (3-6) identifizierten nitro- und aminoaromatischen Verbindungen.

Tabelle 42 : Ergebnisse der Untersuchung auf Nitro- und Aminoverbindungen in den Extraktfraktionen für die Probe Magdeburg

Fraktion	Nr.	Verbindung	Mutagenität ^[169,170]
3		Nitrobenzol	- / + (S9)
3,4		4-Nitrotoluol	+
3		1-Chlor-2-nitrobenzol	+
3		1-Chlor-3-nitrobenzol	-
3,4	10	1,2-Dichlor-4-nitrobenzol	(+)
		4-Methyl-2-nitrophenol	(+)
3		Moschus-xylol	-
4		Moschus-ke-ton	-
4,5		4-Amino-MX	-
3		2-Chloranilin	(+) /+ (S9)
4		2,3-Dichloranilin	(+)
3,4	22	2,5-Dichloranilin	-
4	14	2,4-Dichloranilin	-
3,4	30	Trichloranilin (2 Isomere)	(+) ?
4	33	5-Chlor-2-nitroanilin	
5b,c	64	2-Chlor-4-nitroanilin	
4		2,6-Dichlor-4-nitroanilin	(+)
4		2,6-Dichlorpyridin	?
3		6-Chrysenamin	+
		Diphenylamin (evt. a. 4-Aminodiphenyl)	+ (S9)
5b, c	28	Dimethylaminobenzoessäure	?
5c	43	Aminothiophen	?
5b,c	51	Dimethoxy- <i>N,N</i> -dimethylbenzamin	?
5c	40	Diethyl-4-nitrophenylamin	?
6	14	3-Nitro-4-hydroxy-acetophenon	?

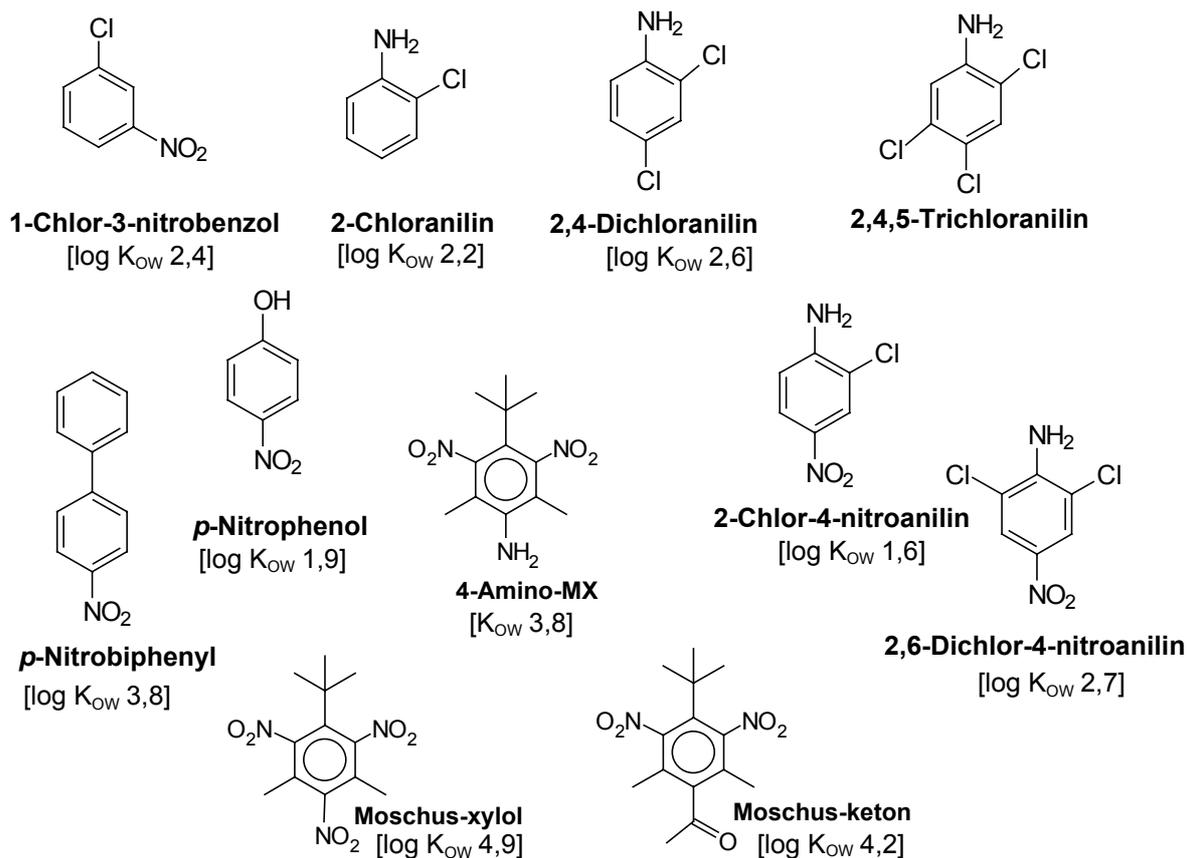


Abbildung 49 : Auswahl der identifizierten Nitro- und Aminoverbindungen im Extrakt der Schwebstoffprobe Magdeburg

Ferner wurden, wie aus der Zusammenfassung in Abbildung 47 ersichtlich, unterschiedliche Phthalsäureester, Alkylphenole und zudem sterioide Verbindungen in den polareren Fraktionen nachgewiesen. Die genannten Verbindungsklassen traten ebenso im Schwebstoffextrakt der Probe Schnackenburg auf, die im anschließenden Abschnitt 3.4.8 im Zusammenhang mit der Untersuchung auf östrogene Wirkung diskutiert werden soll.

Im Vergleich zu den bisher untersuchten Sedimentproben waren in dem Extrakt der Magdeburger Probe bemerkenswert viele synthetische Duftstoffen angereichert, welche überwiegend in Fraktion 5 nachgewiesen wurden. Die nachfolgende Tabelle 43 faßt die ermittelten Konzentrationen zusammen. Es konnten in der Probe mehrere produktionsbedingte Nebenprodukte des HHCB bestimmt werden, deren Gehalte sich jedoch < 1 ng/g FG (<BG) bewegten. Die Analyse einer SPMD-Probe derselben Station (Magdeburg, gleiche Probenahme-Stelle) von 1997 durch R. Gatermann zeigte bereits, daß diese Substanzen dort in noch höheren Gehalten vorkamen und in SPMD die dominanten Signale der Fraktionen 4 und 5 darstellten.^[49] Da das Analysenverfahren für die SPMD-Probe nahezu identisch war und die seinerzeit erhaltenen Fraktionseelutate der Kieselgel-Chromatographie noch vorhanden waren, bot sich hier die Gelegenheit für einen direkten Vergleich potentieller akuter Toxizität von organischer Substanz, die aus dem Wasser mit Hilfe von SPMD angereichert worden war, mit den im organischen Sedimentextrakt angereicherten Substanzen. Die Ergebnisse werden im folgenden Teilabschnitt diskutiert.

Tabelle 43 : Ermittelte Konzentrationen für die synthetischen Duftstoffe gemessen in der Schwebstoffprobe Magdeburg, Fraktion 5 (a, b, c), im Vergleich zu den Daten einer SPMD-Probe von 1997 [49]

Verbindung	Schwebstoffprobe [ng/g] FG	SPMD-Probe 1997 [ng/g] Triolein
Celestolid	20	56
Phantolid [®] (AHDI)	65	205
Traseolid [®] (ATII)	7	151
Galaxolid [®] (HHCB)	123	8040
Tonalid [®] (AHTN)	95	3560
Nebenprodukt (HHCB) 1	< BG	
Nebenprodukt (HHCB) 2	< BG	
Nebenprodukt (HHCB) 3	< BG	
Nebenprodukt (HHCB) 4	< BG	
4-Amino-MX	6	
HHCB-Lacton	82	

3.4.7.3 Vergleich der akuten Toxizität des Schwebstoffextraktes und einer SPMD-Probe aus Magdeburg

Es wurden die Fraktionen 1-6 der SPMD-Probe Magdeburg in DMSO gelöst und vergleichend über den Leuchtbakterientest auf akute Toxizität untersucht. Abbildung 50 präsentiert die Ergebnisse.

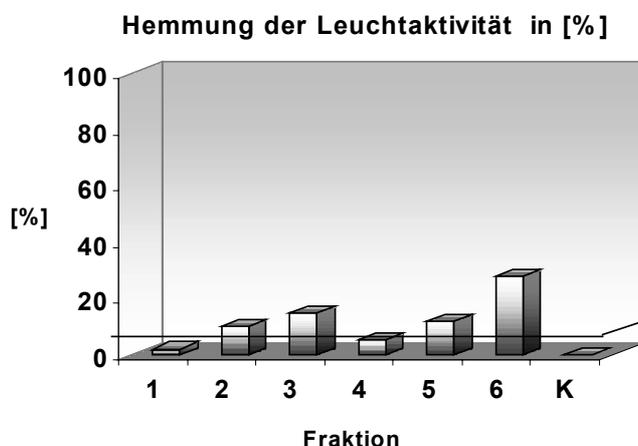


Abbildung 50: Ergebnisse der Untersuchung auf akute Toxizität der SPMD-Probe aus Magdeburg, Fraktion 1-6 (K = Kontrolle), mit Hilfe des Leuchtbakterien-Tests

Ein signifikanter Effekt ist bei einer Hemmung > 10 % gegeben, damit erwiesen sich die SPMD-Fraktionen 2,3,5 und 6 als gering toxisch. Die höchste Toxizität wurde für die bereits sehr polare Fraktion 6 erkannt, deren GC-MS-Analyse jedoch keine Hinweise auf toxikologisch relevante Verbindungen ergab. Dies mag u.a. auch daran liegen, daß sich die in dieser Fraktion enthaltenen polaren Verbindungen weitgehend einer GC-MS-Analyse entzogen und erst nach einer Derivatisierung zugänglich gewesen wären. Die Zusammensetzung der Fraktionen 3,4 und 5 ist im wesentlichen mit der im Magdeburger Schwebstoff-Extrakt gemessenen vergleichbar. Ein vollständiges non-target-Screening ist in der Arbeit von Gatermann dokumentiert.^[49] Im Unterschied zu

der Schwebstoffprobe wurden wesentlich höhere Gehalte und noch zusätzliche Isomere der chlorierten Ether vorgefunden. Ferner wurde als Inhaltsstoff der Fraktion 3 das Pestizid Chlorpyrophos nachgewiesen.

Der Vergleich der man die Ergebnisse der SPMD-Probe mit den ermittelten Effekten der Fraktionen 5, 6 und 7 des Schwebstoffextraktes zeigt, daß in diesem Fall die höchste Toxizität durch Fraktion 7 ausgelöst wurde, also der Fraktion mit der höchsten Polarität. Hierbei ist jedoch unbedingt zu berücksichtigen, daß nur die gemessenen Effekte der jeweiligen Fraktionen einer Probe, miteinander verglichen werden dürfen, da sich der Anreicherungsfaktor für die bioanalytische Untersuchung der SPMD-Probe erheblich von der des Schwebstoffextraktes unterscheidet. Während die SPMD-Probe in DMSO eingesetzt wurde, erfolgte für den Schwebstoffprobenextrakt eine Aufnahme in Wasser, da die erst durchgeführte Untersuchung unter Verwendung von DMSO keine signifikanten Effekte gezeigt hatte. Die absoluten Werte der prozentualen Hemmung sind damit nicht direkt vergleichbar!

Die Analyse der hochpolaren Fraktion 7 ergab nur einzelne per GC-MS identifizierbare Komponenten. Die Chromatogramme waren mit denen, die für die Hintergrundbelastung (Blindwerte) erhalten wurden, praktisch identisch. Es ist daher durch die GC-MS-Analyse ohne Derivatisierungsverfahren kein weiterer Hinweis im Hinblick auf die Toxizitätsverursacher zu erzielen. Alternativ würde möglicherweise würde aber eine Analyse per HPLC-MS Hinweise auf toxikologisch relevante Inhaltsstoffe der polaren Fraktionen liefern.

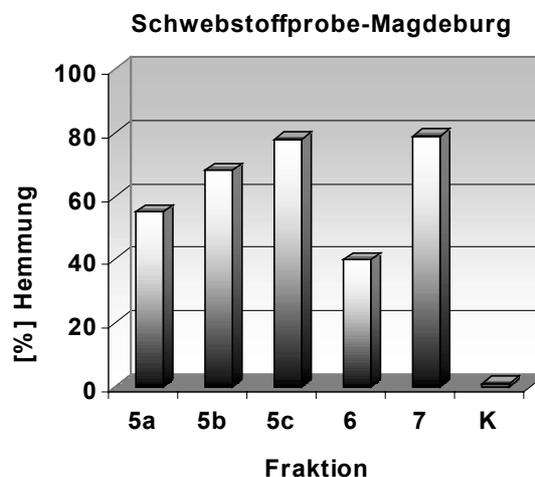


Abbildung 51: Ergebnisse der Untersuchung der Fraktionen 5, 6 und 7 des Schwebstoffextraktes der Probe Magdeburg im Leuchtbakterientest (K = Kontrolle)

3.4.8 Östrogenes Potential einer schwebstoffbürtigen Sedimentprobe

Im Zusammenhang mit der Fragestellung nach einem östrogenen oder antiöstrogenen Wirkpotential sedimentgebundener organischer Stoffe wurde die Probe Schnackenburg für einen Methodenvergleich mit unterschiedlichen Lösungsmitteln extrahiert. Die gewonnenen Extrakte wurden zum einen über eine GC-MS-Analyse verglichen, um mögliche Einflüsse der verschiedenen verwendeten Lösemittel zu ermitteln (siehe hierzu Kapitel 3.4.5). Ferner wurde mit Hilfe des MCF7-

Luc-Tests die östrogene Wirkung der verschiedenen Gesamtextrakte und der Fraktionen des Aceton-Extraktes untersucht.

In Abbildung 52 sind die ermittelten relativen Effekte dokumentiert. Eine östrogene Aktivität ist bei einem relativen Effekt von 0,1 (10 %) gegeben. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, wobei M 1 und M2 stellvertretend für Messung 1 und Messung 2 stehen.

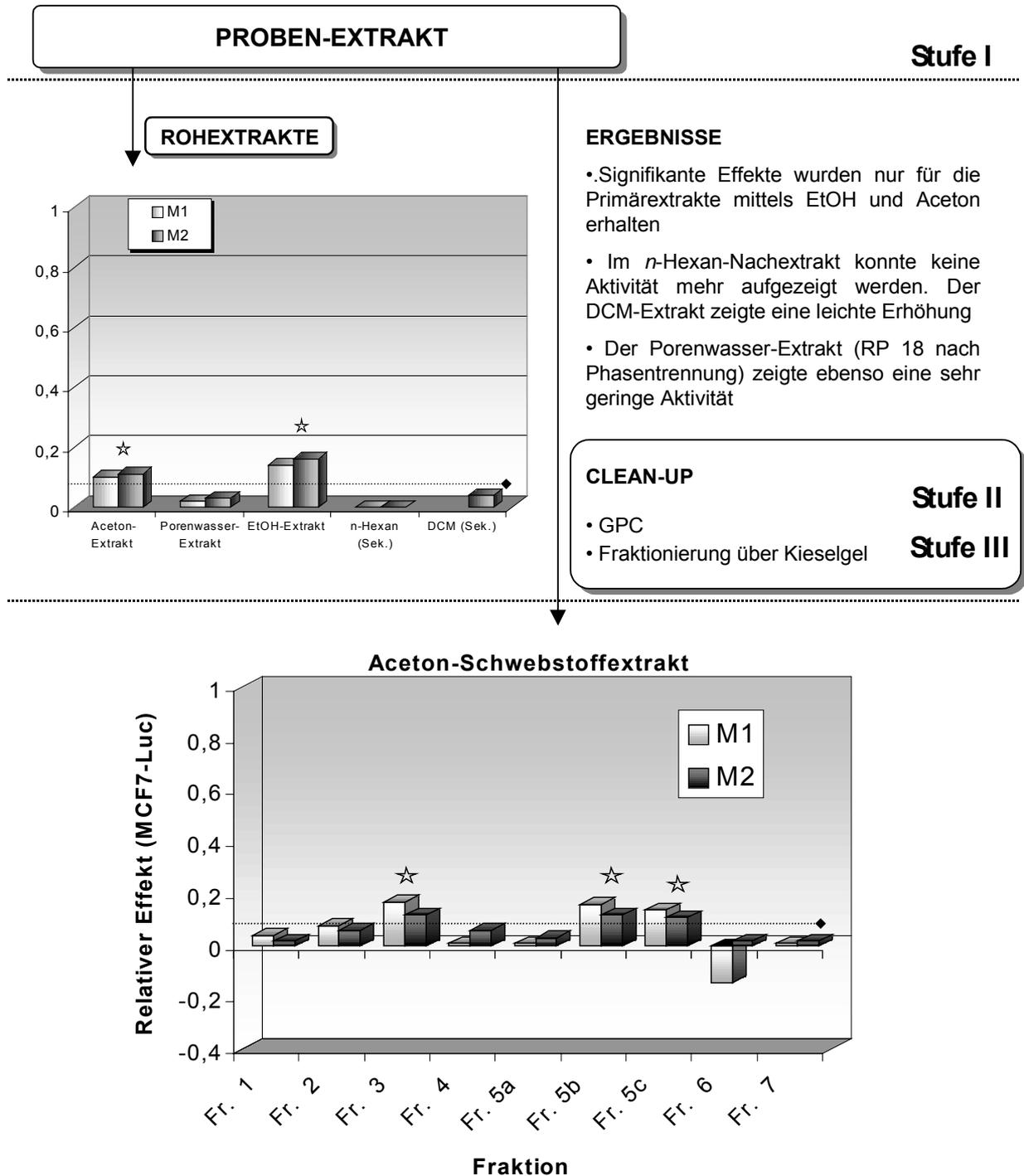


Abbildung 52: Ergebnisse der bioanalytischen Untersuchung (MCF7-Luc-Test) auf östrogene Wirkung einer Schwebstoffprobe (Schnackenburg, Elbe). Darstellung der Resultate für die über verschiedene chemische Solventien erhaltenen Roh-Extrakte sowie der Fraktionen des Aceton-Extraktes.

Die untersuchten Gesamtextrakte wiesen insgesamt nur eine geringe östrogene Aktivität auf. Der höchste relative Effekt entsprach etwa 20 % und wurde für den EtOH-Extrakt erhalten. Die Primärextrakte, welche insgesamt eine höhere Stoffmenge beinhalten, zeigten hier wiederum die stärkeren Effekte. Die zweite Extraktion der Schwebstoffprobe mit Dichlormethan ergab in einer der Messungen noch einen geringen Response jedoch war dieser nicht signifikant ($< 0,1$).

Eine weitere Parallele zu den bereits beschriebenen Ergebnissen für die Probe aus Magdeburg besteht in den Analysen-Ergebnissen für die einzelnen Fraktionen. Wiederum wurden die deutlichsten Effekte für die Fraktionen 5b und 5c erhalten, aber auch in Fraktion 3 liegt ein östrogenes Wirkpotential vor. Die relativen Effekte der Einzelfraktionen lagen in etwa in der gleichen Größenordnung (Wirkstärke) wie auch die Wirkpotentiale, die für den Aceton-Gesamtextrakt erhalten wurden. Die folgenden Abbildungen 52, 53 und 54 zeigen die Ergebnisse der GC-MS Untersuchung. Die dominanten Signale konnten zum Teil Verbindungen bzw. Einzelspektren zugeordnet werden (s.a. Abbildung 54, 54). Ob für diese ein direkter Zusammenhang zu den erhaltenen Effekten besteht, kann zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden. Hierfür sollte eine Gegenprüfung der Ergebnisse über Reinsubstanzen erfolgen. Ferner wäre eine weitere Auftrennung der Fraktionen und erneute Analyse auf ein Wirkpotential der weniger komplexen Mischungen sinnvoll.

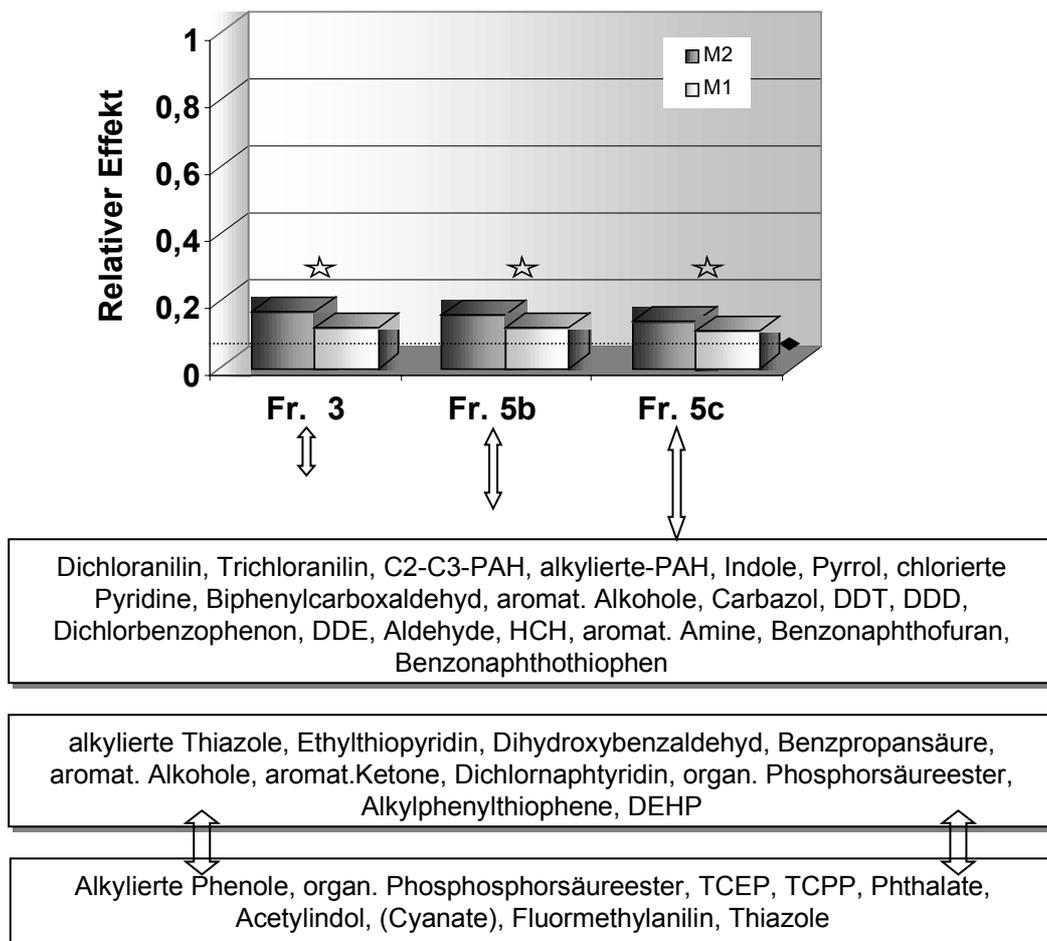


Abbildung 53: Zusammenfassende Darstellung der chemischen Analyse der Aceton-Extraktfraktionen 3, 5b, 5c der Schwebstoffprobe Schnackenburg sowie deren östrogene Wirkung, ermittelt mit Hilfe des MCF7-Luc-Tests.

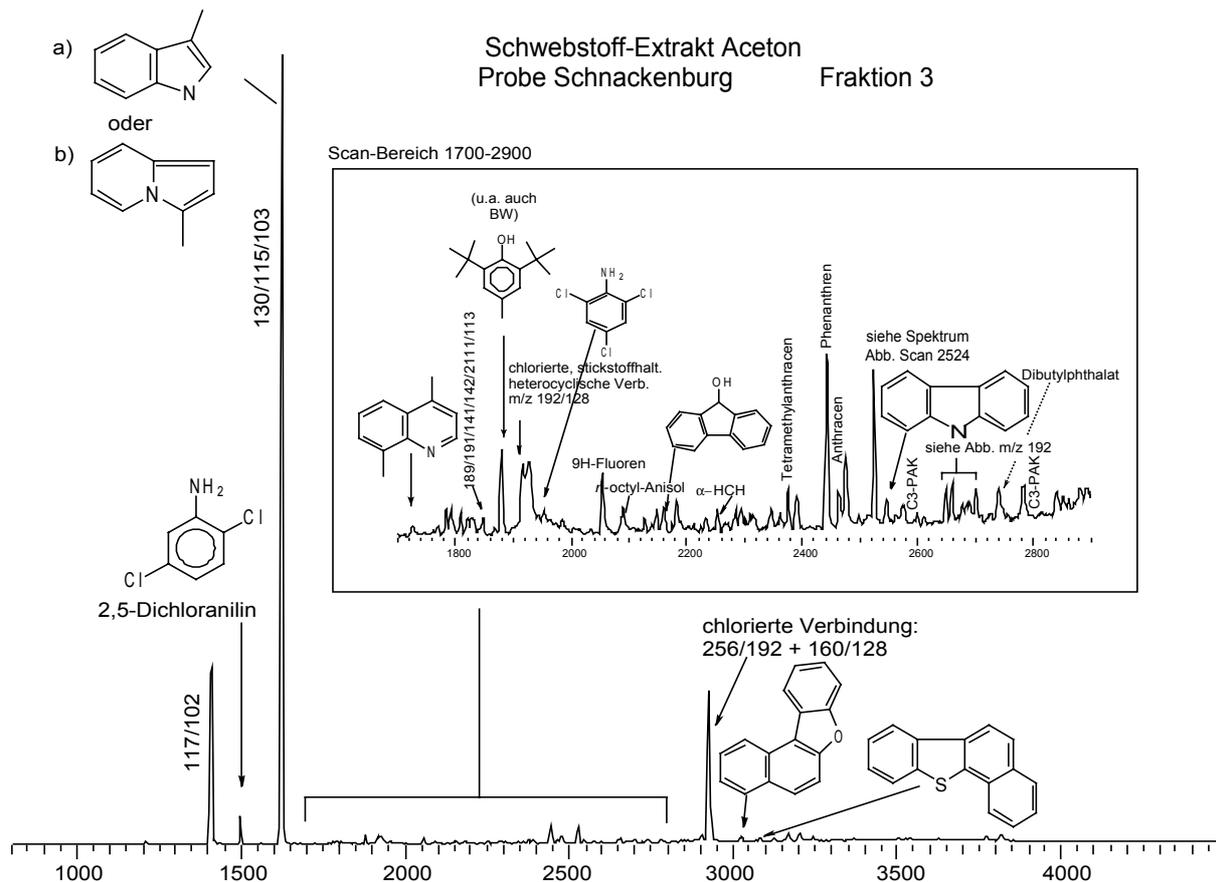


Abbildung 54: Ergebnisse der Auswertung des GC-MS-Chromatogrammes der Fraktion 3 des Aceton-Extraktes, "Schwebstoffprobe Schnackenburg, Elbe"

Im Vergleich der Fraktionen 5b und c konnte im vorderen Retentionsbereich eine unterschiedliche Höhe für eines der ersten Signale (Scan-Nummern 882 bzw. 877) beobachtet werden. Für dieses Signal wurde unter den gewählten Gerätebedingungen kein interpretierbares Spektrum erzielt, da als einzige Massenfragmente m/z 107 und m/z 108 erhalten wurden. Die Peakfläche für dieses Signal ist deutlich größer als die der anderen Signale. Während in Fraktion 5c dem erhaltenen Massenspektrum nach vermutlich die Benzpropansäure einen hohen Gehalt aufweist, ist das entsprechende Signal in Fraktion 5b hingegen nur von geringer Größe. Insgesamt umfaßt Fraktion 5c wesentlich mehr Substanzen. Ferner wurden in dieser Fraktion Verbindungen identifiziert, für die eine östrogene Aktivität bereits in Reinsubstanz-Untersuchungen nachgewiesen worden ist (Bsp. Alkylphenole). Des weiteren waren im hinteren Retentionsbereich des Chromatogramms für Fraktion 5c eine Reihe an Komponenten zu erkennen, die eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu den Steroiden aufweisen und damit auch als potentielle Verursacher der erhaltenen Effekte in Frage kommen. Die deutlich schlechtere Auflösung der Signale zeigt, daß diese Substanzklasse ohne eine vorherige Derivatisierung und zudem auf einer relativ unpolaren stationären Phase nur sehr unzureichend und wahrscheinlich mit geringer Diskriminierung detektiert werden. In Sedimenten ist zumeist ein hoher Gehalt an Isoprenoiden, sesqui- und triterpenoiden Verbindungen (Hopane) sowie Steranen und deren aromatische Analoge (Steroide) vorzufinden (s.a. Kapitel 2.4). In bezug auf die hier vorliegende Themenstellung sind vor allem die aromatischen Sterane zu berücksichtigen deren charakteristischen Massenfragmente m/z 231 und m/z 253 auch in den Extraktfraktionen der Schwebstoffprobe Schnackenburg vorgefunden wurden. Hydroxy- und auch Ketosubstitutionen dieser

Komponenten erhöhen die Polarität und verschlechtern damit die Chromatographie, wodurch der hintere Retentionsbereich des Chromatogramms für die Fraktion 5b gekennzeichnet war.

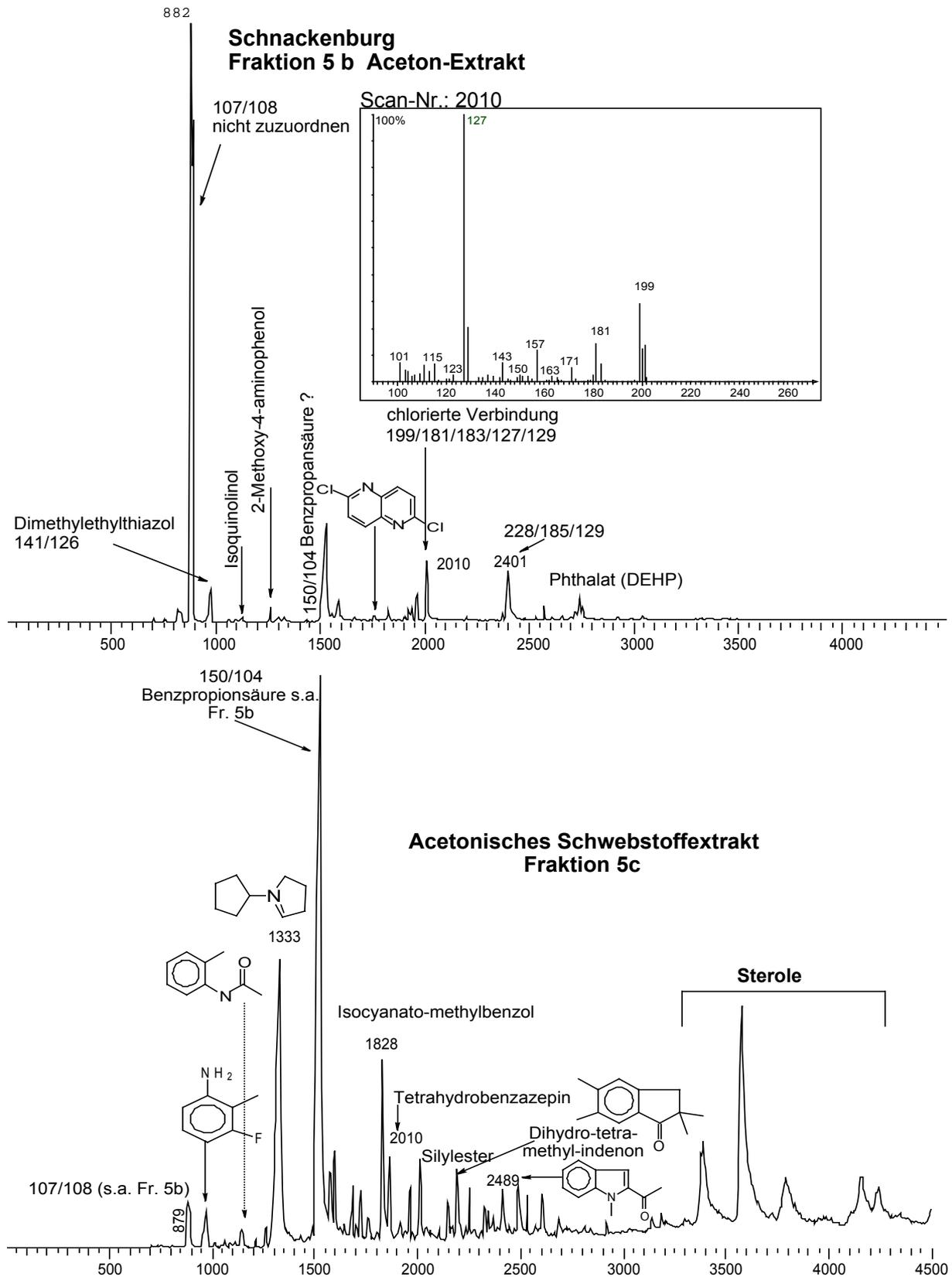


Abbildung 55: Ergebnisse der Auswertung des GC-MS-Chromatogramms der Fraktionen 5b und 5c des Aceton-Extraktes, Schwebstoffprobe Schnackenburg, Elbe

Es wurden wiederholt die Phthalate und organischen Phosphorsäureester, wie z.B. Tri-*n*-butylphosphat und Tri-*iso*-butylphosphat, nachgewiesen, die als Weichmacher in Klebern und Plastikerzeugnissen, aber auch als Flammschutz- und Gleitmittel verwendet werden. Die Phthalate sind seit geraumer Zeit bereits ubiquitär in der Umwelt vorzufinden (Vergl. Kapitel 2.4). Bedingt durch ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften, eignen sie sich als Weichmacher für fast alle gebräuchlichen Plastikerzeugnisse. Etwa 3 Millionen Tonnen, 87 % der weltweiten Gesamtproduktion 1993, wurden für diesen Zweck eingesetzt.^[171] Die resultierenden Kunststoffe können bis zu 60 % ihrer Masse an Phthalaten enthalten. Hinzu kommt, daß dies bei weitem nicht die einzige Verwendungsform der Phthalate ist; sie werden noch in einer Vielzahl weiterer Produkte unter anderem auch als Zusatzstoffe von Kosmetika und Parfümen eingesetzt. Der Eintrag in die Umwelt erfolgt durch Produktions- und Verarbeitungsprozesse, oder ebenso über Verdunstung, Verdampfung, Auswaschung und Entsorgung von Kunststoffen.

Die hohen Einträge spiegeln sich u.a. in hohen Gehalten in Gewässersedimenten wider. Daher ist diese Substanzklasse bei einem integrierten biologischen und chemischen Screening-Verfahren zu berücksichtigen. Die Unterschiede der Verbindungen innerhalb der Substanzklasse werden durch die jeweiligen Alkoholkomponenten geprägt. Man unterscheidet Phthalate mit zwei identischen und mit unterschiedlichen Alkoholkomponenten, die im wesentlichen Alkylgruppen enthalten. Die Phthalate mit unterschiedliche Alkoholkomponenten, nehmen unter den industriell erzeugten nur eine untergeordnete Rolle ein. Das Butylbenzyl-Phthalat (BBP) bildet hierbei die einzige Ausnahme. Die $\log K_{ow}$ -Werte dieser Substanzklasse reichen von ca. 3,7 beim Dimethylphthalat (DMP) bis zu 5,3 für das Dioctylphthalat (DOP). Das am stärksten in den Sedimenten angereicherte Phthalat ist das Diethylhexylphthalat (DEHP).

In bezug auf eine ökotoxikologische Bewertung und ihr Umweltverhalten können die Phthalate nicht pauschal als Stoffgruppe bewertet werden, da sie sich in ihren Eigenschaften in Abhängigkeit von Molekulargewicht und Struktur der Alkoholkomponenten stark unterscheiden. Das Phthalat mit dem kürzesten Alkoholrest (DMP) wird zum Beispiel sehr rasch abgebaut und unterscheidet sich erheblich vom am weitesten verbreiteten DEHP. Dieses wird nur sehr langsam abgebaut und hat eine hohe Adsorptionstendenz und eine signifikante, wenn auch im Vergleich zu DDT und PCB geringere, Akkumulationstendenz. DEHP, aber auch weitere Phthalate, gelten als Peroxisomen-Proliferatoren, sie induzieren die Zellproliferation in der Leber und können als Tumorpromotoren (Nagetiere) wirken. Seit einigen Jahren stehen diese Benzoldicarbonsäureester im Verdacht, eine endokrine Wirkung hervorzurufen. Da die Phthalate in fast allen Lebensmittelumverpackungen enthalten sind und leicht entweichen, besteht allgemein die größere Gefahr für den Menschen durch Resorption aus der Nahrung bzw. Inhalation über die Raumluft (z.B. Autoinnenräume). Stark umstritten sind die Phthalate auch als Zusatzstoffe in Plastik-Kinderspielzeugen für Kinder unter 3 Jahren, wobei gerade diese Anwendungen erst in jüngster Zeit in Europa und den USA aufgrund der potentiellen hormonellen Wirkung von Phthalaten untersagt wurde.

In der Tabelle 44 sind die bei der Analyse des Extrakts der Probe Schnackenburg auffällig gewordenen Phthalate beschrieben. Eine Quantifizierung der Substanzen ist, wie die der Vergleich mit den Daten für die Hintergrundbelastung zeigt, nicht möglich. Der Versuch die gemessenen Gehalte

der Probe und eines Kontrollextraktes (Blindwert) gegenüberzustellen, demonstriert die mögliche hohe Belastung mit Phthalaten als Hintergrundkontamination besonders gut. Eine Ausnahme bildet das DEHP das generell in den, in der vorliegenden Arbeit untersuchten Sedimentenproben etwa 10mal höher als in den Blindproben konzentriert war. Insgesamt treten jedoch in unterschiedlichen Laborräumen verschiedene Hintergrundbelastungen auf und zudem bestehen hierfür extreme Schwankungen. Die beschriebene Problematik verdeutlicht besonders anschaulich, daß eine hohe „Qualität“ der verwendeten Lösungsmittel und Laborgeräte notwendig ist und diese besonders regelmäßig zu prüfen sind, um Konataminationen zu vermeiden.

Tabelle 44 : Vergleich ermittelter Konzentrationen verschiedener Phthalsäureester in der Schwebstoffprobe Schnackenburg (Farktionen 3-5) im Vergleich zu einem Extraktionsblindwert

Verbindung	Probe [ng/g] FG	Blindwert [ng/g]
Dimethyl-phthalat	11	10
Diethyl-phthalat	1,4	0,6
? Phthalat	<BG	< BG
? Phthalat	<BG	< BG
Di- <i>iso</i> -butylphthalat	9	10
Di- <i>n</i> -butylphthalat	30	13
2-Butoxy-ethylbutyl-phthalat	< BG	0,74
? Phthalat	0,2	< BG
<i>n</i> -Butyl-phenylmethyl-phthalat	0,2	< BG
<i>n</i> -Benzyl-butyl-phthalat	1,3	<BG
Di(2-ethylhexyl)phthalat	105	11
Di-octyl-phthalat	< BG	<BG

Im Zusammenhang mit der Diskussion über chemische Zusätze und deren Vorkommen in der Umwelt sollte die Verbindung 2,6-*Bis*(ethyl-1,1-methyl)-4-methylphenol nicht unerwähnt bleiben. Diese Verbindung wird u.a. auch zur Konservierung von Lebensmitteln (Antioxidans) eingesetzt. Wie für die meisten Stoffe, die als sogenannte „Blindwerte“ in den Kontroll-Extraktionen erfaßt werden, unterliegt auch die Belastung mit 2,6-*Bis*(ethyl-1,1-methyl)-4-methylphenol starken Schwankungen bis hin zu einer „Nullbelastung“. In der hier beschriebenen Untersuchung wurde für die Verbindung ein relativ großes Signal in der Probenfraktion 3 erhalten.

Für zahlreiche Substanzen ist mittlerweile eine Bindung an den Östrogen-Rezeptor nachgewiesen worden. Die Angriffspunkte endokrin wirksamer Substanzen liegen an verschiedenen Stellen, wobei diese hier nur ansatzweise durch den Biotest berücksichtigt wurden. Zu berücksichtigen sind:

- Bindung an den Hormonrezeptor
- Interaktion in der Signal-Transduktionskette
- Beeinflussung der endogenen Hormonsynthese oder
- Beeinflussung des Hormonabbaus,

Untersuchungen, die direkt mit Einzelkomponenten oder auch binären Mischungen durchgeführt werden, bewegen sich häufig in Konzentrationsbereichen fernab von Belastungen die der aquatischen Realität entsprechen, so daß ein Vergleich oder Rückschluß der so erzeugten Ergebnisse meist nicht möglich ist.

Halbquantitative Abschätzungen für die Inhaltsstoffe der Fraktionen, die in den einzelnen Untersuchungen eine Toxizität zeigten, lagen deutlich unterhalb toxikologisch relevanter Schwellenwerte für jede Einzelsubstanz.

Aquatische Organismen sind jedoch einer Vielzahl an Komponenten exponiert, zudem ist über die chronische Wirkung der Stoffe in realitätsnahen Konzentrationen, z.B. für Fische über mehrere Lebenszyklen (in bezug auf hormonelle Einflüsse), bisher wenig bekannt. Das Wirkprofil der Chemikalien ist insbesondere im Hinblick auf subakute bzw. chronische Effekte und zugehörige Wirkweisen zu untersuchen. Ferner bedarf die Analyse einer multiplen Exposition von Schadstoffen einer Berücksichtigung von Kombinationseffekten. Daraus ergeben sich weitere Anforderungen sowohl in methodischer als auch konzeptioneller Hinsicht, die im Rahmen dieser Arbeit nicht erfüllt werden konnten.

3.4.9 Zusammenfassende Betrachtung aller Ergebnisse des biotestgeleiteten Screening in Sedimenten

Im Kapitel 3.4 wurden das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Konzept für ein integriertes chemisches und biologisches Testverfahren vorgestellt und erste Ergebnisse präsentiert. Toxische Wirkungen unterschiedlicher Art wurden sowohl für die Gesamtextrakte als auch für die fraktionierten Probenextrakte der zwei analysierten Elbeschwebstoffproben festgestellt. Die erfaßten Inhaltsstoffe der Probenfraktionen bildeten trotz einer detaillierten Fraktionierung immer noch sehr komplexe Mischungen unterschiedlicher Verbindungen vom Niedrigdosisbereich (ppb) bis hin zur dominanteren Belastung durch beispielsweise petrogene Kohlenwasserstoffe (ppm). Folgende Ergebnisse können für die untersuchten Probenextrakte und das in dieser Hinsicht optimierte Analysenverfahren zusammengefaßt werden:

- ⇒ Es wurden jeweils Verfahrens-Blindproben für die verwendeten organischen Lösungsmittel genommen und vergleichend untersucht. Unter Berücksichtigung einer maximalen DMSO-Toleranz der einzelnen Biotests wurden weder negative Effekte für die in DMSO aufgenommenen Lösungsmittel-Kontrollproben noch für die erstellten Extrakt-Blindproben beobachtet.
- ⇒ Mit Hilfe zweier Schwebstoffextrakte verschiedener Elbe-Standorte wurden die einzelnen Methodenschritte stufenweise durchgeführt und überprüft.
- ⇒ In der ersten Stufe des Verfahrens wurden durch die primären Extrakte der Schwebstoffproben jeweils toxische Effekte in allen drei eingesetzten Biotests ausgelöst, so daß sich eine weitere Aufreinigung und Fraktionierung der Proben anbot.
- ⇒ Ein Vergleich von GC-MS-Analysen der mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln erstellten Rohextrakte zeigte, daß nach Durchführung des Proben-Clean-up deutliche Unterschiede in der extrahierten Stoffmenge für die primären Extrakte und die nachgeschalteten sekundären Extrakte der Schwebstoffproben vorliegen. Im Endergebnis erwies sich das Extraktionsmittel Aceton als am leistungsfähigsten für eine chemische Bestandsaufnahme

sedimentgebundener Stoffe. Der Einsatz von Aceton für die Extraktgewinnung ist auch aus toxikologischer Sicht möglich.

- ⇒ Die Aufreinigung der Probenextrakte durch die GPC führte zu keiner starken Reduzierung vorhandener Toxizitäten, vergleicht man die gemessenen Wirkungen für die Rohextrakte und der Hauptfraktion nach der GPC. Ein etwas uneinheitliches Bild wurde aus der Untersuchung mit dem Leuchtbakterientest erhalten. Hier sind noch ergänzende Studien notwendig.
- ⇒ Die signifikant toxischen Effekte waren, soweit sie aus den sequenziellen Untersuchungen (Stufe III) abgeleitet wurden, für alle Biotests vorwiegend auf die eher polaren Fraktionen 3-5 beschränkt. Bei Überführung des fraktionierten Probenextraktes in Wasser wurde für alle untersuchten Fraktionen (1-7) eine akute Toxizität im Leuchtbakterientest erhalten, wobei die stärksten Effekte wiederum in den polaren Fraktionen vorgefunden wurden. Ein Gesamtüberblick der Ergebnislage bietet das Schema der Abbildung 56.
- ⇒ Eine vollständige Bestandsaufnahme der Inhaltsstoffe der Probenextrakte durch GC-MS lieferte Hinweise auf einzelne Verursacher der gemessenen Effekte. Für eine endgültige Kausalbeziehung bedarf es jedoch noch weiterer Analysen in Form einer stärkeren Auftrennung der immer noch komplexen Mischungen sowie einer Überprüfung einzelner Reinsubstanzen, binärer und multipler Mischungen der identifizierten Komponenten in den Biotests.
- ⇒ Die Ergebnisse des Ara-Tests deuten insgesamt auf ein Vorkommen mutagener Nitro- und Aminoverbindungen in den Schwebstoffproben hin. Durch die GC-MS-Analyse insbesondere der Fraktionen 5b und c wurde u.a. Nitrophenol und ein Isomer des Nitrophenylamins in der Magdeburger Probe identifiziert; die Analyse des Toluolextraktes der Probe aus Schmilka zeigte ein Vorkommen von Triaminotoluol, Aminofluoren und größere Mengen alkylierter Quinoline.
- ⇒ Die Untersuchung des Schwebstoffextraktes der Probe aus Schnackenburg zeigte ein signifikantes endokrines Potential wiederum in dem polaren Primärextrakt an. Nach Aufarbeitung der Proben wurden, wie auch schon in den Untersuchungen des Aratests zuvor, signifikante Effekte für die Inhaltsstoffe der Fraktionen 3, 5b und 5c festgestellt.

weiterhin verfolgt werden. Besonders wichtig erscheint in diesem Zusammenhang ein einheitliches Vorgehen für alle Biotestsysteme.

Es bietet sich an, die Probenextrakte des sequenziellen Extraktionsverfahrens bereits in der ersten Stufe für weitere Untersuchungen und das sich anschließende Clean-up zu rekombinieren, um so den zeitlichen Aufwand für die Probenbearbeitung zu minimieren. Es konnte gezeigt werden, daß aus einer separaten Untersuchung der sequenziellen Extrakte (*n*-Hexan, Aceton, Porenwasser) im wesentlichen keine zusätzlichen Erkenntnisse gewonnen werden können. Die Teilextrakte wiesen allerdings auch eine Toxizität (z.B. PW-Extrakt) auf, so daß für eine vollständige Erfassung aller Inhaltsstoffe auf die nachgeschalteten Sekundärextrakte (z.B. *n*-Hexan) nicht gänzlich verzichtet werden kann.

In den erhaltenen Chromatogrammen der Probenextraktfraktionen waren zum Teil noch erhebliche Überlagerungen/Koelutionen vorhanden, eine weitere Aufreinigung bzw. Auftrennung der Proben, z.B. eine Feinfraktionierung der polaren Fraktionen über die HPLC, kann möglicherweise die Nachweisempfindlichkeit der analytischen Methode verbessern. Gerade im Hinblick auf die ermittelten Effekte aus der polaren Fraktion 5 sollte auch die Nachweisempfindlichkeit der Analyse mit Hilfe des GC-MS erhöht werden. Es sollte möglich sein, die vorhandene Diskriminierung hochpolarer Inhaltsstoffe über Derivatisierungsverfahren für eine GC-MS-Analyse zu verbessern.

In der hier vorliegenden Arbeit wäre durch Untersuchungen zur Toxizität identifizierter Probeninhaltsstoffe der zeitlichen Rahme zu sehr überschritten worden, dies wäre jedoch im Rahmen eines integrativen Verfahrens zur Einschätzung und Bewertung sedimentgebundener Stoffe notwendig. Konzentrationen der Schadstoffe in Umweltproben unterschieden sich zum Teil erheblich, je nach Schadstoffklasse. In jedem Fall sind Kombinationseffekte, wie z.B. additive und synergistische Effekte zu prüfen. Ferner existieren heute eine Reihe an Möglichkeiten, über Datenbanken (ECDIN, DIMDI) bereits vorhandene Datensätze zur Toxizität einzelner Substanzen zusammenzustellen. Über ein solches Verfahren können möglicherweise sinnvolle Ergänzungen gefunden bzw. eine Vorauswahl getroffen werden.

4 Untersuchungen von Moschusduftstoffen

4.1 Untersuchungen zur abiotischen und biotischen Transformation von polycyclischen Moschusverbindungen –Ergebnisse einer Prozeßstudie im „Klärteich Neumünster“-

Der „Klärteich Neumünster“ ist eine ehemalige Kiesgrube, die während des Baues der BAB 7 entstanden ist. Seit 1980 wird der Teich, mit einer Größe von 12,8 Hektar und einer maximalen Tiefe von 4 m, als eine Art Vorfluter für die Abwässer des Klärwerks Neumünster genutzt. Er verfügt über einen hohen Fischbestand, wobei der Abfluß über ein sehr engmaschiges Gitter versperrt ist, so daß ihn nur sehr kleine Fische verlassen oder in ihn hinein gelangen können. Für die im Teich gefangenen Fische wird daher in bezug auf die untersuchten Stoffe die Einstellung eines Verteilungsgleichgewichtes zwischen Wasser und Fischfett angenommen. Da Moschusduftstoffe in Reinigungs- und Körperpflegemitteln aller Art Anwendung finden, gelangen sie über die Klärwerke in die aquatische Umwelt, wobei die höchsten Konzentrationen in Klärwerksabflüssen gefunden werden.

Durch diese Gegebenheiten bot sich der Teich für eine Prozeßstudie zum Umwelt-, Anreicherungs- und Transformationsverhalten der Moschusverbindungen an. Das gesamte Projekt wurde 1997 in einer Kooperation mit dem Institut für Hydrobiologie und Fischereiwissenschaft der Universität Hamburg sowie des Landesuntersuchungsamtes in Neumünster (Schleswig-Holstein) durchgeführt. Die ersten Ergebnisse der Studie bezüglich der Nitromoschusverbindungen (MX, MK und MX-Amine, MK-Amin) sowie der polycyclischen Moschusverbindungen (HHCB, AHTN, ATII, ADBI) sind detailliert in der Arbeit von R. Gatermann beschrieben^[49] und sollen hier nicht erneut diskutiert werden.

Nach Fertigstellung der zitierten Arbeit gelang es einerseits die Stereoisomere der polycyclischen Duftstoffe gaschromatographisch zu trennen und andererseits wurde die Struktur eines wesentlichen Transformationsproduktes des HHCB, das HHCB-Lacton, aufgeklärt. Der reichhaltige Proben- und Datenpool der Klärteichstudie konnte dadurch im Hinblick auf die Transformations- bzw. Metabolisierungsprozesse der Polycyclen entscheidend erweitert und neu interpretiert werden. Um das Verständnis für die erhaltenen neuen Ergebnisse zu erleichtern, müssen im Einzelfall bereits veröffentlichte Datensätze hier erneut dargestellt werden.

Nachdem die Duftstoffe Galaxolid[®] und Tonalid[®], zum Teil auch Phantolid[®] (ADBI) und Traseolid[®] (ATII) in allen Kompartimenten des aquatischen Ökosystems nachgewiesen worden waren, stellte sich die Frage nach potentiellen Metaboliten bzw. Transformationsprodukten, denn diese blieben bislang unberücksichtigt. In einer niederländischen Studie von 1997 zur Risikoeinschätzung für HHCB und AHTN wurde erstmals die Entstehung „höher polarer Verbindungen“ bei Abbaubersuchen mit radioaktiv markiertem HHCB erwähnt.^[25] Nachdem die Struktur des „HHCB-Lactons“ eindeutig zugeordnet war^[172,173,174], wurden die gesamten Proben der Klärteich-Studie auf Vorkommen und Anreicherungsverhalten dieses HHCB-Metaboliten untersucht. Das „HHCB-Lacton“ wurde im Institut

für organische Chemie der Universität Hamburg von C. Meyer synthetisiert und für die hier präsentierten Untersuchungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Diskussion der hier präsentierten Ergebnisse schließt ergänzend an das Kapitel 2.4.1.2, Seite 87 an, in dem Vorkommen und Konzentrationen der PCM im Sediment bereits näher erörtert wurden. Tabelle 45 gibt einen Überblick über die Rahmen des Klärteich-Experimentes analysierten Proben.

Tabelle 45 : Übersicht über die im Klärteich-Experiment insgesamt entnommenen Proben

Probenart	Klärteich	Klärwerk
Wasser	⇒ Zwei 10 L-Zulaufproben	⇒ Zwei 10 L-Stichproben
	⇒ Zwei 10 L-Ablaufproben	⇒ Eine 3 L-Mischprobe
Sediment / Klärschlamm	⇒ 2 Parallelproben (nähe SPMD Exposition)	⇒ Eine Stichprobe
SPMDs (2 Probenahmen)	⇒ 6 Stück (24.06.97)	
	⇒ 6 Stück (29.07.97)	
Biotaprobren		
(Pr.Nr.) 1137-1/97	Muscheln (aus dem unbelasteten Gartower See eingebracht)	
1092-1-97	Rotfeder	
1093-1-97	Rotfeder	
1094-1-97	Rotfeder	
1095-1-97	Schleie	
1096-1-97	Schleie	
1097-1-97	Schleie	
1098-1-97	Schleie	
1099-1-97	Karausche	
1100-1-97	Karausche	
1101-1-97	Karausche	
1102-1-97	Karausche	
1103-1-97	Karausche	
1104-1-97	Karausche	
1105-1-97	Karausche	
1107-1-97	Aal	
1108-1-97	Aal	
1096-2-97	Leber, Schleie	
1105-2-97	Leber Karausche	

4.1.1 Ergebnisse der Sediment- und Klärschlamm-Untersuchungen

Wie bereits im Kapitel 2.2.3.3 diskutiert, sollte die in dieser Arbeit entwickelte Analysenmethode für verschiedene Matrices Anwendung finden. Die Vielseitigkeit der Methode konnte durch die Analyse der synthetischen Moschusduftstoffe eindrucksvoll belegt werden. Durch die Einbeziehung von Klärschlammproben wurde zusätzlich die Anwendbarkeit auf hochbelastete Proben überprüft.

Die Moschusduftstoffe zeichnen sich insgesamt durch eine hohe Lipophilie und damit auch geringe Wasserlöslichkeit aus. Dies läßt eine starke Tendenz zur Adsorption an organischen Materialien sowie ein hohes Bioakkumulationspotential erwarten.

Durch die Einbeziehung von Sediment- und Klärschlammuntersuchungen sollte die Bedeutung der Adsorption an Schwebstoffe für die Moschusduftstoffe abgeschätzt werden. Des weiteren sollten zusätzliche Informationen über die Entstehung der Transformationsprodukte der Nitromoschusverbindungen bzw. das Schicksal von MX und MK im Klärwerk gewonnen werden. Als Ergänzung zu den Daten aus Wasser-, Biota- und SPMD-Proben sollte u.a. die Berechnung von Verteilungskoeffizienten (K_d , BCF) ermöglicht werden.

Tabelle 46 faßt die Ergebnisse der Sediment- und Klärschlammuntersuchung zusammen. In den Sedimentproben fallen insbesondere die im Vergleich zur Mutterverbindung hohen Konzentrationen für das MX-4-Amin auf. Dies könnte auf eine stärkere Adsorption an Schwebstoffen, wie sie für eine Reihe von aromatischen Aminen beobachtet wird, oder auf die Bildung im Sediment zurückzuführen sein. In der untersuchten Klärschlammprobe lagen die Konzentrationen der Metabolite sowie der Mutterverbindungen jedoch aufgrund des sehr hohen Untergrunds alle unterhalb der BG, wodurch keine Schlüsse auf eine höhere Adsorptionstendenz gezogen werden können. Für die Entstehung der Amine aus den Nitroverbindungen ist allerdings, nicht zuletzt aus der Altlastenproblematik ehemaliger Sprengstofffabriken bekannt, daß im Boden eine Reduktion der Nitrogruppe zur Aminofunktion stattfindet, wobei die entstehenden Aminoderivate zum Teil in höheren Konzentrationen im Boden und im Sickerwasser zu finden waren als die Muttersubstanzen selbst.^[175]

Ein Vergleich der ermittelten Konzentrationen mit Literaturdaten ist nicht möglich, da bisher keine weiteren Sedimentmessungen als die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen veröffentlicht wurden.^[176,34] In einer kürzlich publizierten Arbeit von Herren et al. wird das Vorkommen der Nitromoschusverbindungen und Metabolite im Klärschlamm beschrieben. Hierbei wurden für MX und MK Gehalte zwischen der Bestimmungsgrenze [$<0,1 \mu\text{g/kg}$] und maximal $32,5 \mu\text{g/kg}$ (TG) ermittelt.^[177] Die Aminometaboliten traten auch hier zum Teil in höheren Konzentrationen als die Mutterverbindungen auf. Für 4-Amino-MX und 2-Amino-MK wurden maximale Konzentrationen von $49,1$ und $15,6 \mu\text{g/kg}$ TG analysiert. Die Autoren erreichten in ihrer Studie mit $0,1 \mu\text{g/kg}$ deutlich niedrigere Nachweisgrenzen. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit präsentierten Werten wurden alle Konzentrationen auf die Trockenmasse bezogen.

Auch die Daten der oben zitierten Studie liefern weitere Anhaltspunkte bezüglich der Annahmen über das Schicksal der Nitromoschusverbindungen im Klärwerk:

- ⇒ Ihre Konzentrationen nehmen im Klärwerksablauf im Vergleich zum Zulauf deutlich ab.
- ⇒ Neben einer Transformation zu den Aminometaboliten spielt eine Adsorption am Klärschlamm sowohl der Mutter- als auch der Aminoverbindungen für die Bestimmung von Massenbilanzen eine bedeutende Rolle.

Der Nachweis der Aminotransformationsprodukte in Wasser- und Fischproben ließ insgesamt die Fragestellung nach ihrer Öko- und Humantoxizität und damit möglicher Gefährdungspotentiale

aufkommen.^[17,19] Dementsprechend wird die Problematik innerhalb dieser Arbeit aufgegriffen und ausführlich im Kapitel 4.4 behandelt.

Tabelle 46: Konzentrationen der Moschusverbindungen in einer Klärschlamm- sowie zwei Sedimentproben in [$\mu\text{g}/\text{kg}$] FG

Substanz	Klärschlamm	Sediment 1	Sediment 2
MX	< 10	0,5	0,8
MK	<10	6,3	3,6
MX-4-Amin	<10	6,3	1,3
MX-2-Amin	n.n.	n.n.	n.n.
MK-2-Amin	n.n.	n.n.	n.n.
HHCB	4.800	75	160
HHCB-ON	55	2,3	4,9
AHTN	2000	75	140

Die in der Klärschlammprobe analysierten HHCB- und AHTN-Konzentrationen waren mit 4,8 und 2 mg/kg FG insgesamt sehr hoch und entsprechen der hohen Tendenz der polycyclischen Aromaten zur Adsorption an organischen Materialien. Vergleicht man auch diese Ergebnisse mit den von Herren et al. ermittelten Klärschlammgehalten für HHCB und AHTN^[177], zeigt sich auch für die PCM eine gute Übereinstimmung der Daten. Für HHCB ermittelten die Autoren im Durchschnitt 3940 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (TG), während AHTN in etwas geringerer Konzentration mit 1540 mg/kg (TG) im Mittel angegeben wird. Insgesamt ist festzuhalten, daß die Adsorption an den Klärschlamm für die Massenbilanz dieser Verbindung im Klärwerk eine wichtige Rolle spielt.

Eine Studie von Simonic et al. berichtet über das Schicksal verschiedener Duftstoffe im Klärwerksprozeß.^[178] Die erste Aufreinigung der Abwässer entfernt Galaxolid[®] zu 40 %, und insgesamt werden nach einer zweiten Aufbereitung über Adsorption an aktivierten Klärschlamm 91,5 % eliminiert. Für Tonalid[®] wurden in derselben Studie mit 34 % und 89 % (Stufe II) insgesamt etwas geringere Raten erhalten. Im Vergleich zu 14 weiteren Duftstoffen der Untersuchung waren die endgültigen Gehalte an HHCB und AHTN mit 1,6 $\mu\text{g}/\text{L}$ allerdings auch die höchsten im bereits gereinigten Klärwerksabfluß. Die gemessene Konzentration am Ausgang des Klärteiches liegt mit 1,7 $\mu\text{g}/\text{L}$ in etwa in der gleichen Größenordnung wie die von Simonic et al. beschriebenen Restgehalte nach Abwasseraufreinigung.

Erstmalig wurde auch eines der Transformationsprodukte des HHCB im Klärschlamm analysiert. Mit 55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ fand sich für das HHCB-Lacton eine deutlich niedrigere Konzentration als für die Mutterverbindung. Die Ergebnisse für das Lacton werden im anschließenden Abschnitt 4.1.2 noch eingehend diskutiert.

Die im Klärteich vorgefundenen Sedimentkonzentrationen erscheinen mit 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ FG für HHCB und 140 $\mu\text{g}/\text{kg}$ FG für AHTN im Vergleich zu den hohen Gehalten der Verbindungen im Wasser-(Klärteich-Abfluß) und in den SPMD (Tabelle 47) als sehr gering. Berücksichtigt man die für

Galaxolid® und Tonalid® mit 5,9 und 5,7 relativ hohen log K_{OW}, wären generell höhere Konzentrationen zu erwarten gewesen. Die niedrigen Werte können jedoch durch den ebenfalls sehr geringen Gehalt an organischem Material in den Sedimentproben erklärt werden. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei diesem Teich um eine ehemalige Kiesgrube, daher war es relativ schwierig eine homogene feinkörnige Probe zu erhalten. Lediglich wenige mm der Oberfläche waren mit organischem Material bedeckt, was nicht zuletzt auch mit der hohen Strömung zusammenhängen kann, die am Abfluß des Klärteichs vorherrschte.

Im Kapitel 2.4.1.2 wurden für die polycyclischen Moschusverbindungen bisher veröffentlichte Sedimentkonzentrationen mit denen der Nordseeproben verglichen. Der Vergleich gemessener Konzentrationen im Klärteich Neumünster mit den Maximalwerten, die für die Nordseeprobe 1 erhalten wurden, zeigte eine 11fache HHCB- bzw. 14fache AHTN-Belastung auf. Allerdings liegen die Konzentrationen noch unterhalb der Gehalte, die im Mittel für Schwebstoffe der Elbe und des Rheins bestimmt wurden (Mittelwerte Elbe: HHCB 440, AHTN 468; Rhein HHCB 80, AHTN 270 in µg/kg TG).^[121,122]

Tabelle 47: Konzentrationen der Moschusverbindungen im Klärteichwasser und in SPMD^[179]

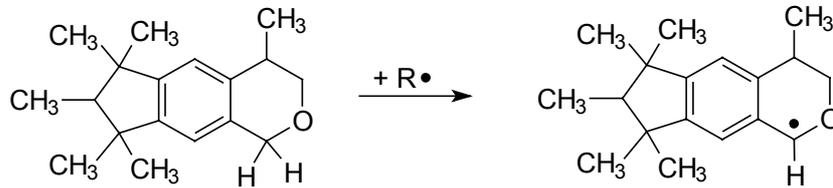
Verbindung	Wasser (Klärteich-Abfluß)	SPMD [ng/g Triolein] Serie 1	SPMD [ng/g Triolein] Serie 2
MX	0,5	80 ± 10	90 ± 30
MK	22	640 ± 150	530 ± 140
4-Amino-MX	10	40 ± 6	60 ± 20
HHCB	1.700	166.000 ± 38.000	192.000 ± 88.000
HHCB-ON	220	8000 ± 104	
AHTN	640	27.000 ± 9000	35.000 ± 14.000

4.1.2 Bildung und Konzentrationsverteilung des „HHCB-Lactons“

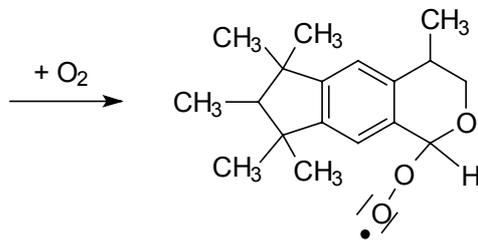
Das Lacton als Transformationsprodukt des Galaxolids® entsteht im aquatischen System durch abiotische Oxidation des HHCB.^[173] Ob es ebenso durch Biotransformation in Organismen gebildet wird, ist noch nicht endgültig geklärt. Abbildung 57 zeigt den Mechanismus der hierfür angenommen wurde.^[180] In erster Stufe wird durch Abspaltung eines Wasserstoffradikals ein Galaxolid-Radikal gebildet (radikalische Initiatoren bilden sich möglicherweise durch UV-Licht in organischer oder auch anorganischer Matrix, z.B. unter Beteiligung von Huminsäuren). Die Bildung des Radikals wird durch vorhandenen Sauerstoff und Lichteinfall beschleunigt. Im nächsten Schritt wird durch Addition von molekularem Sauerstoff ein Peroxoradikal gebildet, aus dem anschließend durch Abstraktion eines Wasserstoffradikals das Hydroperoxid entsteht. Dieses Hydroperoxid wird wiederum leicht protoniert (bevorzugt in leicht sauren Medien), so daß eine Wasserabspaltung folgt. Schließlich wird das System durch die Abspaltung des verbliebenen Protons stabilisiert, und es resultiert das HHCB-Lacton. Aus sterischen Gründen scheint ausschließlich das 1-Lacton zu entstehen. Der cyclische Ether ist zunächst relativ stabil (Potentialmulde), jedoch ebenfalls oxidationsempfindlich, so daß als

Folgeprodukt das 1,3-Dilacton bzw. Anhydrid entstehen könnte. Die dabei primär angegriffenen Positionen sind in Abbildung 58 markiert.

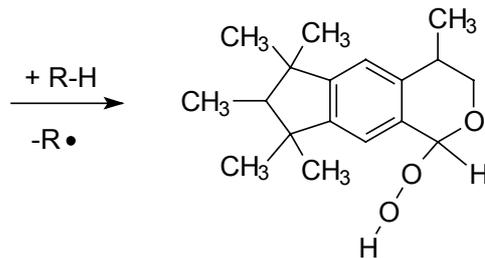
1. Galaxolid Radikalbildung:



2. Addition von molekularem Sauerstoff:



3. Bildung des Hydroperoxids:



4. Protonierung und Abspaltung eines Wassermoleküls

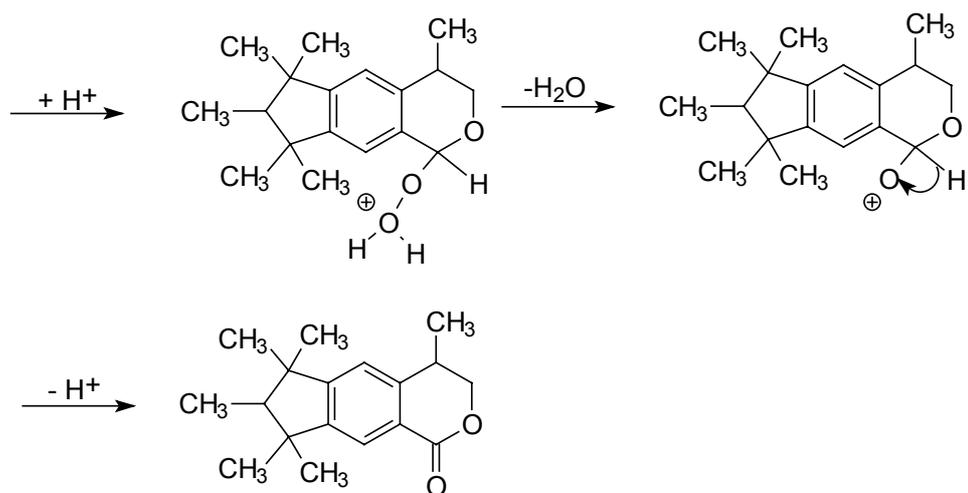


Abbildung 57: Angenommener Reaktionsmechanismus für die Bildung des HHCB-Lactons

Itrich und Langworthy et al. beschreiben die Entstehung weiterer polarer Metabolite als Ergebnis einer Versuchsreihe zur Transformation von markiertem HHCB im Belebtschlamm. Der Nachweis

erfolgt über einen Vergleich mit externen Standards in der Dünnschichtchromatographie (Rad-TLC), wobei die Transformationsprodukte mit dem Lacton und der β -Hydroxysäure ($\log K_{OW} = 0,5$) koeluierten. In den untersuchten Klärschlammproben wurde von den Autoren eine sofortige Biotransformation des HHCB beobachtet. Zeitlich versetzt traten schließlich noch weitere, stärker polare, Transformationsprodukte auf, die nach RP-HPLC-Abschätzung im $\log K_{OW}$ -Bereich zwischen 0,1-3,1 liegen. Bedingt durch die sehr geringen $\log K_{OW}$ -Werte, wurde eine weitere Oxidation der Hydroxysäure angenommen.

Chemisch betrachtet, sollte allerdings das Gleichgewicht eher auf der Seite des Lactons liegen, da dieses wesentlich stabiler ist. Unter leicht sauren Bedingungen würden sich aus der Hydroxysäure intramolekular wieder Ester (Lactone) bilden.

Die Autoren berechneten eine HHCB-Halbwertszeit in Flußwasser von ca. 35 Stunden und im aktivierten Klärschlamm von lediglich 21 Stunden.

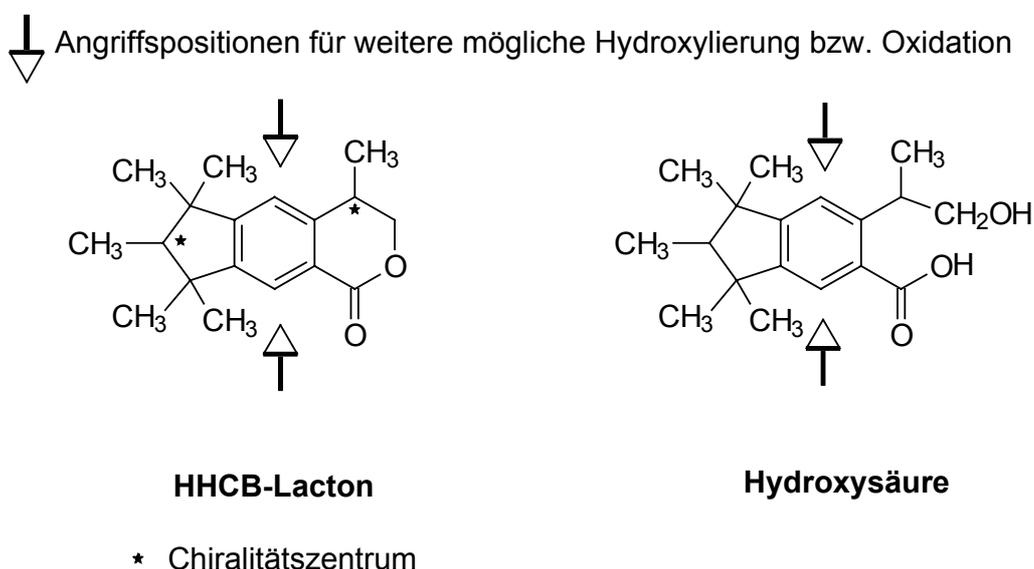


Abbildung 58 : Mögliche Folgeprodukte des HHCB-Lactons als Ergebnis eines weiteren Oxidationsschrittes

4.1.2.1 Klärschlamm-, Sediment- und Wasserproben

Die „relative Instabilität“ des Galaxolids[®] bedingt, daß das HHCB-Lacton neben der Mutterverbindung, ebenso ubiquitär in Umweltproben vorzufinden ist. Vor allem in Oberflächengewässern, aber auch in Sedimentproben ist es in Abhängigkeit von der Galaxolidkonzentration nachweisbar. Im Abschnitt 2.4.1.2 wurde bereits das Vorkommen auch in Sedimenten der Nordsee dargestellt.

In der Arbeit von Itrich et al. wird für das HHCB-Lacton ein $\log K_{OW}$ von 4,0 angegeben. Die im folgenden dargestellten Kalkulationen zur Bioakkumulation basieren auf diesem Wert. In Tabelle 48 werden die ermittelten Konzentrationen für das „HHCB-Lacton“ im Vergleich zur Mutterverbindung in Klärschlamm-, Sediment- und Wasserproben dargestellt.

Tabelle 48 : Konzentration des HHCB-Lactons in Sediment-, Klärschlamm- und Wasserproben im Vergleich zu den Gehalten von HHCB

Kompartiment	HHCB-Lacton (MW)	HHCB (MW)	Verhältnis HHCB / Lacton
Klärschlamm [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	55	4800	90
Sediment (Pr.1, 2) [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	$3,6 \pm 1,8$	118 ± 60	33
Wasser (Abfluß-Klärteich [ng/L])	220 ± 25	1700	8

Die Untersuchung des Klärschlammes ergab im Vergleich zur Mutterverbindung mit $55 \mu\text{g}/\text{kg}$ TG eine sehr geringe Lacton-Konzentration (s.a. Tabelle 48). Für das Verhältnis Galaxolid[®] zu Lacton ergibt sich ein Faktor von 90, während die ermittelten Gehalte im Wasser am Abfluß des Klärteiches (gleiche Probenahmestelle) mit $220 \text{ ng}/\text{L}$ zu $1700 \text{ ng}/\text{g}$ nur noch um den Faktor 8 differieren. Zum einen läßt sich dies durch eine höhere Polarität des Metaboliten erklären, wodurch die Adsorption am Klärschlamm nicht mehr so stark ausgeprägt ist. Zum anderen scheint es zu keiner zusätzlichen Transformation im Klärschlamm zu kommen. Auch im Sediment ist der Konzentrationsunterschied mit einem Faktor von 33 für das Verhältnis zwischen Galaxolid[®] und Lacton bereits wesentlich geringer.

4.1.2.2 SPMD- und Biotaprobieren

Vergleicht man die Galaxolid[®]- und Lactonkonzentrationen in den Fischproben (dargestellt in Tabelle 49 und Abbildung 59), zeigt sich ein wesentlich geringerer Konzentrationsunterschied als für Klärschlamm, Sediment und Wasser. Die Untersuchung der Fischproben ergab für die polycyclischen Moschusverbindungen bei einer Normierung der Konzentration auf den Fettgehalt eine extreme Speziesabhängigkeit. Besonders auffällig waren die deutlichen Unterschiede für Galaxolid[®]. Die höchsten Gehalte wurden mit $165 \mu\text{g}/\text{g}$ Fett für die Schleie bzw. in der Muschelprobe ($120 \mu\text{g}/\text{g}$ Fett) ermittelt, während die Rotfedern mit lediglich $6\text{-}8 \mu\text{g}/\text{g}$ Fett am geringsten belastet waren. Ebenso zeigten die normierten Bioakkumulationsfaktoren eine hohe Übereinstimmung innerhalb einer Fischart auf. Zur besseren Veranschaulichung wurden daher in der vorliegenden Arbeit die Konzentrationen auf den Fettgehalt normiert.

Da davon auszugehen war, daß im Klärteich für alle Fische der Gleichgewichtszustand erreicht ist und zudem die Datensätze innerhalb einer Spezies untereinander sehr gut vergleichbar sind, deuteten bereits diese Befunde darauf hin, daß signifikante artspezifische Unterschiede in der Metabolisierung der polycyclischen Moschusverbindungen auftreten. Die Galaxolidanreicherung in den Fischen ist im Vergleich zur reinen Verteilung (oder auch passiven Anreicherung) in den SPMDs wesentlich geringer, lediglich die Konzentrationen in Schleien und Muscheln erreichen die in den SPMD analysierten Konzentrationen, welche als Maximalwerte einer Anreicherung durch Einstellung eines Verteilungsgleichgewichtes aufzufassen sind.

Die Aufnahme lipophiler Substanzen führt normalerweise zu einer Induktion von mischfunktionellen Oxigenasen (MFO) was zu einer verstärkten Oxidation der Stoffe führt und in der Regel eine Ausscheidung von stärker polaren Metaboliten folgen läßt. Nicht alle Organismen sind in der Lage, auf eine erhöhte Anreicherung bestimmter Stoffe entsprechend zu reagieren, wodurch

verschiedene Metabolisierungen und auch unterschiedliche Schadstoffkonzentrationen in den Organismen zu erklären sind.^[181] Obwohl dementsprechend eine artspezifische Anreicherung, wie sie für Galaxolid[®], aber auch Tonalid[®] gezeigt wurde, zu erwarten ist, wurden sie bisher nur in wenigen Beispielen beschrieben.^[182] Die hier vorgefundene artspezifischen Anreicherungen unterscheidet diese Verbindungsklasse deutlich von anderen Stoffen, wie z.B. dem 1,2,4-Trichlorbenzol, für das bei Bezug auf den Lipidgehalt ein annähernd gleicher Bioakkumulationsfaktor in acht verschiedenen Fischarten gefunden wurde.^[183]

Tabelle 49 : Konzentrationen und BAF_{Lipid} von HHCb und HHCb-Lacton in den untersuchten Fischproben des Klärteichexperiments im Vergleich zu den aus SPMD ermittelten Werten.

Species	HHCb [µg/g] Lipid	Lacton [µg/g] Lipid	HHCb/Lacton- Verhältnis	HHCb BAF _{Lipid}	Lacton BAF _{Lipid}
Rotfeder (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	6,3	8,9	0,7	2300	40000
Rotfeder (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	7,1	8,2	0,9	2600	37000
Rotfeder (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	8,0	7,0	1,1	2800	32000
Schleie (<i>Tinca tinca</i>)	155	34	4,5	54000	154000
Schleie (<i>Tinca tinca</i>)	160	33	4,8	57000	151000
Schleie (<i>Tinca tinca</i>)	165	34	5,0	59000	152000
Schleie (<i>Tinca tinca</i>)	150	30	5,0	54000	132000
Karassche (<i>Carassius carassius</i>)	42	26	1,6	15000	116000
Karassche (<i>Carassius carassius</i>)	61	22	2,8	22000	100000
Karassche (<i>Carassius carassius</i>)	95	25	3,8	34000	114000
Karassche (<i>Carassius carassius</i>)	73	21	3,5	26000	93000
Karassche (<i>Carassius carassius</i>)	53	21	2,5	19000	96000
Karassche (<i>Carassius carassius</i>)	68	28	2,4	24000	127000
Karassche (<i>Carassius carassius</i>)	85	29	3,0	31000	130000
Aal (<i>Anguilla anguilla</i>)	4,8	4,0	1,2	1800	18000
Aal (<i>Anguilla anguilla</i>)	4,6	3,9	1,2	1700	18000
Muschel (<i>Dreissena polymorpha</i>)	120	33	3,7	44000	148000
Schlei-Leber	72	21	3,5	27000	95000
Karassche-Leber	69	18	3,9	26000	80000
Mittelwert SPMD (n= 12 und n = 9)	166 ± 38	8 ± 1,0	21	83.000	36.000

Durch Einbeziehung der Konzentration des HHCb-Lactons sollte ein besserer Einblick in die möglicherweise sehr unterschiedlichen Biotransformationsraten der untersuchten Fische erhalten werden.

Insgesamt wurden die höchsten Lacton-Belastungen in der Schleie (MW 32 µg/g Fett) und der Muschel (33 µg/g Fett) analysiert, die geringsten, ähnlich wie bereits für Galaxolid[®] festgestellt, in den Rotfeder- und Aalproben. Dies stützt die Annahme, daß diese beiden Spezies eine höhere metabolische Aktivität im Vergleich zu den anderen untersuchten Fischen aufweisen. In Tabelle 49 ist zusätzlich das Galaxolid[®]/Lacton-Verhältnis dargestellt, aus dem sich ableiten lassen sollte, inwieweit Unterschiede in der metabolischen Aktivität der einzelnen Arten vorhanden sind. Der größte Faktor wird für die Schleie erhalten, was für eine geringere Biotransformation von Galaxolid[®] sprechen könnte.

Gleichzeitig wurde für diese Fischart auch die höchste Galaxolidkonzentration gemessen, wodurch diese Annahme weiter gestützt wird.

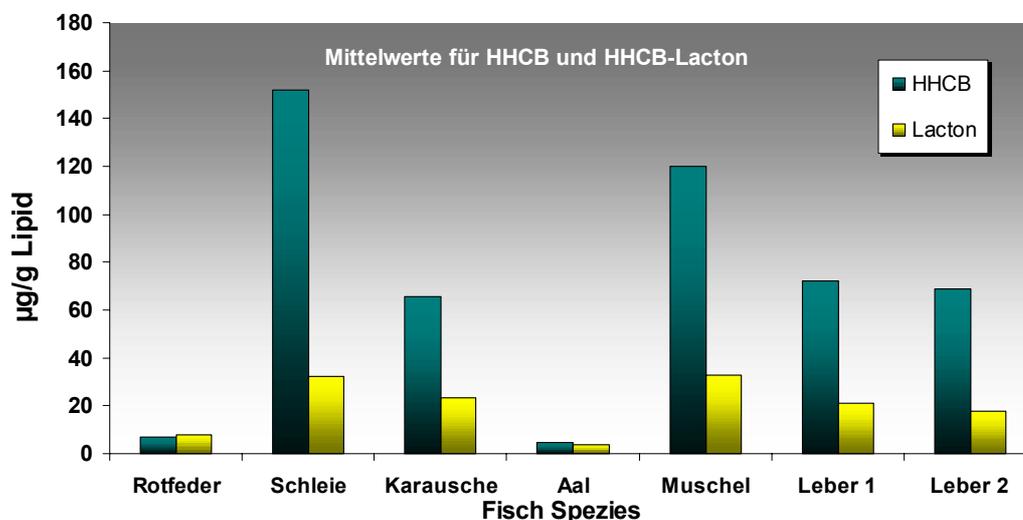


Abbildung 59: Gemittelte Konzentrationen von HHCb und HHCb-Lacton für die verschiedenen Fischspezies.

Im Vergleich zu den Lactonkonzentrationen in den SPMD (8 µg/g Lipid) finden sich in Aal- und Rotfederproben ähnliche Konzentrationen, während die Belastungen der anderen Spezies 3-4mal so hoch waren. Die insgesamt höheren Gehalte lassen sich über die hierfür angenommene Transformation von akkumuliertem Galaxolid® zum Lacton erklären. In den Aalproben hingegen sinkt die Lactonkonzentration unter die in SPMD gemessene. Zum Vergleich: In einer kanadischen Untersuchung mit PAH hochbelasteter Gebiete wurde gerade für den Aal eine besonders hohe metabolische Aktivität in Bezug auf die Umwandlung von Pyren zu 1-Hydroxypyren festgestellt.^[184] Die Ergebnisse dieser Studie legen ebenso für die Aale eine höhere metabolische Aktivität in Bezug auf HHCb und HHCb-Lacton nahe.

Aus den experimentell im Wasser- und in Fischen bestimmten Konzentrationen wurden sowohl für Galaxolid® als auch das Lacton Bioakkumulationsfaktoren (BAF) berechnet, die jeweils auf das Frischgewicht (BAF_{FG} , siehe Tabelle 50) und den Lipidgehalt (BAF_L , siehe Tabelle 49) bezogen wurden. In allen Fällen wurden für das Lacton deutlich höhere BAF als für Galaxolid® gefunden, obwohl der experimentell bestimmte $\log K_{OW}$ des Lactons mit 4,0 deutlich unter dem des Galaxolids liegt. Auch diese Gegenüberstellung (Tabelle 49) ist ein Beleg dafür, daß in den untersuchten Fischen eine stärkere Anreicherung des Lactons festzustellen war, als durch eine reine passive Biokonzentration zu erwarten wäre. Diese Annahme wird durch Abbildung 60 graphisch untermauert, in der die für die verschiedenen Spezies gemittelten BAF_L sowie die für die SPMD berechneten Wasser-SPMD-Verteilungskoeffizienten ($\log K_{W/SPMD}$) dargestellt werden. Analog zu den bestehenden Unterschieden der $\log K_{OW}$ -Werte zwischen Galaxolid® und Lacton findet man auch in den SPMD höhere Werte für das Galaxolid®, während sich dies für alle anderen analysierten Proben umdreht.

In verschiedenen mathematischen Ansätzen wurde der Versuch unternommen, Biokonzentrationsfaktoren aus substanzspezifischen Daten zu berechnen. In der Literatur werden unterschiedliche Gleichungen dazu vorgestellt, die eine Berechnung aus log K_{OW} -Werten ermöglichen. In einer neueren Untersuchung wurde u.a. versucht, die vorhandenen Ansätze zu erweitern, um Konzentrationsfaktoren für die verschiedenen Kompartimente der Organismen (Muskel, Blut, Organe) zu ermitteln. Neben dem log K_{OW} -Wert wird zusätzlich der Fettgehalt in die Berechnung mit einbezogen. Die in Tabelle 50 dargestellten Ergebnisse wurden entsprechend Gleichung 8 und 9 berechnet.

$$\log BCF_{Muskel} = 0,69 \times \log K_{OW} + 0,92 \times \log Lipid + 0,76 \quad (8)$$

$$\log BCF_{Leber} = 0,97 \times \log K_{OW} + 2,17 \times \log Lipid + 1,57 \quad (9)$$

R. Gatermann konnte über diesen Vergleich für Galaxolid® zeigen, daß die theoretisch berechneten Werte deutlich über den experimentell ermittelten Faktoren liegen.^[49]

Tabelle 50 Aus Modellgleichungen ermittelte BAF_{FG} im Vergleich zu den experimentell ermittelten Werten

Fisch-Spezies	Lipid [%]	Experiment Lacton	Berechnung Lacton	Faktor	Experiment HHCB	Berechnung HHCB	Faktor
Rotfeder	0,7	242	34	7	14	705	0,02
Rotfeder	0,9	408	43	9	29	889	0,03
Rotfeder	0,8	255	39	7	22	798	0,03
Schleie	0,8	1232	39	32	436	798	0,55
Schleie	1,4	1965	65	30	746	1335	0,56
Schleie	0,8	1219	39	31	471	798	0,59
Schleie	0,5	795	25	31	327	518	0,63
Karusche	1,1	1282	52	25	159	1069	0,15
Karusche	1,6	1704	74	23	371	1509	0,25
Karusche	2	2275	91	25	674	1853	0,36
Karusche	2,6	2429	115	21	684	2359	0,29
Karusche	2,5	2397	111	22	463	2276	0,20
Karusche	1,7	2161	78	28	416	1596	0,26
Karusche	4,3	4560	183	25	1089	3748	0,29
Aal	15,7	2833	603	5	279	12338	0,02
Aal	17,9	3168	680	5	308	13920	0,02
Muschel	1,4	2075	65	32	622	1335	0,47
Schlei, Leber	4,02	3776	264	14	1067	18373	0,06
Karusche, Leber 2	10,39	8329	2070	4	2658	144230	0,02

Betrachtet man nun ermittelte und theoretisch berechnete Bioakkumulation für das Lacton, liegen die analysierten Daten deutlich höher als die theoretischen und damit genau gegensätzlich zum Galaxolid®, bei dem experimentell kleinere Faktoren gefunden werden, als sich durch die Berechnung

ergibt. Die geringste Abweichung wird für Rotfeder und Aal erhalten, bei denen auch die geringste absolute Konzentration gefunden wurde, während die höchste Abweichung für die Schleie zu beobachten war, die auch die höchste Konzentration an Muttersubstanz und Metabolit enthielt.

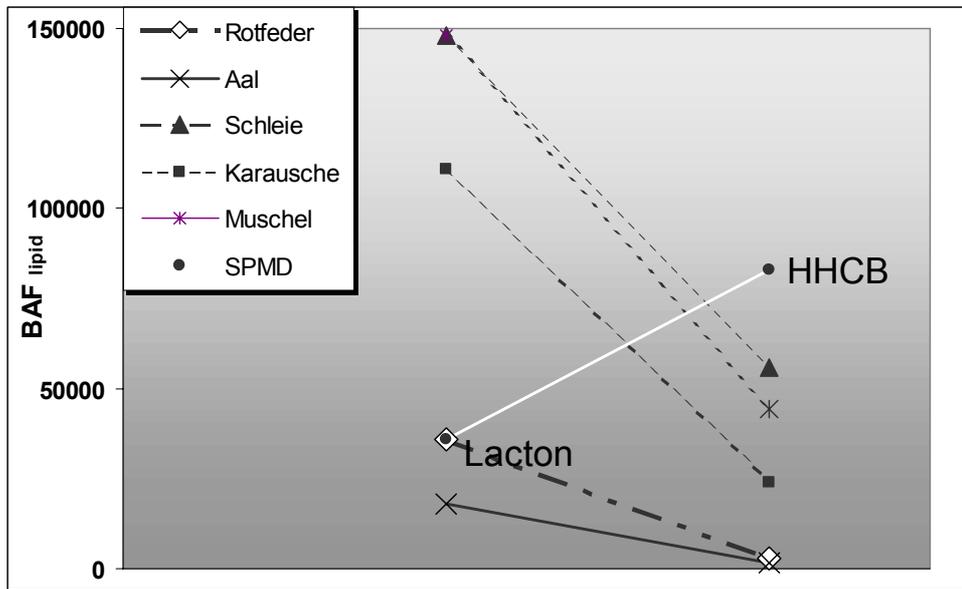


Abbildung 60: Auf den Fettgehalt normierte Bioakkumulationsfaktoren für HHCb (rechts) und HHCb-ON (links); (Mittelwerte für jede Spezies, zum Vergleich Mittelwert für SPMD)

Folgende Schlüsse können aus der Gesamtschau der Daten gezogen werden:

- (1) Eine Gegenüberstellung der niedrigeren Konzentrationen für HHCb und HHCb-ON gemessenen in Aal und Rotfeder mit den ermittelten Gehalten der weiteren untersuchten Spezies lassen für die erstgenannten Fische eine etwas stärkere Metabolisierung bezüglich der beiden Verbindungen vermuten. Ebenso wird diese Annahme dadurch bekräftigt, daß die Metabolitkonzentration im Aal im Vergleich zu den anderen Spezies als einzige noch unterhalb der durch passive Akkumulation erzielten Konzentration in SPMD liegt. Voraussetzung für diese Annahme ist jedoch, daß ein Gleichgewichtszustand erreicht war.
- (2) In Schleie, Karausche und Muschel fanden sich sowohl die höchsten Lacton-Konzentrationen als auch die größten Faktoren des HHCb/Lacton-Verhältnisses; d.h in den Spezies mit den höchsten Werten für die Muttersubstanzen lagen auch die höchsten Metabolitkonzentrationen vor.
- (3) Trotz der unterschiedlichen Galaxolidkonzentrationen in Schleie, Karausche und Muschel wird für das Lacton eine Angleichung auf ungefähr ein Level sichtbar (etwa 20-30 µg/g Fett).
- (4) Während für HHCb in der Muschel ein nahezu vergleichbarer Gehalt mit den SPMD gefunden wurde, ist die Lacton-Konzentration hier deutlich über der in SPMD. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß an dieser Stelle kein weiterer Abbau des Lactons erfolgt, dieses in der Muschel damit am stabilsten ist.

- (5) Im Gegensatz zu dem durch „passive Anreicherung“ erhaltenen Faktor in SPMD lagen die ermittelten Bioakkumulationsfaktoren für alle Fischarten über denen für Galaxolid®.

Zusammenfassend ergibt sich als mögliche Interpretation: Generell ist das Lacton in allen untersuchten Arten stabiler als die Mutterverbindung wobei in den Fällen, in denen Galaxolid® sich am stärksten anreichert, gleiches auch für den Metabolit beobachtet wird. Neben einer passiven Biokonzentration scheint es durch eine Biotransformation des Galaxolids® zum HHCB-Lacton zu einer zusätzlichen Anreicherung zu kommen.

Betrachtet man das Bioakkumulationsverhalten einer strukturell ähnlichen Substanzklasse, den polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, so wurden für diese Verbindungen für verschiedene aquatische Organismen sehr große Unterschiede in den Bioakkumulationsfaktoren festgestellt. Für die Transformation in Säugetieren, Vögeln, Fischen und Invertebraten spielen sowohl verschiedenartige Aufnahmepfade als auch unterschiedlich stark ausgeprägte MFO-Systeme eine wesentliche Rolle. Invertebraten verfügen im Vergleich zu terrestrischen Organismen über weniger gut ausgeprägte MFO-Systeme, wodurch erhebliche Differenzen in den Biotransformationsraten und Konzentrationen der PAH zwischen den Spezies auftreten.

Vor allem die Assimilation von PAH aus Porenwasser bzw. direkt aus der Wassersäule erscheint mit sinkendem $\log K_{OW}$ für diese Verbindungsklasse eine nicht unwesentliche Rolle zu spielen. Insgesamt ist eine Anreicherung über die Nahrungskette, wie sie für chlororganische Substanzen erfolgt, untergeordnet. Untersuchungen verschiedener aquatischer Organismen zeigten, daß zum einen die Belastung mit PAH mit steigender trophischer Stufe der Organismen sinkt, zum anderen insgesamt eine hohe Varianz zwischen den Spezies, in Abhängigkeit zu den verschiedenen Aufnahmepfaden, festzustellen ist. Zusätzlich werden die spezifischen Belastungen durch unterschiedliche metabolische Aktivitäten in jeder trophischen Stufe, vor allem für aquatische Organismen, noch verstärkt. Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle, daß gerade für Muscheln eine geringe Biotransformationsrate festgestellt wurde.^[185] Im Gegensatz zu den herkömmlichen PAH zeigen sich für die hier untersuchten polycyclischen Moschusduftstoffe bereits für verschiedene Fischarten Unterschiede in Anreicherung und Metabolisierung. Dies läßt den Schluß zu, daß diese Verbindungsklasse einer Metabolisierung nicht so leicht zugänglich ist wie die PAH (etwa gleicher Ringzahl), aber weit mehr als chlororganische KW wie etwa HCH oder PCB.

4.2 Stereoselektive Untersuchungen

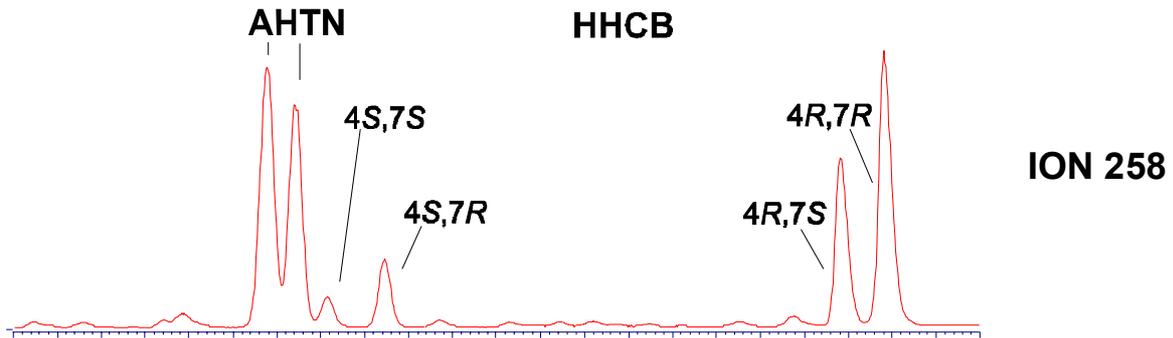
Die unterschiedlichen Konzentrationen der polycyclischen Moschusduftstoffe in den verschiedenen Fischarten ließ auf eine verschieden stark ausgeprägte Biotransformation in den einzelnen Arten schließen. Bei den polycyclischen Moschusverbindungen handelt es sich, wie bereits einleitend erwähnt, um chirale Komponenten mit ein bzw. zwei stereogenen Zentren. Daher erschien die chirale Gaschromatographie als ein aussichtsreiches Mittel, um durch die Untersuchung von stereospezifischen Prozessen weitere Anhaltspunkte über die vorliegenden Transformationsprozesse zu erhalten.

Enantioselektive Biotransformation oder auch Anreicherung wurde bereits für zahlreiche Schadstoffe in der Umwelt vorgefunden.^[186] Viele der bekannten Umweltschadstoffe besitzen ein oder mehrere asymmetrische Zentren und sind daher eine Mischung verschiedener Stereoisomere, welche zum Teil stark unterschiedliche biologische Eigenschaften und Funktionen besitzen. Typische Beispiele für stereoselektive Prozesse wurden in der Vergangenheit für chlororganische Schadstoffe wie α -HCH, Chlordane, Bromocyclen, Chloro-bis-propylether oder auch die atropisomeren Methylsulfonyl-PCB beobachtet.^[32,33,187,188,189]

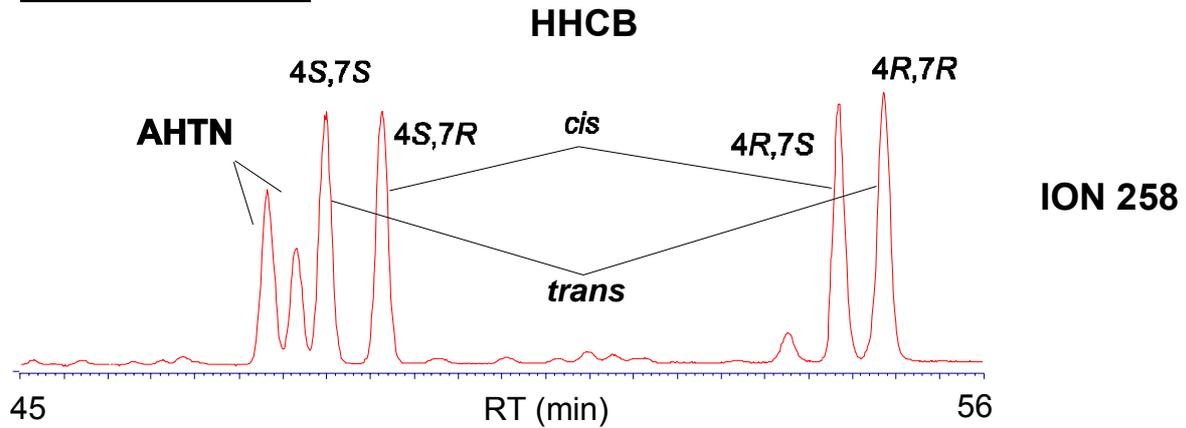
Im Fall des Galaxolids[®] befindet sich ein Chiralitätszentrum in C4- und ein weiteres in C7-Position. Daraus resultieren 2 Diastereomere (*trans*-HHCB und *cis*-HHCB), welche wiederum in je zwei enantiomeren Formen auftreten können (*trans*-HHCB: 4*S*,7*S* + 4*R*,7*R*; *cis*-HHCB: 4*S*,7*R* + 4*R*,7*S*). Insgesamt läßt sich das technische HHCB mit Hilfe der enantioselektiven Gaschromatographie in 4 Stereoisomere trennen. Die Elutionsfolge der aufgetrennten Signale für Galaxolid[®] konnte über den Vergleich mit den reinen Enantiomeren des HHCB zugeordnet werden (Abbildung 61). Die Elutionsfolge der Stereoisomere ist von der verwendeten chromatographischen Phase abhängig. Bei den hier vorgestellten Untersuchungen wurde eine modifizierte β -Cyclodextrinphase verwendet, mit der eine außerordentlich gute Trennung für die polycyclischen Moschusverbindungen in Umweltprobenextrakten insgesamt erhalten wurde.^[190] Für die Analyse des HHCB-Transformationsproduktes wurde die gleiche Säulenphase eingesetzt. Im folgenden Abschnitt wird eine Methode für die enantioselektive Trennung des HHCB-Lacton-Standards sowie für die Untersuchung der Proben des Klärteich-Experiments mit Hilfe der enantioselektiven GC/MS im „Selected-Ion-Modus“ (SIM) vorgestellt werden.

Es wurden in den untersuchten Biotaprogen signifikante, artspezifische Unterschiede der Enantiomerenverteilung der PCM analysiert. Hohe Abweichungen von den racemischen Enantiomeren-Verhältnisse waren vor allem für *trans*-HHCB, aber auch für *trans*-Traseolid in der Karausche vorhanden. Der Vergleich der Chromatogramme der Schleiprobe mit einer Karauschenprobe weist deutlich unterschiedliche Enantiomerenüberschüsse („Pattern“ s. Abbildung 61) zueinander auf, während die Analyse eines HHCB-Standards keine Verschiebung der Enantiomerenverhältnissen (ER ~1:1) bei einem sehr geringen Überschuß der *cis*-Isomere ergab. Für HHCB erscheinen die ermittelten Enantiomerenverhältnisse bzw. die enantioselektiven Chromatogramme als charakteristische Fingerabdrücke für die verschiedenen Fischarten. Im Fall des HHCB wurden auch in den analysierten Wasser- und SPMD-Proben keine ER-Verschiebungen festgestellt, diese entsprachen damit dem in Abbildung 61 unten dargestellten Chromatogramm einer Standardmischung.

Probe: Karausche



Probe : Schleie



Standard

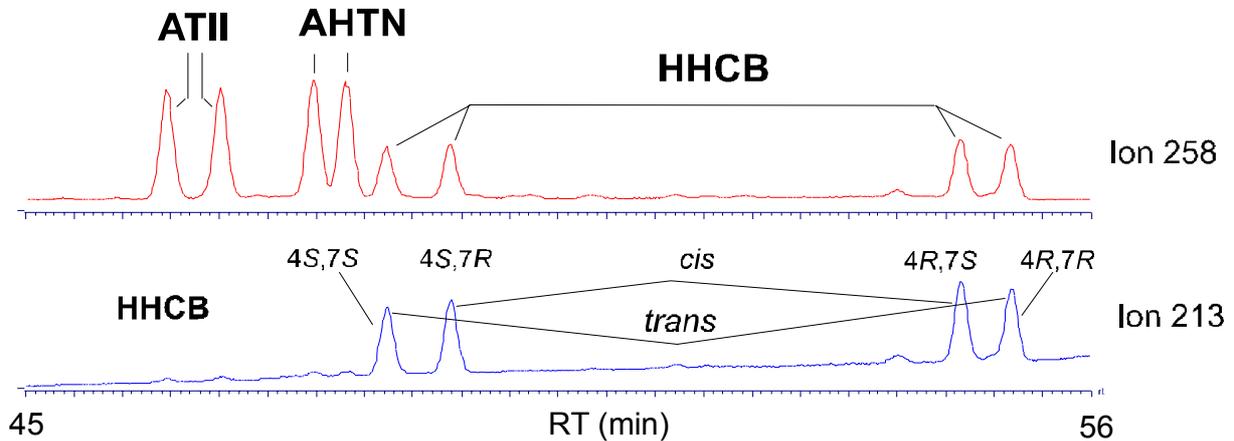


Abbildung 61: SIM-Chromatogramme für HHCB in der Karausche (oben), Schleie (Mitte) im Vergleich zum Standard (unten); [Cyclodextrinphase: OV 1701 / heptakis (6-O-*tert*butyldimethylsilyl-2,3-di-O-methyl)- β -cyclodextrin]

Die Verschiebung des Enantiomerenverhältnisses zeigt, daß jeweils eines der Enantiomere jedes Diastereomerenpaares in der Karausche verstärkt transformiert wird, während die ER in der Schleie unverändert zum Standard vorgefunden wurden. Um die Annahme zu überprüfen, daß sich die vorhandenen Konzentrationsunterschiede des HHCB zwischen Karausche und Schleie durch stereoselektive Biotransformation erklären lassen, wurde der Gehalt für HHCB in der Karausche unter

Berücksichtigung eines enantioselektiven Abbaus theoretisch zurückgerechnet. In Tabelle 51 werden aufgrund von Modellvorstellungen berechnete Konzentrationen für HHCB den experimentell ermittelten Gehalten für die Karausche und Schleie gegenübergestellt. Dabei wurde versuchsweise angenommen, daß jeweils nur ein Enantiomer eines Diastereomers abgebaut wird, wodurch das zweite Enantiomer maßgeblich 50 % des Ausgangs-Racemates repräsentiert. Im Falle des HHCB stellt die gemessene Konzentration die Summe beider Diastereomere (*cis*- und *trans*-HHCB) dar. Die stereochemischen Signalmuster, welche für die Karauschenprobe im Vergleich zur Standardlösung erhalten wurden, sind durch folgenden Unterschied für die *cis*- und *trans*-Isomeren gekennzeichnet: Für das *cis*-Isomer erscheint ein Abbau für beide Enantiomere zu erfolgen, während das zuletzt eluierende Enantiomer des *trans*-HHCB unverändert erscheint. Daher wurde hierfür entschieden, dieses Stereoisomer (*4R*, *7R*) als Basis für die Berechnungen zu verwenden. Der aus den theoretischen Kalkulationen resultierende Mittelwert von 121 µg/g Fett entspricht dem experimentell ermittelten Gehalt für den Muschelprobenextrakt und ist nur wenig geringer als das Konzentrationslevel, gemessen in der Schleie (MW = 158 µg/g Fett). Zusammengefaßt kann eine enantioselektive Biotransfoemation für HHCB als Begründung für die wesentlich geringeren Konzentrationen der Karausche im Vergleich zu den weiteren Spezies angesehen werden. Zudem wird eine höhere Stereoselektivität für *trans*-HHCB im Vergleich zum *cis*-Isomer hierfür vorgefunden.

Tabelle 51: Konzentrationen und Enantiomeren-Verhältnis für HHCB, gemessen in den unterschiedlichen Fischproben des Klärteichs Neumünster.

Spezies	Konzentration [µg/g Fett]	<i>trans</i> -HHCB ER	<i>cis</i> -HHCB ER	Konz. [µg/g Fett] HHCB <small>berechnet</small>
	HHCB <small>experimentell</small>			
Rotfeder	6,2	0,66	1,24	-
Rotfeder	7,1	0,55	1,10	-
Rotfeder	7,5	0,57	1,07	-
Schleie	150	1,06	0,98	-
Schleie	160	1,10	0,95	-
Schleie	160	0,88	1,00	-
Schleie	150	1,03	0,98	-
Karausche	40	0,12	0,44	75
Karausche	60	0,12	0,42	110
Karausche	90	0,19	0,54	155
Karausche	70	0,14	0,48	130
Karausche	50	0,10	0,41	105
Karausche	65	0,10	0,46	130
Karausche	85	0,13	0,51	145
Aal	4,8	0,98	1,27	-
Aal	4,6	0,79	1,15	-
Muschel	120	0,91	1,26	-
Schlei, Leber	72	1,01	0,85	70
Karausche, Leber	70	0,10	0,48	135

Die hier vorgefunde artspezifische Enantiomerenverteilung, die sich in den untersuchten Proben in der Art eines „fingerprints“ widerspiegelt, liefert einen weiteren Beleg für die spezieabhängigen Metabolisierungsprozesse. Festzuhalten bleibt, daß ein Enantiomerenverhältnis, welches bei ungefähr 1,0 (Racemat) liegt, ein geringes Metabolisierungspotential der Spezies für die polycyclische Verbindung impliziert. Vollständig ließen sich die stereospezifischen Anreicherungs- und Transformationsprozesse der chiralen Duftstoffe nur durch Versuche mit radioaktiv markierten Verbindungen klären. Zusätzliche Informationen über die vorliegenden Prozesse sind allerdings zu erhalten, wenn neben den Konzentrationen, auch die Enantiomerenverhältnisse für das ebenfalls chirale HHCB-Lacton in die Betrachtung einbezogen werden.

4.2.1 Darstellung und enantioselektive chromatographische Separation der Stereoisomere des HHCB-Lactons

Für die im folgenden beschriebenen stereoselektiven Analysen war es zunächst einmal notwendig, das HHCB-Lacton gaschromatographisch in die einzelnen Stereoisomere aufzutrennen. Eine Trennung sollte aufgrund der zwei vorhandenen Chiralitätszentren, ebenso wie bereits für Galaxolid® gezeigt, zu 4 aufgelösten Signalen führen. Ferner war es für die Beurteilung und den Vergleich der ER zwischen Galaxolid® und Metabolit erforderlich, die Elutionsfolge der Stereoisomere auf der verwendeten chiralen stationären Phase zuzuordnen. Daher wurde aus den zur Verfügung stehenden reinen Enantiomeren des HHCB durch eine UV-Licht-induzierte Reaktion das jeweils resultierende Lacton-Isomer hergestellt (siehe Kapitel 7).

Die gaschromatographische Trennung erfolgte, ebenso wie für die polycyclischen Moschusduftstoffe, über die Cyclodextrinphase Heptakis(6-*O*-*tert*butyldimethylsilyl-2,3-di-*O*-methyl)- β -cyclodextrin. Für das Lacton wurde, wie bereits für HHCB, AHTN, ATII und ADBI gezeigt, eine Separation der Enantiomere erreicht. Die Wechselwirkungen zwischen dem Lacton (späte Retention) und der Phase scheinen stärker ausgeprägt. Die Unterschiede zwischen den Stereoisomeren sind hingegen nicht so groß, wie sie für HHCB vorgefunden wurden. In der Abbildung 62 unten ist die Trennung der weiteren im Klärteichexperiment untersuchten Verbindungen für die Ionenspur 257 dargestellt. Selbst bei der extrem langen Retentionszeit des Lactons, ist eine nahezu vollständige Enantiomerentrennung (Basislinie) erzielt. Der Vergleich der SIM-Chromatogramme der reinen Enantiomere zeigte die gleiche Elutionsfolge, wie sie bereits für die Enantiomere des HHCB erhalten wurde. Damit entsprechen die Signale 1 und 4 in Abbildung 62 dem *trans*-HHCB-Lacton, und die Signale 2 und 3 werden für *cis*-HHCB-Lacton erhalten. Bei der Analyse der PCM ist eine Überprüfung der Signale und deren Responseverhältnisse der SIM-Messung unerlässlich, da aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit einzelne Verbindungen die gleichen Hauptfragmentationen aufweisen (z.B. 243, 258 für HHCB und AHTN). Eine Verwechslung kann daher nur über Vergleiche der Retentionszeit und Überprüfung der Responseverhältnisse der jeweiligen Fragmentationen zueinander mit externem Referenzmaterial ausgeschlossen werden.

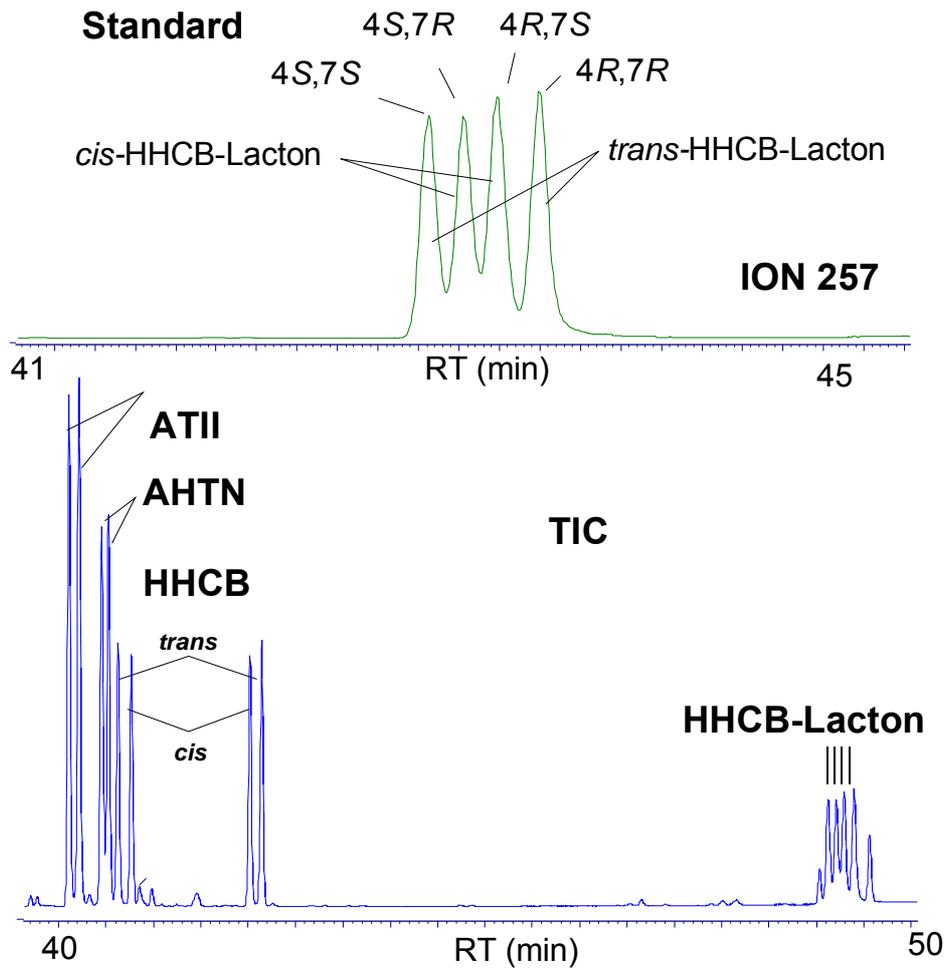


Abbildung 62: Separation der Enantiomere des HHCB-Lactons; oben: ermittelte Elutionsfolge des Standards, Ionenspur 257; unten: Darstellung der Trennung von Traseolid® (ATII), Tonalid® (AHTN), Galaxolid® (HHCB) und des Lactons auf der Cyclodextrinphase OV 1701/heptakis (6-O-*tert*butyldimethylsilyl-2,3-di-O-methyl)- β -cyclodextrin, TIC

4.2.2 Enantioselektive gaschromatographische Analyse der Biota- und SPMD-Proben

Die folgenden Abbildungen 62 und 63 zeigen die Enantiomere des Lactons in den untersuchten Fischproben-Extrakten. In der Karausche ergaben sich, im Vergleich zum HHCB, wesentlich geringere Unterschiede in den ER. In Analogie zu der Anreicherung der PCM konnte auch für das aus dem Wasser angereicherte Lacton in den SPMD-Proben keine signifikante Verschiebung der ER festgestellt werden (Abbildung 65), es liegt annähernd das racemische Verhältnis vor.

Probe : Karausche

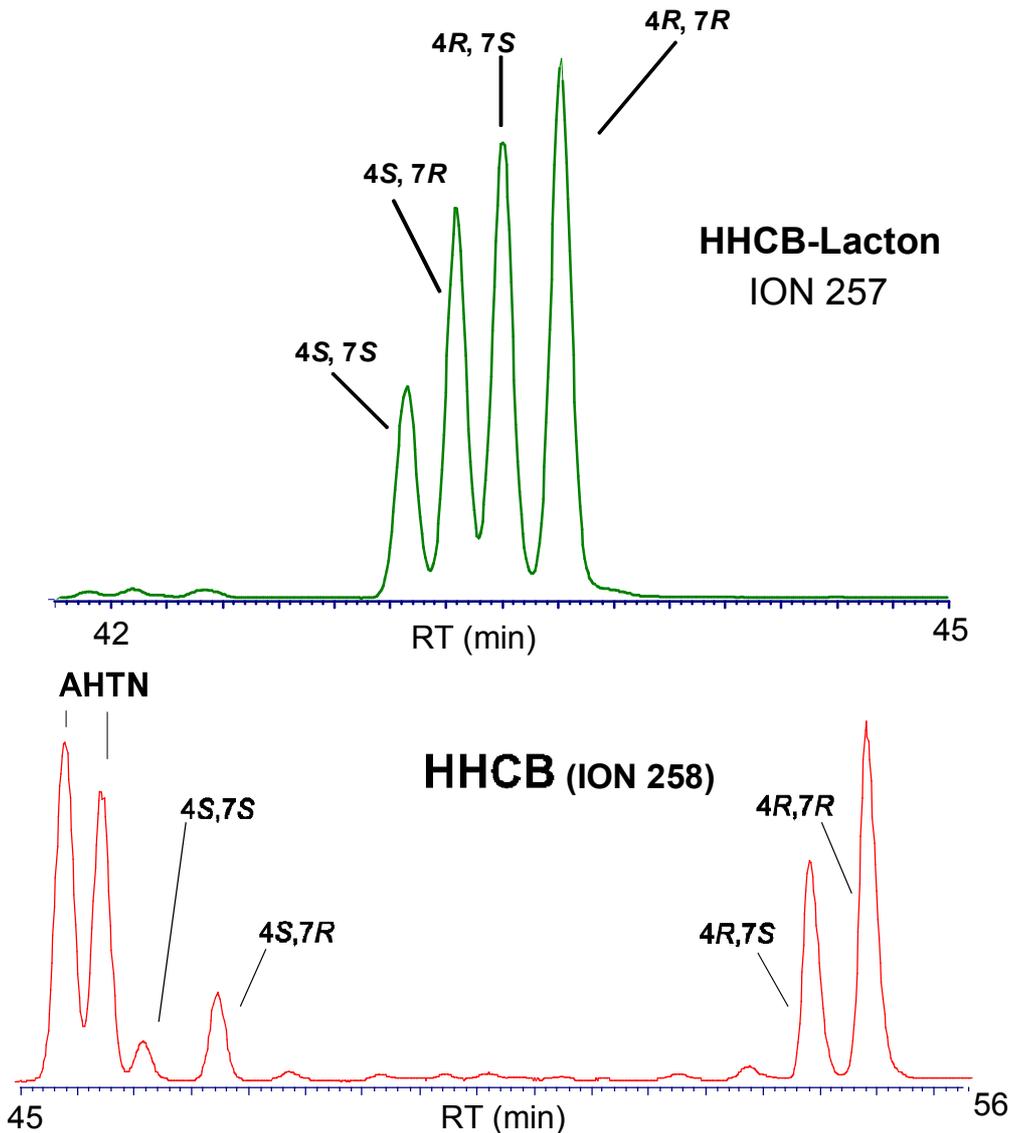


Abbildung 63: Vergleich der SIM-Chromatogramme der enantioselektiven Analyse von Karauschenproben-Extrakten auf das HHCB-Lacton (Ionenspur 257) und HHCB (258)

Allerdings können auch für das Lacton Unterschiede zwischen den einzelnen Fischarten beobachtet werden. Die Schleie zeigt wiederum die geringsten Verschiebungen in den Enantiomerenverhältnissen, während in der Karausche, aber auch im Aal deutliche Differenzen

vorhanden sind. Betrachtet man die Ergebnisse im Zusammenhang mit der für HHCB festgestellten Stereoselektivität speziell in der Karausche, hätte man erwarten können, daß die entsprechenden Lacton-Gehalte der stärker abgebauten HHCB-Enantiomere deutlich höher konzentriert sind. Dies kann jedoch in dieser Form nicht direkt beobachtet werden. Die Ergebnisse deuten vielmehr daraufhin, daß generell der Abbau jeweils eines Enantiomes der Diastereomerenpaare bevorzugt ist, und zwar im Fall der Karausche sind dies die 4S-Isomere sowohl des Galaxolids® als auch des HHCB-Lactons. Das bedeutet, daß das bevorzugt gebildete Lacton-Enantiomer auch bevorzugt metabolisiert wird. Interessanterweise berichten Frater et al.^[30], daß die sehr speziellen moschusartigen Geruchseigenschaften lediglich von den 4S-Enantiomeren ausgehen, die 4R-Enantiomere hingegen haben einen sehr viel schwächeren Duft.

IONENSPUR 257

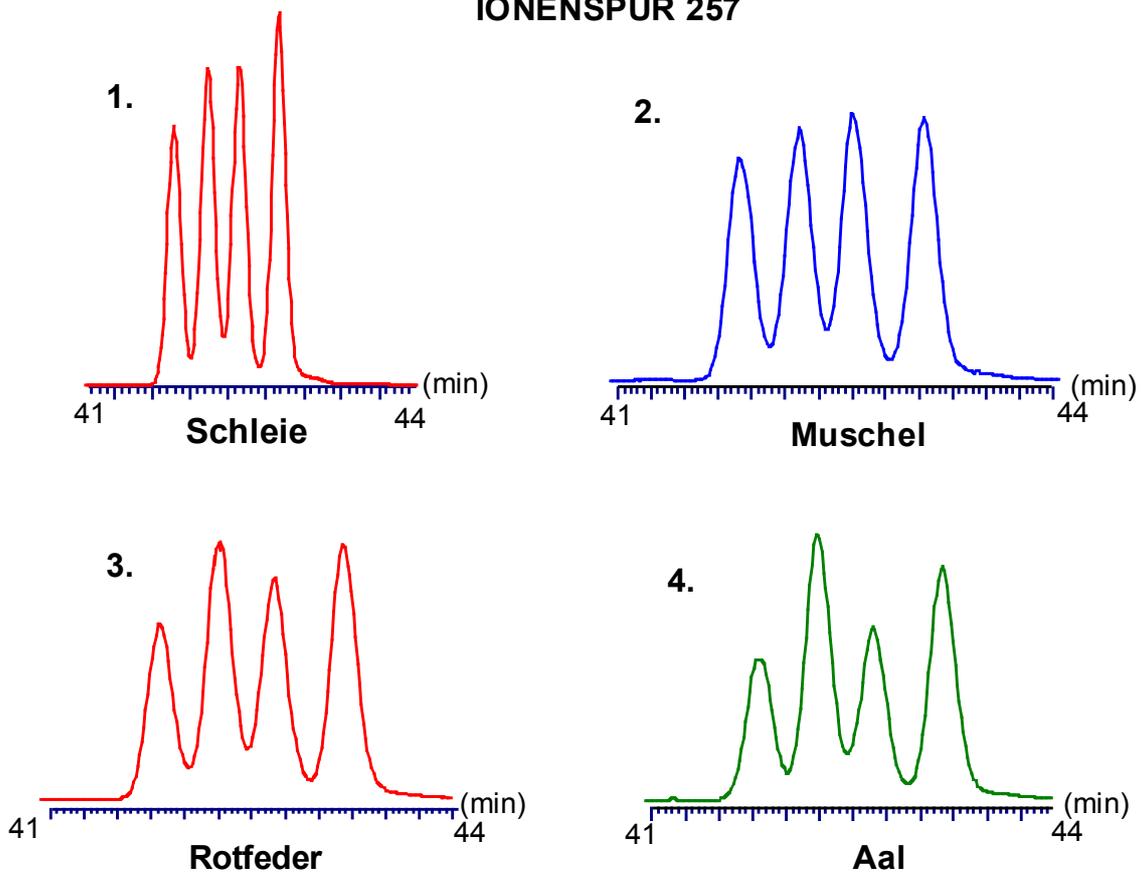


Abbildung 64: Vergleich der SIM-Chromatogramme (Ionenspur 257) der weiteren untersuchten Fischproben-Extrakte 1) Schleie 2) Rotfeder 3) Aal 4) Muschel

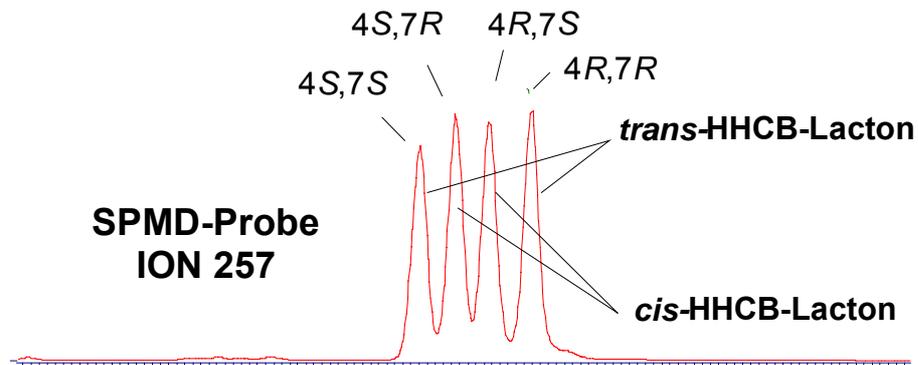


Abbildung 65: Separation der Enantiomere des HHCB-Lactons in der SPMD-Probe des Klärteichs Neumünster, (SIM-Chromatogramm, Ionenspur 257)

Signifikante Unterschiede in den Konzentrationen der Stereoisomere sind nur für die anscheinend metabolisch aktiveren Spezies erkennbar.

Tabelle 52: Konzentrationen und Enantiomeren-Verhältnis für das *cis/trans*-Lacton, gemessen in den unterschiedlichen Fischproben-Extrakten und einer SPMD-Probe des Klärteichs Neumünster.

Probe	Konzentration in [$\mu\text{g/g}$ Fett] Lacton (MW)	<i>trans</i> -Lacton ER	<i>cis</i> -Lacton ER
Rotfeder	8	0,65	1,19
Schleie	33	0,68	0,99
Karausche	24	0,39	0,83
Aal	4	0,59	1,51
Muschel	33	0,81	0,91
SPMD	8	0,81	1,01
Standard		0,87	0,84

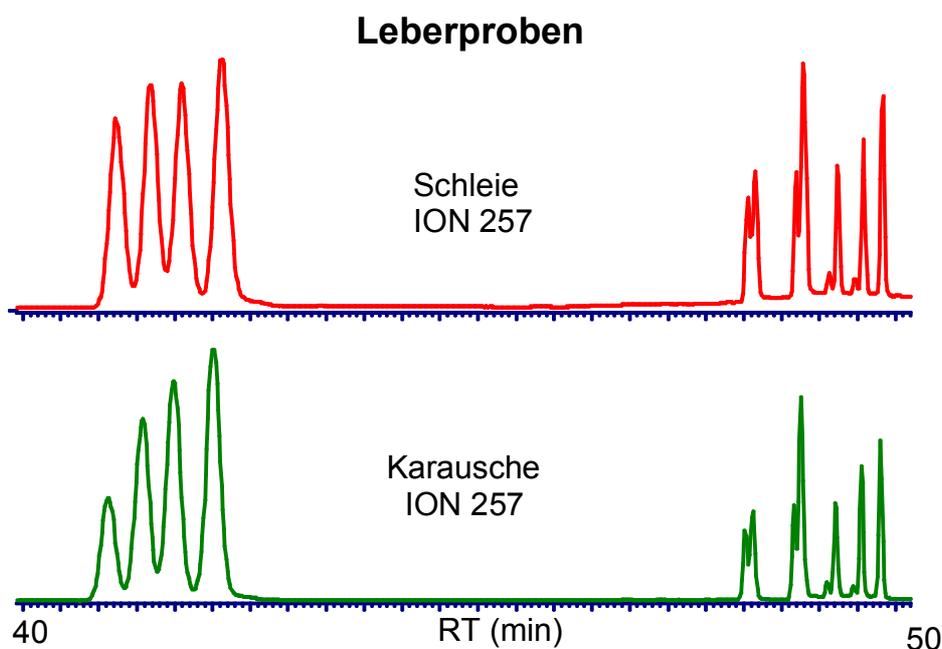


Abbildung 66: Vergleich der SIM-Chromatogramme (ION 257) der Leberproben-Extrakte für Schleie und Karausche auf das HHCB-Lacton

Betrachtet man abschließend noch einmal die Ergebnisse der enantioselektiven GC für die untersuchten Leberproben-Extrakte von Schleie und Karausche, zeigt sich ein Bild ähnlich dem, welches für die Muskelproben erhalten wurde. Die Enantiomerenverhältnisse in der Leber der Karausche liegen dabei in der gleichen Größenordnung. Für *trans*-HHCB resultierte in der Leber ein Verhältnis von ER = 0,10, während das *trans*-Lacton nur noch ER = 0,40 aufweist. Der Unterschied zwischen den Stereoisomeren ist sowohl für Galaxolid[®] als auch den Metaboliten jeweils ausgeprägter im *trans*-Diastereomer. Das Verhältnis für die *cis*-Isomere liegt für Galaxolid[®] um einen Faktor von 3,3 höher, für das Lacton wird mit einem Unterschied um den Faktor 2,1 wiederum eine stärkere

Angleichung der Differenzen erhalten. Zusammenfassend deuten die Befunde darauf hin, daß in den untersuchten Fischen eine Biotransformation von HHCB zum Lacton erfolgt. Jedoch ist parallel auch die Akkumulation aus der Wasserphase neben einer weiteren Metabolisierung des Lactons anzunehmen. Aus dem Vergleich der fettbezogenen Konzentrationen und der Enantiomerenverhältnisse für HHCB und das HHCB-Lacton lassen sich damit folgende Schlußfolgerungen über Anreicherung und Metabolisierung ziehen:

- ⇒ Die gefundenen Maximalwerte in den HHCB-Konzentrationen lassen sich durch passive Biokonzentration allein erklären, hingegen übersteigen die höchsten gefundenen Lacton-Konzentrationen deutlich die durch passive Biokonzentration zu erwartenden Werte. Dies läßt auf einen Abbau des HHCB zum Lacton im Fisch schließen.
- ⇒ Sowohl für Muttersubstanz als auch für Metabolit sind speziesabhängige Unterschiede in der fettbezogenen Konzentration und in den Enantiomerenverhältnissen zu beobachten.
- ⇒ Die Resultate lassen sich möglicherweise durch die Annahme von verschiedenen Abbauwegen bzw. Enzymsystemen erklären, die für den Abbau von HHCB und Lacton zur Verfügung stehen: In der Rotfeder deuten die erhaltenen Ergebnisse für HHCB auf ein eher unspezifisches Enzymsystem, wodurch alle Enantiomere bei sehr geringer Enantioselektivität transformiert werden. Dieses System kommt wahrscheinlich in allen untersuchten Arten, in sehr unterschiedlicher Aktivität zum Tragen und greift sowohl HHCB als auch das Lacton an. Das Lacton scheint dabei aber, da es gleichzeitig Zwischenstufe des HHCB-Abbaus ist, weit weniger ausgeprägt abgebaut zu werden im direkten Vergleich zu den HHCB-Enantiomeren. Da andernfalls eine wesentliche größere Anreicherung der Metabolitenantiomere resultieren müßte, und dies vor allem in den Arten, die auch die höchsten Konzentrationen der Muttersubstanz aufweisen (Karausche). Ein weiterer Abbauweg bzw. ein anderes Enzymsystem hingegen sollte für die beobachtete Enantioselektivität verantwortlich sein. Dieser Weg führt möglicherweise nicht über das Lacton als Zwischenstufe, wodurch es nicht zu einer verstärkten Anreicherung der entsprechenden Enantiomere kommt.

Diese Schlußfolgerungen sind insgesamt als Hypothese zu verstehen und sind erst durch die Durchführung von gezielten Abbauversuchen, unter Einsatz von markierten Verbindungen, vollständig zu überprüfen.

In den Abbildungen 65 und 66 sind im hinteren Retentionsbereich noch weitere Signale zu erkennen, die durch Ihre Symmetrie darauf schließen lassen, daß es sich ebenfalls um chirale Verbindungen handeln könnte. Die dazugehörige Struktur ist bis jetzt nicht vollständig bekannt, da diese Signale erst in den SIM-Messungen in dieser Deutlichkeit hervortraten. Es war gleichzeitig festzustellen, daß die Massenzahlen der Hauptfragmente im gleichen Größenbereich liegen wie die der PCM (m/z 272,258,257,243,229,215,213). Daher ist zu vermuten, daß es sich bei diesen Signalen um Nebenprodukte des technischen Galaxolids handelt, welche zum Teil ebenfalls in beachtlichen

Konzentrationen in den Biotaprobenn des Klärteichs, und in den SPMD-Probenn dieser Studie sowie einer Elbuntersuchung von Gatermann gefunden wurden.^[49] Tabelle 53 listet die Fragmente der SIM-Messungen und deren prozentuale Intensitäten auf. Eine endgültige strukturelle Zuordnung konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erfolgen.

Tabelle 53 : Fragmentationen der möglicherweise chiralen Nebenprodukte des HHCB in Biotaprobenn der Klärteichstudie

Mass	%BPI	%TIC
187	3,93	2,37
213	7,73	4,67
215	16,39	9,89
229	2,81	1,7
243	2,16	1,31
244	0,95	0,57
257	100	60,39
258	19,45	11,75
272	12,17	7,35

Chirale Nebenprodukte des HHCB ?

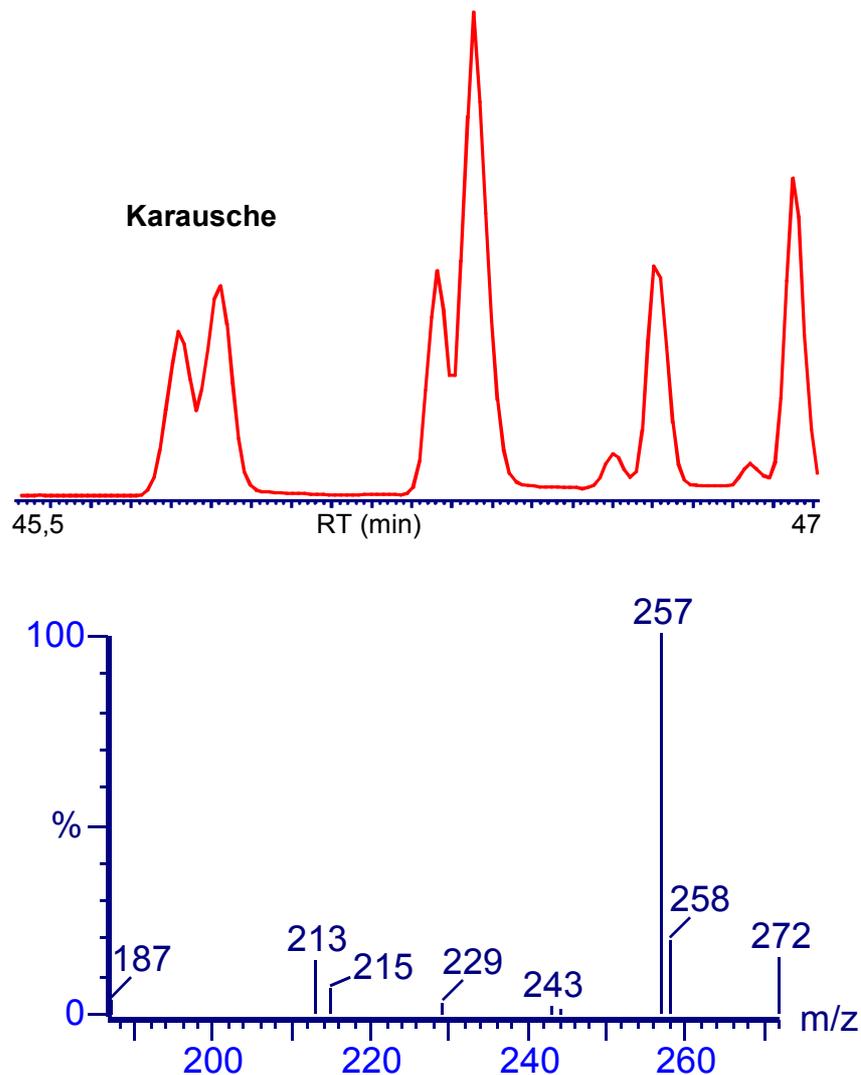


Abbildung 67 : Spektrum des größten Signales (viertes) der HHCB-Nebenprodukte in Biotaprobenn-Extrakten der Klärteichstudie

In den verwendeten Duftstoffstandardmischungen sind eine Reihe von Substanzen als „Verunreinigung“ enthalten. Über eine vergleichende GC-MS-Untersuchung konnte für eine Reihe dieser „Standard-Verunreinigungen“ eine Übereinstimmung der Massenspektren und der Retentionszeiten mit den entsprechenden Signalen in SPMD erhalten werden. In einer 1997 im Institut für organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführten Diplomarbeit, die die Synthese von Galaxolid® als Referenzsubstanz zum Inhalt hatte,^[191] wurden verschiedene Nebenprodukte isoliert und per GC-MS untersucht. Zwischen den Signalen in SPMD-Proben und den Duftstoffstandard-Verunreinigungen wurden ausgezeichnete Übereinstimmungen der Spektren und der relativen Retentionszeiten erhalten. Dies legte die Vermutung nahe, daß die Verunreinigungen ebenso in Kosmetika und Reinigungsprodukten vorhanden sind und durch sie in die Umwelt gelangen. Im folgenden sind die „Strukturvorschläge“ für die Verbindungen dargestellt, von denen auszugehen ist, daß sie mit den in den Karaschen- und Schleileberproben-Extrakten vorkommenden Signalen im Zusammenhang stehen.

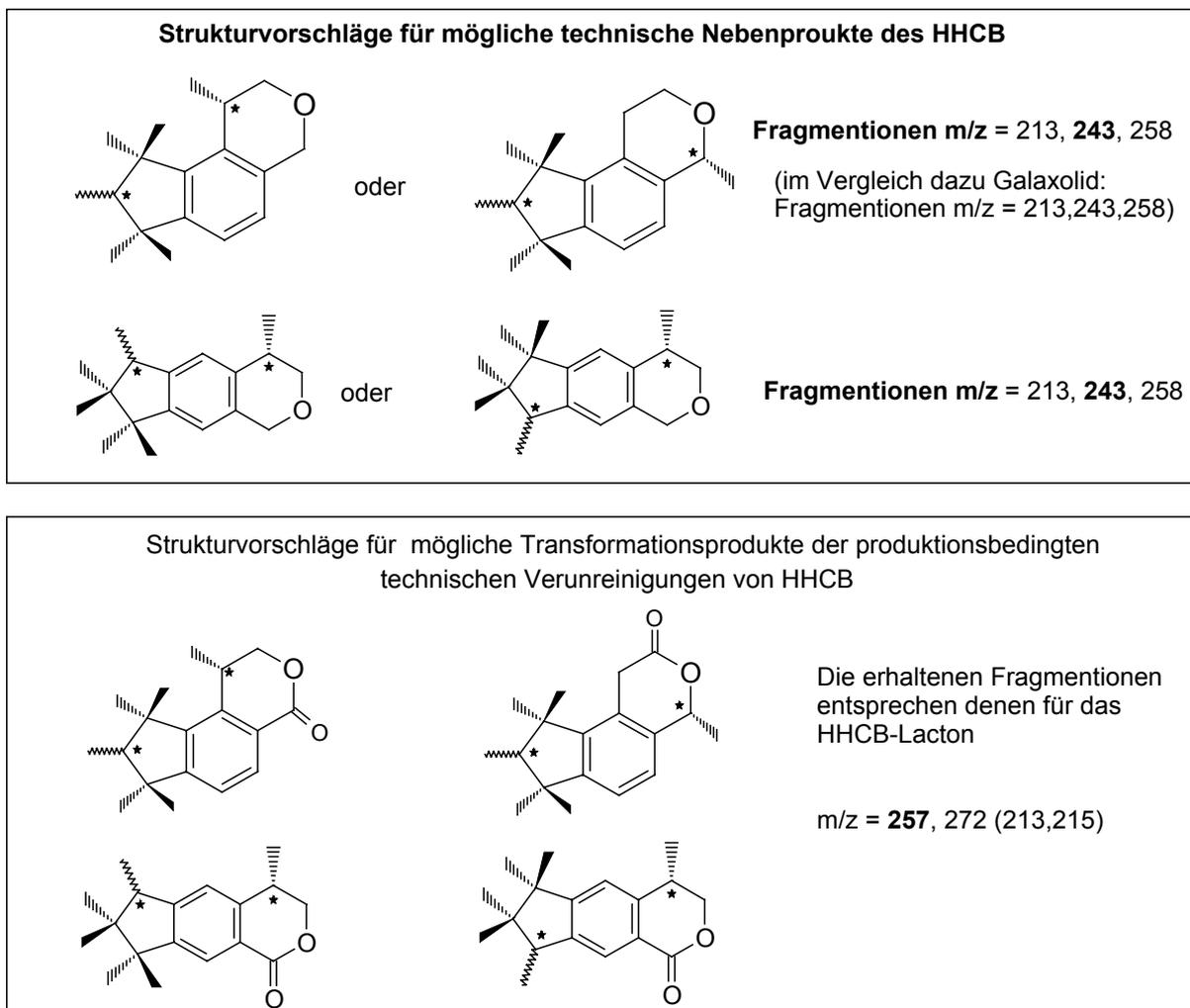


Abbildung 68: Strukturvorschläge für die produktionstechnisch bedingten Verunreinigungen des HHCB sowie deren Metabolite. Es handelt sich hierbei nur um eine Auswahl relevanter Komponenten.

Bei den in Abbildung 67 gezeigten Signalen wird es sich wahrscheinlich um Transformationsprodukte handeln, die möglicherweise Strukturisomere des HHCB-Lactons sind (Abbildung 68, unten). Dies leitet sich aus den relativen Intensitäten der Hauptmassenfragmente ab (257,272,215). Ein endgültiger Beweis für diese Annahme kann allerdings erst die Synthese und vollständige Charakterisierung der entsprechenden Verbindungen liefern.

4.2.3 Separation der Enantiomere des HHCB und *trans*-Traseolids[®] über semipräparative HPLC

Durch die im Klärteich-Experiment festgestellte enantioselektive Anreicherung bzw. Metabolisierung der polycyclischen Moschusverbindungen wird die Frage aufgeworfen, ob möglicherweise einzelne Enantiomere eine unterschiedliche Toxizität aufweisen. Alle toxikologischen Prüfungen, auch die bereits erwähnte niederländische Studie zur Risikoabschätzung von HHCB und AHTN, beziehen sich jeweils auf die racemischen Gemische der Substanzen. Die hier präsentierten Untersuchungen belegen jedoch für einzelne Organismen stereoselektive Prozesse, so daß insgesamt auch Unterschiede in den biologischen Eigenschaften der Diastereomere und Enantiomere möglich sind. Um diesen Fragen nachzugehen, sind jedoch erhebliche Mengen der reinen Isomere notwendig.

Die in den Proben des Klärteich-Experiments vorgefundene hohe Stereoselektivität für einen anderen mengenmäßig relevanten synthetischen Duftstoff (Traseolid[®], ATII) lieferte einen weiteren Grund für die präparativen enantioselektiven Trennungsversuche (s.a. Abbildung 69). Die absolute Konfiguration dieser Verbindung ist bisher noch ungeklärt und eine Zuordnung der erhalten chromatographischen Signale kann nur über das enantiomerenreine Referenzmaterial erfolgen. Werden alle Untersuchungen immer auf ein und derselben chiralen Phase durchgeführt, ist ein Vergleich verschiedener Proben wohl möglich, sobald allerdings eine etwas andere Phase verwendet wird, kann es zu Veränderungen des Elutionsverhaltens kommen. Zum anderen wurden, ebenso wie bereits für HHCB erläutert, größere Mengen der Verbindung für stereospezifische toxikologische Studien und weiterführende Risikoabschätzungen benötigt.

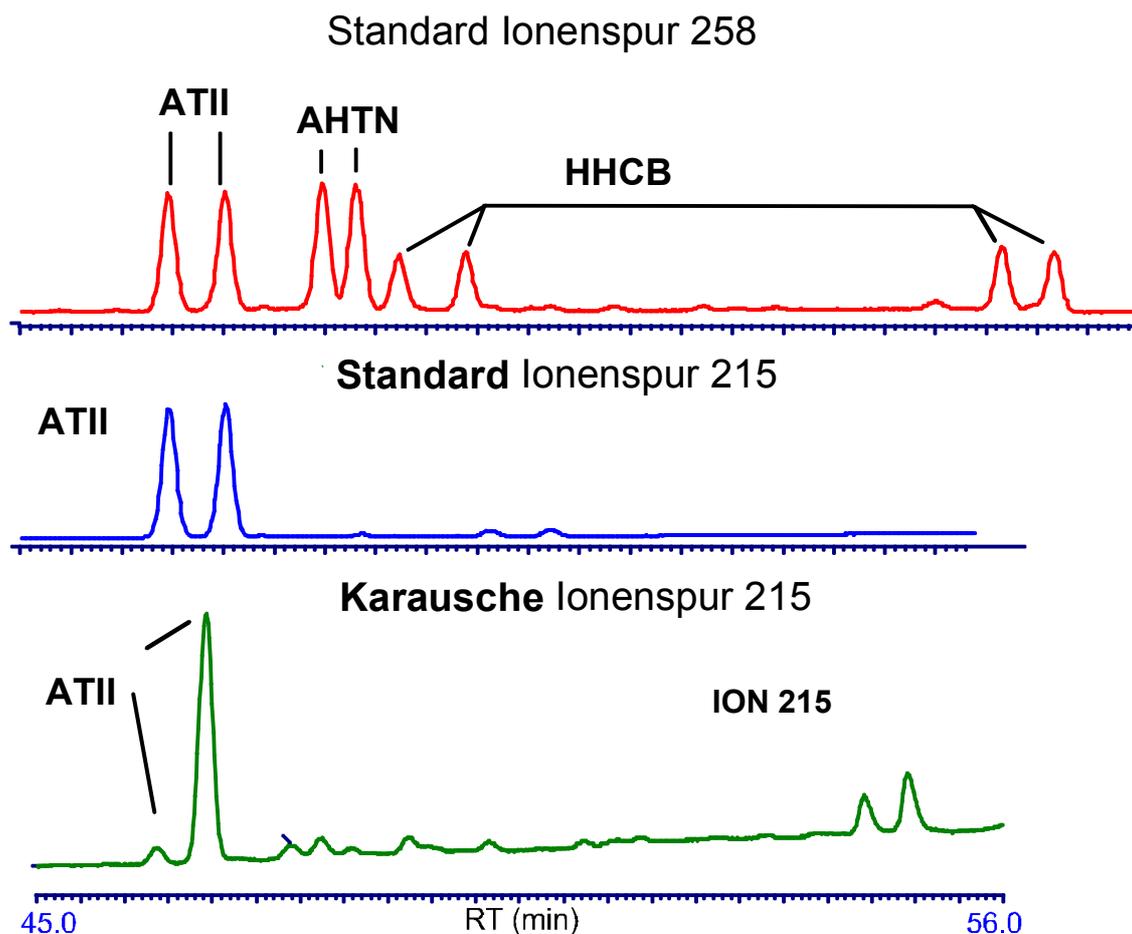


Abbildung 69: Enantioselektive gaschromatische Analyse (Ionenspuren 215) des Karauschenproben-Extraktes auf Traseolid® (unten); zum Vergleich die entsprechende Ionenspur für die Standardverbindung (Mitte) sowie die Ionenspur 258 für eine Standardmischung (oben).

Ferner galt das Interesse der Abtrennung technischer Nebenprodukte der synthetischen Duftstoffe, um dadurch zu deren Strukturaufklärung beizutragen. Hierfür konnte durch die hier beschriebenen Arbeiten jedoch lediglich der Weg bereitet werden. Eine Abtrennung in ausreichenden Mengen steht bislang noch aus.

Die folgende Abbildung 70 zeigt die Trennung von Traseolid® und Galaxolid® auf der stationären permethylierten β -Cyclodextrin Phase, welche monofunktional an 3-Aminopropyl-Kieselgel gebunden war. Als Elutionsmittel (mobile Phase) wurden ein Gemisch von Acetonitril und Wasser im Verhältnis 1:4 eingesetzt.

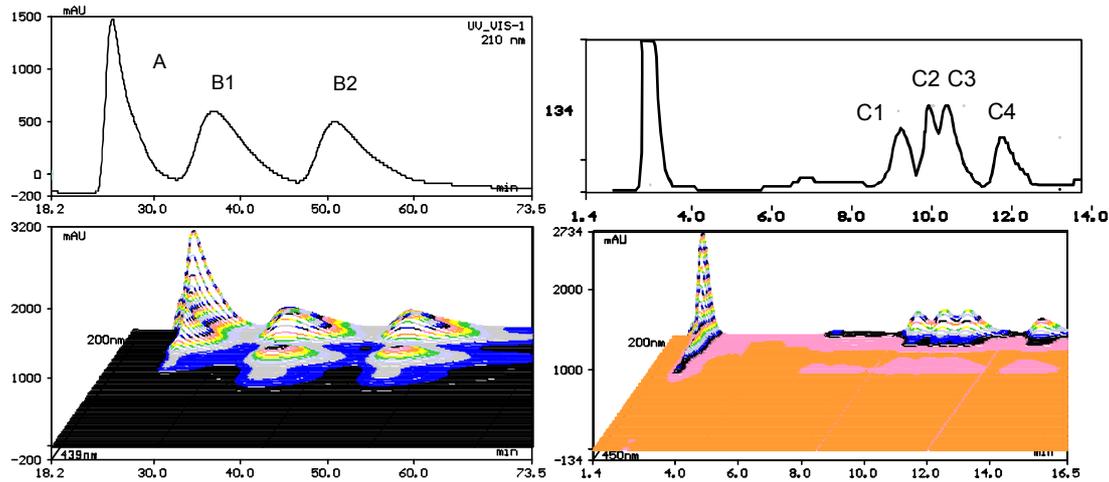


Abbildung 70: Semipräparative enantioselektive HPLC-Trennung; links: A= Phthalat, B 1,2 Traseolid®; rechts: C1-4 HHCB, über die stationäre permethyl- β -cyclodextrin-Phase auf 3-Aminopropyl-Kieselgel (monofunktionalisiert)

Die Trennung von Traseolid verlief relativ erfolgreich. Bei dem ersten der drei im linken Chromatogramm abgebildeten Signale (Peak A) handelt es sich um einen Zusatzstoff, ein Phthalat, welches den handelsüblichen Formulierungen in unterschiedlichen Massenanteilen beigemischt wird, um die Viskosität der Duftstoffmischungen entsprechend dem Verwendungszweck einzustellen. Es wurde zur Trennung eine im Handel erhältliche technische Mischung eingesetzt, da reines Traseolid® in der erforderlichen Menge nicht verfügbar war. Die Signale B1 und B2 konnten durch GC-MS-Analyse und Vergleich mit dem verwendeten analytischen Standardreferenzmaterial Traseolid® zugeordnet werden (siehe Abbildung 71), wobei die Elutionsfolge der Signale der bisher erhaltenen Retention in der Gaschromatographie entsprach (auf der Cyclodextrinphase OV 1701/heptakis(6-*O*-*tert*butyldimethylsilyl)-2,3-di-*O*-methyl)- β -cyclodextrin).

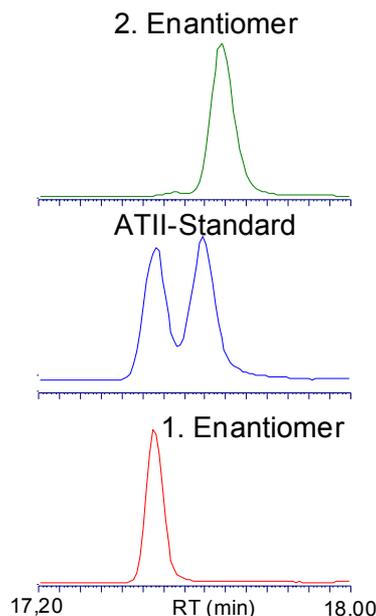


Abbildung 71: Vergleich der mit Hilfe der HPLC isolierten Enantiomere des ATII mit dem analytischen Referenzmaterial (ATII-Standard)

Für die Bestimmung der absoluten Struktur der Enantiomere des Traseolids[®] wurden jedoch aufgrund apparativer Probleme sowie einer unzureichender Säulenkapazität keine ausreichenden Mengen erhalten. Es wurden allerdings beide Enantiomere semipräparativ mit hoher Reinheit (Signal 1 zu 100 % und Signal 2 zu ca. 98 %) aufgetrennt, so daß die gewonnenen Mengen als analytische Standards sehr gut verwendbar sind. Die sehr erfolgreiche Isolierung schafft dadurch die Möglichkeiten für weitere Vergleiche zwischen den Proben auch bei veränderten Elutionsfolgen.

In der Abbildung 70 ist ebenso die enantioselektive Antrennung der 4 Stereoisomere des HHCB abgebildet. Hier wurde anfangs auf einer „analytischen“ HPLC-Säule der gleichen stationären Phase eine möglicherweise ausreichende Trennung erzielt. Beim Übergang zur größeren Trennsäule wurde jedoch eine erheblich verschlechterte Trennung erhalten. Als besonders problematisch erwiesen sich hierbei die sehr langen Retentionszeiten für HHCB, bedingt durch den hohen Wasseranteil in dem Gemisch der mobilen Phase (80 %). Für toxikologische Untersuchungen sollten alle 4 Enantiomere durch dieses Verfahren mit einer zumindest 95 %igen Reinheit erhalten werden. Aufgrund der sehr dichten Elutionsfolge der Isomere erscheint eine Trennung in die 4 Enantiomere entsprechend der Vorgabe vorerst über enantioselektive HPLC mit Hilfe der bisher verwendeten Säulephase nicht möglich. Es sollten daher alternativ Versuche mit weiteren chiralen Phasen durchgeführt oder die Darstellung größerer Mengen über eine stereoselektive Synthese erwogen werden.

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Untersuchungen im Schönungsteich Neumünster

- ❑ Die über das Klärwerk in den Teich gelangenden kommunalen Abwässer sind Haupteintragsweg für die Moschusverbindungen. In bezug auf die Duftstoffe ist eine relativ konstante Schadstoffzufuhr zu erwarten. Durch die Gegebenheiten des Klärteichs konnten Anreicherungs- und Transformationsverhalten der Moschusverbindungen durch die vorliegenden Verteilungsgleichgewichte studiert werden.
- ❑ Die polycyclischen Duftstoffe eignen sich hervorragend für Prozeßstudien zur Anreicherung und Biotransformation.
- ❑ Die Akkumulationstendenz der Substanzklasse unterscheidet sich deutlich von chlororganischen Substanzen, da ein Abbau auch in aquatischen Organismen stattfindet, jedoch nicht so schnell und vollständig, wie er z.B. für polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe gefunden wird. Damit liegen die PCM in ihren Metabolisierungseigenschaften in etwa zwischen denen, die für PAH und Pestizide bzw. allgemein chlororganischen KW angenommen werden.
- ❑ Ähnlich wie bereits für PAH diskutiert, spielt aufgrund der möglichen Transformation der Duftstoffe die Anreicherung über die Nahrungskette eine geringe Rolle, es sollte aber eine Aufnahme aus der Wassersäule bzw. Assimilation aus Porenwasser, gerade für niedere trophische Organismen, berücksichtigt werden.
- ❑ Durch die Transformation der PCM entstehen im Organismus polarere Metabolite. Ob dadurch eine Detoxifizierung oder aber möglicherweise toxischere Stoffe für den jeweiligen Organismus

entstehen, wie es für einzelne PAH beispielsweise durch Epoxidierung nachgewiesen ist (Benz-a-pyren, Mutagenität), ist für die Transformationsprodukte der polycyclischen Moschusverbindungen allgemein, und hier im speziellen dem Lacton, noch ungeklärt.

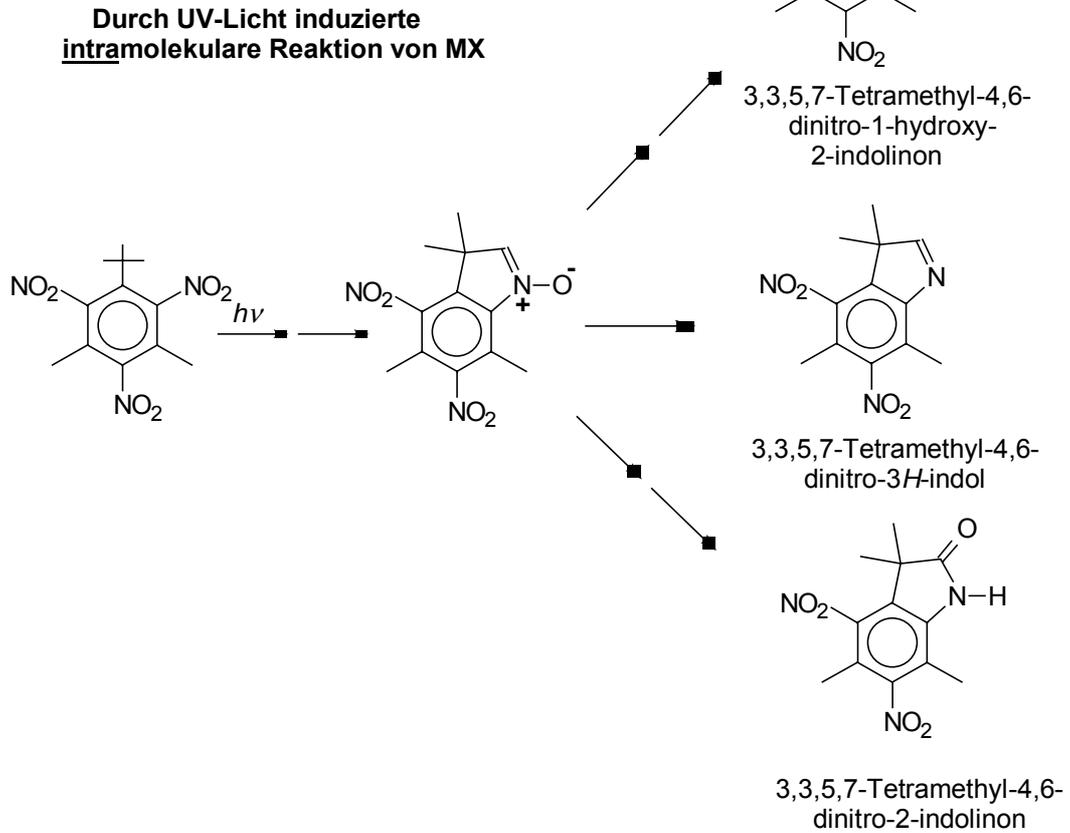
4.4 Toxizität der Nitromoschus-Metabolite

4.4.1 Synthese der Nitromoschusmetabolite von MX und MK für toxikologische Studien

Als Folge der Umweltbelastungen mit Nitromoschusverbindungen treten auch deren Transformationsprodukte in Erscheinung. Die Biokonzentration der Mutterverbindungen, beispielsweise im Lebensmittel Fisch, birgt für den Menschen die Gefahr einer Aufnahme über die Nahrung (bzw. über das in der Massentierhaltung verwendete Fischmehl), daneben ist die dermale Exposition von entscheidender Bedeutung. Ein wichtiger Aspekt ist daher nicht nur das Vorkommen der Transformationsprodukte in der Umwelt, sondern auch deren Entstehung im menschlichen Organismus.

Die Umweltbelastungen mit Nitromoschusduftstoffen sind in den letzten 5 Jahren deutlich zurückgegangen, parallel wurde jedoch auch festgestellt, daß die Konzentrationen der Aminometabolite die der Mutterverbindungen in Oberflächengewässern vielfach überschreiten (4-40fach)^[19]. Daher sind in Umweltrisikoaabschätzungen neben den Mutterverbindungen auch die Transformationsprodukte mit einzubeziehen. Durch mikrobiellen Abbau und metabolische Transformation resultieren aus MX, mit 4-Amino-MX und zu einem geringeren Anteil auch 2-Amino-MX, zwei Transformationsprodukte während MK zu 2-Amino-MK abgebaut wird unterscheiden (Abbildung 72). Darüberhinaus können abiotische und biotische Prozesse in der Umwelt zu weiteren Transformationsprodukten führen.

1. Abiotische Transformation



2. Biotische Transformation
Mikrobielle Reduktion

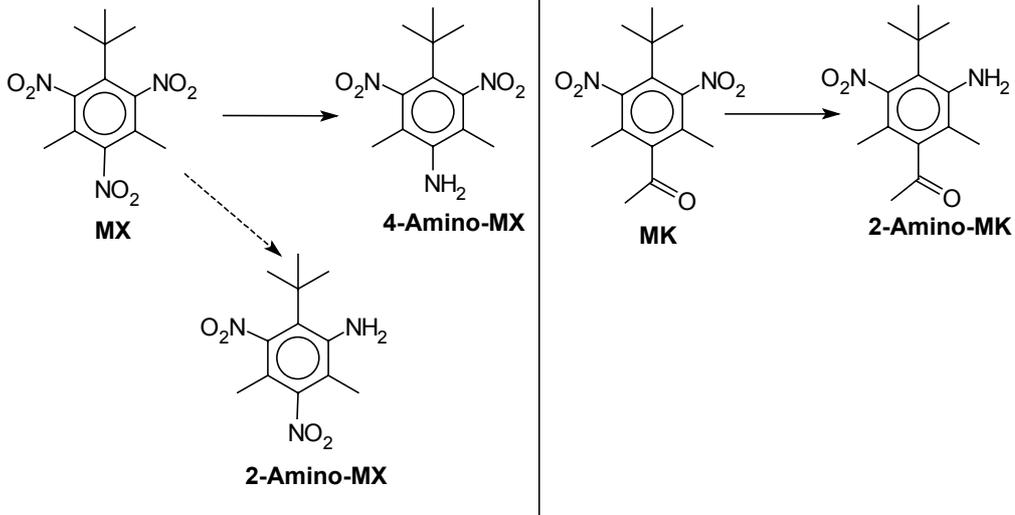


Abbildung 72: Mögliche Transformationsreaktionen von MX in der Umwelt

Abiotische Transformation (nach Döpp^[192]):

- ⇒ Photochemische Reaktion zu stabilen Indolen und Indolinonen durch die intramolekulare Reaktion einer Nitrogruppe mit einer Alkylgruppe.
- ⇒ Die Reaktionsgeschwindigkeit hierfür ist unter Normalbedingungen (Sonnenlicht) gering.

Biotische Transformation:

- ⇒ Es ist zwischen aerober (Oxidation) und anaerober (Reduktion) Transformation zu unterscheiden.
- ⇒ Die Bildung der Amino-Metabolite durch Reduktion der Nitrogruppe verläuft im Klärwerk anaerob und wird als der wichtigste Abbauweg angesehen, während die aerobe Transformation in Form von oxidativen Prozessen für diese Substanzklasse nahezu keine Bedeutung hat. Allenfalls eine Oxidation an den Alkylketten ist möglich.

Enzymatische Metabolisierung (s.a. auch Abbildung 73) :

- ⇒ In Ratten wurde 4-Amino-MX im Urin, Faeces und der Galle nachgewiesen.
- ⇒ Es wurden keine acetylierten Produkte als Metabolite beobachtet.
- ⇒ Intermediärprodukte wie beispielsweise Hydroxylamine wurden gefunden.
- ⇒ In geringen Konzentrationen wurden auch die Diamine identifiziert.
- ⇒ Ebenso wurden die durch Cyp 450-Enzymsysteme an Alkylgruppen oxidierten Transformationsprodukte in geringen Mengen nachgewiesen.

Zur weiteren Aufklärung dieser verschiedenen abiotischen und biotischen Transformationsprozesse in der Umwelt sowie zur Durchführung toxikologischer Studien wurden Standardmaterialien benötigt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Aminometabolite von MK und MX synthetisiert, um über die im folgenden dargestellten Kooperationen eine toxikologische Prüfung der Substanzen zu ermöglichen.

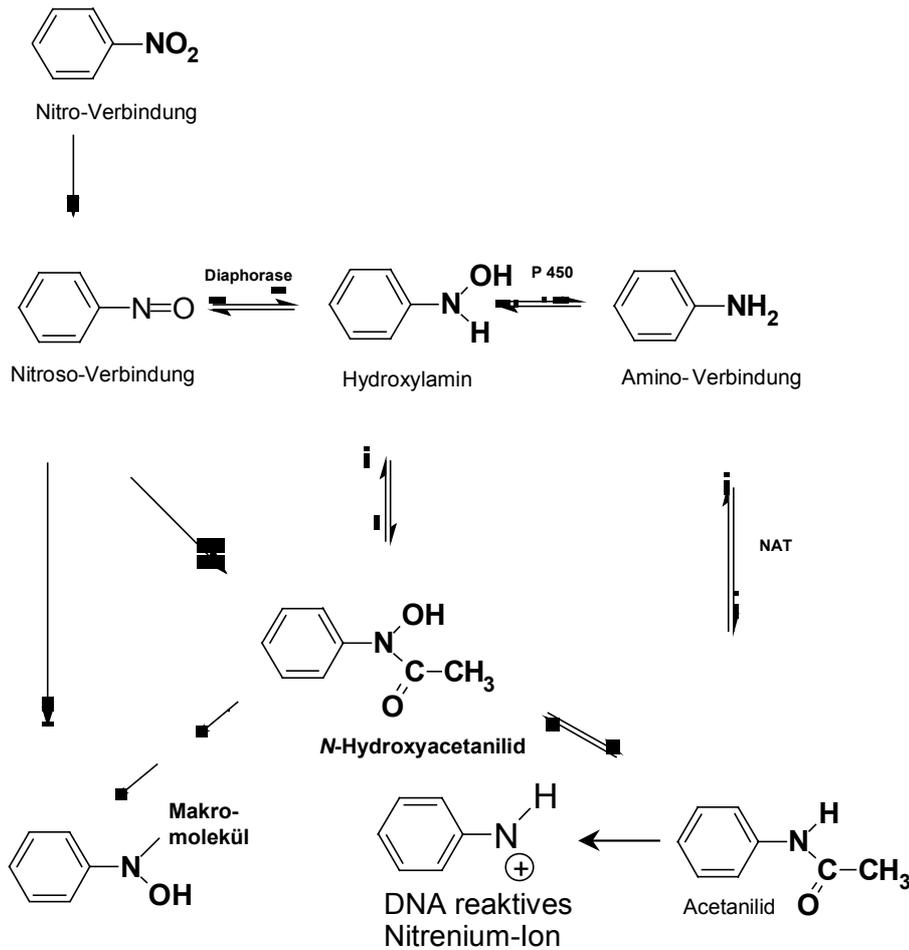


Abbildung 73: Biologische Aktivierung von Nitroaromaten und aromatischen Aminen

Aus MX wurde *ortho*-Moschusxylo-Amin (2-amino-MX) als auch *para*-Moschusxylo-Amin (4-Amino-MX) durch katalytische Hydrierung synthetisiert. Das *ortho*-Moschusketon-Amin (2-Amino-MK) wurde durch Reduktion des MK erhalten. Eine vollständige Beschreibung der Reaktionen ist im experimentellen Teil dieser Arbeit enthalten.

Zu den Mutterverbindungen Moschus-Xylol und Moschus-Keton wurde bereits von anderen Autoren eine Reihe an toxikologischen Studien durchgeführt, für nähere Details soll an dieser Stelle auf entsprechende Übersichtsartikel verwiesen werden.^[17,18,193] Neben den in dieser Arbeit aufgeführten toxikologischen Prüfungen, ist hingegen bislang lediglich eine Untersuchung zur akuten aquatischen Toxizität der MX-Transformationsprodukte, gemessen an *Daphnia magna*, veröffentlicht. In der zitierten Studie wurden großen Unterschiede in der Toxizität von 4-Amino-MX und 2-Amino-MX erkannt.^[29] Auf Initiative des Research Instituts for Fragrance Materials (RIFM) wurden diese Untersuchungen von einer anderen Arbeitsgruppe wiederholt, da es für die Ergebnisse keine plausible Erklärung gab. Auffällig ist die Abweichung des von Behecti et al. gefundenen EC₅₀-Wertes für 4-Amino-MX von einem theoretisch kalkulierten Wert (siehe Tabelle 54). Die in der RIFM-Studie gefundenen Effektkonzentrationen stimmen hingegen sehr gut mit dem kalkulierten Wert überein. Eine mögliche Ursache für die enorme Abweichung zwischen beiden Studien könnte der unterschiedliche Reinheitsgrad der eingesetzten Verbindungen sein (98,5% und 99,9% rein). Alle weiteren MX-

Metaboliten wurden ebenfalls vom RIFM erneut untersucht, die Ergebnisse sind jedoch zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig publiziert.

Tabelle 54: Akute Toxizität (EC₅₀ *Daphnia magna*) der Amino-Transformationsprodukte des MX (durchgeführt nach OECD Guideline 202)

Verbindung	Behecti et al. ^[29] [µg/L]	ECOSAR*	RIFM [µg/L] ^[194]	
			Laborwasser	Natürliches Wasser
2-Amino-MX	1070	546	n.e.	n.e.
4-Amino-MX	0,25	546	490	370
2,4-Diamino-MX	23300	341	n.e.	n.e.
2,4,6-Triamino-MX	58800	1215	n.e.	n.e.

* theoretisch berechnet über eine QSAR-Kalkulation n.e. = noch nicht erhältlich

Ferner sind in Tabelle 55 die Verhältnisse der Predicted Environmental Concentration zu Predicted No Effect Concentration als PEC/PNEC-Faktoren enthalten, welche auf der Grundlage der von Behecti et al. im Vergleich zu den Ergebnissen der RIFM-Studie erzielten Daten berechnet wurden. Diese Gegenüberstellung macht die Brisanz der gefundenen Werte und die damit einhergehende Diskrepanz für die Diskussion um eine mögliche Verwendungsbeschränkung von MX deutlich: Legt man die Daten von Behecti et al. zugrunde, so wird die zu erwartende PNEC um mehr als eine Zehnerpotenz durch die tatsächlich in der Umwelt gefundene Konzentration übertroffen.

Tabelle 55 : Kalkulierte PEC/PNEC-Daten der Studien von Behecti et al.^[29] und des RIFM^[194]

	Behecti et al. PEC [ng/L]	Faktor	PNEC [ng/L]	RIFM PEC [ng/L]	PNEC [ng/L]	Faktor
2-Amino-MX	1	9,3*10 ⁻⁴	1070	-	-	-
4-Amino-MX	9	36	0,25	370	34/9	0,092/0,024

4.4.2 Ergebnisse der Kooperation zur Untersuchung der Aminometabolite auf Mutagenität

Problemstellung:

- ⇒ Die entscheidende toxikologische Fragestellung, die mit der Substanzklasse der aromatischen Amine verknüpft ist, ist das potentielle Risiko der Bildung sogenannter DNA-Addukte über im Organismus intermediär gebildete Hydroxylamine (s.a. Abbildung 73).
- ⇒ Die Instabilität der Nitrogruppe und ihre enzymatisch katalysierte Umwandlung in eine Aminogruppe ist hierbei von entscheidender Bedeutung.

In Abbildung 73 ist die biologische Aktivierung der Nitroaromaten und aromatischen Amine zum mutagenen Nitrenium-Ion beispielhaft gezeigt. Hierbei beeinflusst vor allem die Position der Nitrogruppe und die zeitliche Abfolge der Entstehung der Umwandlungsprodukte ihr toxikokinetisches Verhalten und damit ihr kanzerogenes Potential. In einer humantoxikokinetischen Untersuchung konnte bereits ein Aminometabolit (4-Amino-MX) der Nitromoschusduftstoffe, an Hämoglobin gebunden, im menschlichen Organismus nachgewiesen werden,^[195] was zusätzlich die besondere Relevanz dieser Untersuchungen verdeutlicht.

Die Aminonitroverbindungen 2-Amino-MX, 4-Amino-MX und 2-Amino-MK wurden in Zusammenarbeit mit dem Toxikologischen Institut der Universität Hamburg durch Vahl auf Genotoxizität bzw. speziell auf mutagene Eigenschaften überprüft. Es wurde dazu der Arabinose-Resistenz-Test eingesetzt.^[196]

Die Ergebnisse des Ara-Tests für die beiden Metabolite des MX sind graphisch in der nachfolgenden Abbildung 74 dargestellt. Die Messungen waren durch eine hohe Zelltoxizität der Testsubstanzen limitiert, so daß mögliche Effekte in anderen als hier dargestellten Konzentrationsbereichen nicht erfaßt werden konnten. Der untersuchte Konzentrationsbereich erstreckte sich dabei zwischen 27 µM – 27 mM (5 ng - 5 µg/µL). Für einen signifikanten Effekt muß eine Induktion > 2 ausgelöst werden, was für keine der untersuchten Substanzen erreicht wurde. In zwei weiteren parallel eingesetzten Biotests (umu-Test, Salmonella-Microsomen-Test) wurden ebenso durchweg keine Hinweise auf eine genotoxische bzw. mutagene Wirkung erhalten.

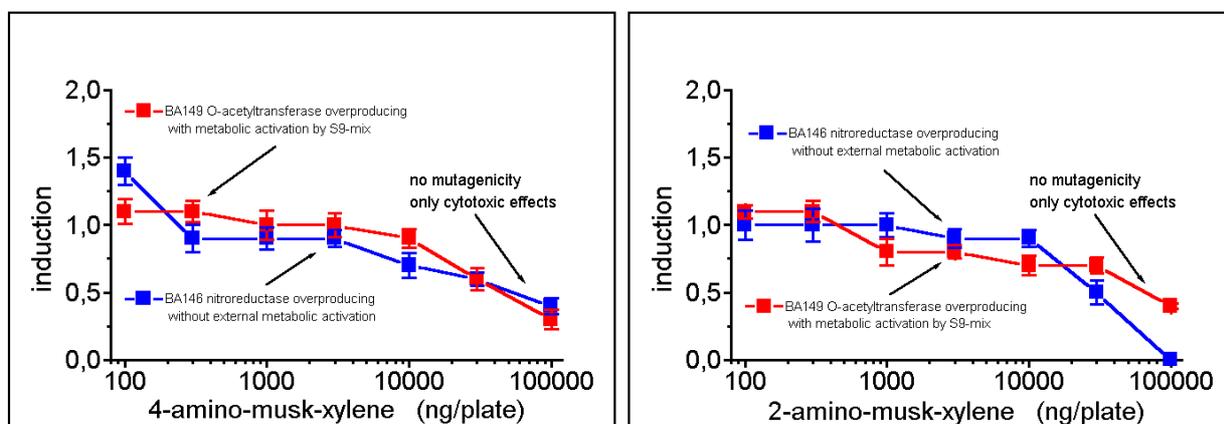


Abbildung 74: Ergebnisse der Untersuchung von 2-Amino-MX und 4-Amino-MX im Arabinose-Resistenz-Test (Aus: [196])

Moschus-Ambrette ist die bisher einzige Nitromoschusverbindung, die einen positiven Effekt in einer Untersuchung mit *Salmonella Typhimurium*-Stämmen TA 98 und TA 100 zeigte. Es wird angenommen, daß der Effekt auf die Position der Nitrogruppe und die zusätzlich vorhandene Methoxygruppe zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang ist noch anzumerken, daß für Moschus-Ambrette keine Mutagenität ohne vorherige Metabolisierung (d.h. Zugabe von S9-Mix) festgestellt werden konnte. Die Nitrogruppe selbst sollte daher eher eine untergeordnete Rolle für die mutagene Wirkung spielen, die Toxizität wird wahrscheinlich vielmehr durch eine primäre katalytische Metabolisierung hervorrufen. Insgesamt bleibt die Ursache für Unterschiede in der Mutagenität der strukturell sehr ähnlichen Nitromoschusverbindungen unklar. QSAR-Modellierungen der Nitromoschusverbindungen könnten möglicherweise bei der Aufklärung der vorliegenden Mechanismen der Mutagenität hilfreich sein.

Chronische Toxizität

Die synthetisierten Substanzen wurden ebenfalls einer Schweizer Arbeitsgruppe übergeben, diese widmen ihre Untersuchungen möglichen chronischen Wirkungen. Die Experimente werden *in vivo* durchgeführt und sind damit sehr langwierig und aufwendig gestaltet. Bis zum Abschluß dieser Arbeit lag daher noch kein verwertbares Datenmaterial vor.

4.4.3 Untersuchung des östrogenen Potentials der Aminometabolite

Problemstellung:

In den letzten Jahren ist die Problematik der Störung des endokrinen Systems sowohl durch synthetische als auch natürliche Stoffe immer stärker in die Diskussion geraten. Versuche mit gehälterten Forellen im Abflußbereich von Kläranlagen in England haben gezeigt, daß im geklärten Abwasser Stoffe enthalten sind, durch die bei weiblichen und männlichen Fischen die Vitellogenin-Synthese induziert wird. Vitellogenin dient hierbei als Biomarker für endokrine Effekte, denn es wird als Lipoprotein in der Leber weiblicher Tiere gebildet, kommt natürlich bei männlichen und juvenilen weiblichen Tieren jedoch nicht vor. Beispielsweise wurde den Nitromoschusverbindungen in jüngster Zeit eine hormonähnliche Wirkung zugeschrieben (endocrine-mimicing substances oder auch endocrine modulating). Ein Zusammenhang für die Untersuchung der Aminometabolite auf ein östrogenes Wirkpotential ist durch folgende Umstände begründet:

- ⇒ Untersuchungen von Abwässern aus Kläranlagen zeigen häufig hohe Gehalte an synthetischen Moschusverbindungen. Sie gehören vielfach zu den dominantesten organischen Verbindungen im bereits geklärten Abwasser.
- ⇒ Es wurde bereits in einzelnen Untersuchungen festgestellt, daß die Konzentrationen der Aminometabolite die der Mutterverbindungen ca. 4-40 fach überschreiten.

Die Aminometabolite besitzen eine höhere Hydrophilie und sind damit für aquatische Organismen besser bioverfügbar. Da bereits für die Mutterverbindungen eine Bindung an den Östrogen-Rezeptor festgestellt wurde^[163], ist eine mögliche östrogene Aktivität der Metabolite nicht auszuschließen. Mit den zur Verfügung gestellten Aminen wurden von einer Arbeitsgruppe in Konstanz Bindungsstudien mit Hilfe isolierter ER-Rezeptoren aus der Regenbogenforelle sowie des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) durchgeführt. Die Ergebnisse der Studien werden im Abschnitt 4.4.3.2 beschrieben.

Über eine dermale Aufnahme der synthetischen Duftstoffe bei Verwendung von parfümhaltigen Kosmetika bzw. Parfümprodukten (personal care products) besteht ein direktes humantoxikologisches Risiko. Das 4-Amino-MX konnte bereits als Metabolit im Urin sowie an Hämoglobin gebunden im Blut nachgewiesen werden.^[195] Ob sich hieraus eine Gefährdung für den Menschen ableiten läßt, ist bislang ungeklärt. Schwarz et al. erhielten in einer 1998 veröffentlichten Untersuchung erste Hinweise auf einen möglichen Einfluß von Nitromoschusduftstoffen bei endokrinen Störungen der Frau.^[197]

Für Studien mit humantoxikologischem Bezug wurden die Aminometabolite dem staatlichen Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamtes Mittelhessen (Nikola Bitsch) zur Verfügung gestellt. Die Metaboliten wurden auf eine potentielle östrogene Aktivität, vergleichend zu den Mutterverbindungen sowie einer Auswahl polycyclischer und makrocyclischer Duftstoffe, im E-Screen nach Soto/Sonnenschein (humane Brustkrebszelllinie, MCF7) analysiert. Aus methodischer Sicht bieten diese weiteren Studien, die auf eine potentielle Bindung an einen humanen Östrogenrezeptor zielen, eine direkte Ergänzung zu den bereits erwähnten Biotest-Systemen der Konstanzer Arbeitsgruppe, bei denen es sich zum einen um wesentlich spezifischere Tests handelte und bei denen zum anderen die Analysen eher auf im Wasser lebende Organismen zu beziehen sind.

4.4.3.1 Ergebnisse aus der Kooperation zur Untersuchung eines östrogenen

Wirkpotentials: E-Screen-Assay

Die folgende Tabelle 56 gibt eine Übersicht der Ergebnisse für die im E-Screen-Assay untersuchten Nitromoschusverbindungen und -metabolite. Zum Vergleich und für einen besseren Gesamtüberblick wurden die Ergebnisse aller untersuchten Testsubstanzen in die Tabelle aufgenommen. Innerhalb einer jeden Testreihe wird eine Positiv- und Negativkontrolle (Blank) mit vorgenommen. Als Positivkontrolle wurde 17- β -Östradiol (E2) eingesetzt, während die Negativkontrolle zur Überprüfung möglicher Hintergrundeffekte dient, wobei das verwendete Lösungsmittel und das Testmedium benutzt wird. Die Effektstärke bzw. Bindungsaffinität des Östradiols liegt generell mehrere Größenordnungen über der Wirkstärke der zu testenden Xenobiotika, wodurch sich in den Versuchsreihen für Xenoöstrogene stark unterschiedliche Konzentrationslevel im Vergleich zu natürlichen Hormonen ergeben. In diesem Fall wurde E2 im Konzentrationsbereich von 10^{-9} bis 10^{-13} M verwendet, während die Testsubstanzen im Bereich von 10^{-5} bis maximal 5×10^{-9} Mol/L eingesetzt wurden. Anschließend erfolgt dann eine Koinkubation der Testplatten mit dem Antiöstrogen Tamoxifen, um so zu überprüfen, inwieweit die Erhöhung der Proliferation Rezeptor-vermittelt ist. Die Ergebnisse sind als sogenannte mittlere Proliferations-Effekte (PE) dargestellt. Dies ist gleichbedeutend dem Verhältnis aus der höchsten durchschnittlichen Zellzahl, die mit der zu testenden Substanz (bzw. E2) im Vergleich zur Negativkontrolle erzielt wurde.

Für alle Testsubstanzen wurden jeweils die maximal möglichen Konzentrationen, gemessen an der Anzahl überlebender Zellen, ermittelt und eingesetzt (Tabelle 56). In der vorletzten Spalte ist der arithmetische Mittelwert und in der letzten die erhaltene Standardabweichung der einzelnen PE-Werte angegeben.

Tabelle 56 : Proliferations-Effekt (PE, in %) der untersuchten Moschusduftstoffe (Mittelwerte)

Gruppe	Substanz	Konz.	n	Mittelwert PE	Cv (%)
Nitromoschus- verbindungen	MX	10 ⁻⁵	4	1,304	17,5
	MK	10 ⁻⁵	3	1,978	16,2
	MK / Tamox.	10 ⁻⁵	3	0,720	54,8
Nitromoschus- metabolite	4-Amino-MX	5x10 ⁻⁶	4	1,178	12,3
	2-Amino-MX	10 ⁻⁵	3	0,482	14,4
	2-Amino-MK	5x10 ⁻⁶	3	0,885	21,1
Makro- zyklische Moschus- verbindungen	Cyclopenta- decanolid	5x10 ⁻⁵	4	1,033	24,2
	Ethylenbras- silat	10 ⁻⁵	4	0,990	14,3
	Ethylen- dodecandioat	10 ⁻⁵	4	0,920	17,1
	Muscone	10 ⁻⁵	3	1,231	23,8

n = Anzahl der durchgeführten Assays

Cv = Variationskoeffizient

Tamox. = Tamoxifen

Zur Bewertung der aufgeführten Ergebnisse sei angemerkt, daß ein signifikanter Effekt erst bei Überschreiten eines mittleren Proliferationseffektes von > 1,2 (statistisch ermittelter Grenzwert) gegeben ist. Es stellte sich heraus, daß sowohl 2-Amino-MK als auch 2-Amino-MX keine östrogene Aktivität im E-Sceen-Assay zeigen. Bei 2-Amino-MX wurde der höchste PE-Wert bei der niedrigsten Testkonzentration (1*10⁻⁹ Mol/L) gemessen. Der erhaltene Wert lag jedoch immer deutlich unterhalb dem der Negativkontrolle, als Erklärung hierfür wird eine hohe Zelltoxizität angenommen.

Für 4-Amino-MX erwies sich die höchste gemessene Konzentration mit 5*10⁻⁵ Mol/L als cytotoxisch. Der für diese Konzentration erhaltene mittlere PE liegt jedoch knapp an der statistisch festgelegten Grenze von 1,2 (1,178), so daß hier eine potentielle östrogene Aktivität nicht ausgeschlossen werden kann. Aus diesem Grunde werden in diesem Fall noch weitere Untersuchungen zur endgültigen Verifizierung angestrebt.

Im Vergleich zeigen die hier ebenfalls untersuchten Mutterverbindungen MX und MK einen signifikant erhöhten PE-Wert. Für MX wurde bereits in früheren Untersuchungen eine östrogene Wirkung im E-Screen festgestellt, so daß die hier erzielten Ergebnisse in Übereinstimmung mit den bereits publizierten Daten stehen.^[163] Die höchsten Effekte wurden jedoch für MK ermittelt und anschließend durch Koinkubation mit Tamoxifen ergänzend untersucht. Hierbei konnte ein sogenannter „relativer Proliferations-Effekt“ (RPE) ermittelt werden. Der RPE beschreibt die relative Wirkstärke einer Testsubstanz gegenüber E2 in %. Mit einem RPE von 26,2% kann Moschusketon als partieller Agonist angesehen werden. In bezug auf ein hormonähnliches Wirkpotential des MK konnten keine bereits publizierten Daten gefunden werden.

4.4.3.2 Ergebnisse der Kooperation zu kompetitiven Bindungsstudien mit Hilfe des ER-Rezeptor der Regenbogenforelle und des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus Laevis*)

Aufgrund der sehr umfangreichen Testsysteme soll an dieser Stelle bezüglich experimenteller Details der durchgeführten Biotests sowie der vollständigen Beschreibung der hier präsentierten Ergebnisse für die Nitromoschusmetabolite auf die bereits publizierten Arbeiten von Chou et al.^[198] verwiesen werden. Eine kurze Skizzierung der Testmethode ist im Anhang enthalten.

Die durch Versuche über zwei verschiedene unterschiedliche aquatischen Spezies erhaltenen Ergebnisse für Nitromoschusverbindungen unterscheiden sich gänzlich von den bereits diskutierten E-Screen-Daten. Waren im E-Screen-Test noch signifikante Effekte für MK und MX zu erkennen und damit auch Belege für die Bindung an den Rezeptor gegeben, wurden für die Muttersubstanzen über die hier untersuchten Spezies keine Effekte beobachtet. Demgegenüber wurde für die Metabolite in beiden Tierversuchen eine Bindung an den ER-Rezeptor festgestellt. Für die Untersuchungen wurden ein- bis zweijährige Regenbogenforellen sowie einjährige Krallenfrösche (*Xenopus laevis*) eingesetzt. Die hepatozytischen Östrogen-Rezeptoren wurden für jedes Experiment frisch isoliert und aufgereinigt, außerdem wurde ein Vergleichsexperiment mit bei -80°C (193 K) eingefrorenen Rezeptor-Zellen durchgeführt. Für die kompetitiven Studien (Verdrängungs-Assay) wurden die gereinigten ERs beider Spezies mit radioaktivem E_2 ($^3\text{H-E}_2$) dotiert. Insgesamt konnten die Autoren keine Unterschiede bei Verwendung der konservierten Zellen feststellen. Die Ergebnisse der Studien der Nitromoschus-Transformationsprodukte sind vergleichend zu den extrem effektiven Substanzen E_2 und Bisphenol A (BA) in Tabelle 57 dargestellt.

Tabelle 57 : Kompetitive Bindung der Nitromoschusmetabolite sowie Östradiol und Bisphenol A am ER-Rezeptor der Regenbogenforelle und des Krallenfrosches unter Verwendung von $^3\text{H-E}_2$

Verbindung	Testkonzentration (M)	IC ₅₀
<u>Regenbogenforelle</u>		
Östradiol	10^{-10} - 10^{-6}	$5,3 \pm 1,2$ nM
Bisphenol A	10^{-7} – 10^{-3}	$8,8 \pm 1,8$ μM
4-Amino-MX	10^{-6} – 10^{-3}	-
2-Amino-MX	10^{-6} – 10^{-3}	$1,3 \pm 1,1$ mM
2-Amino-MK	10^{-6} – 10^{-3}	-
<u>Krallenfrosch</u>		
Östradiol	10^{-10} - 10^{-6}	187 ± 76 nM
Bisphenol A	10^{-7} – 10^{-3}	441 ± 247 nM
4-Amino-MX	10^{-7} – 10^{-3}	$30,8 \pm 28,5$ μM
2-Amino-MX	10^{-7} – 10^{-3}	$12,9 \pm 10,3$ μM
2-Amino-MK	10^{-7} – 10^{-3}	$70,1 \pm 88,3$ μM

IC₅₀ (kompetitive Bindung an ER, Verdrängung von 50 % $^3\text{H-E}_2$)

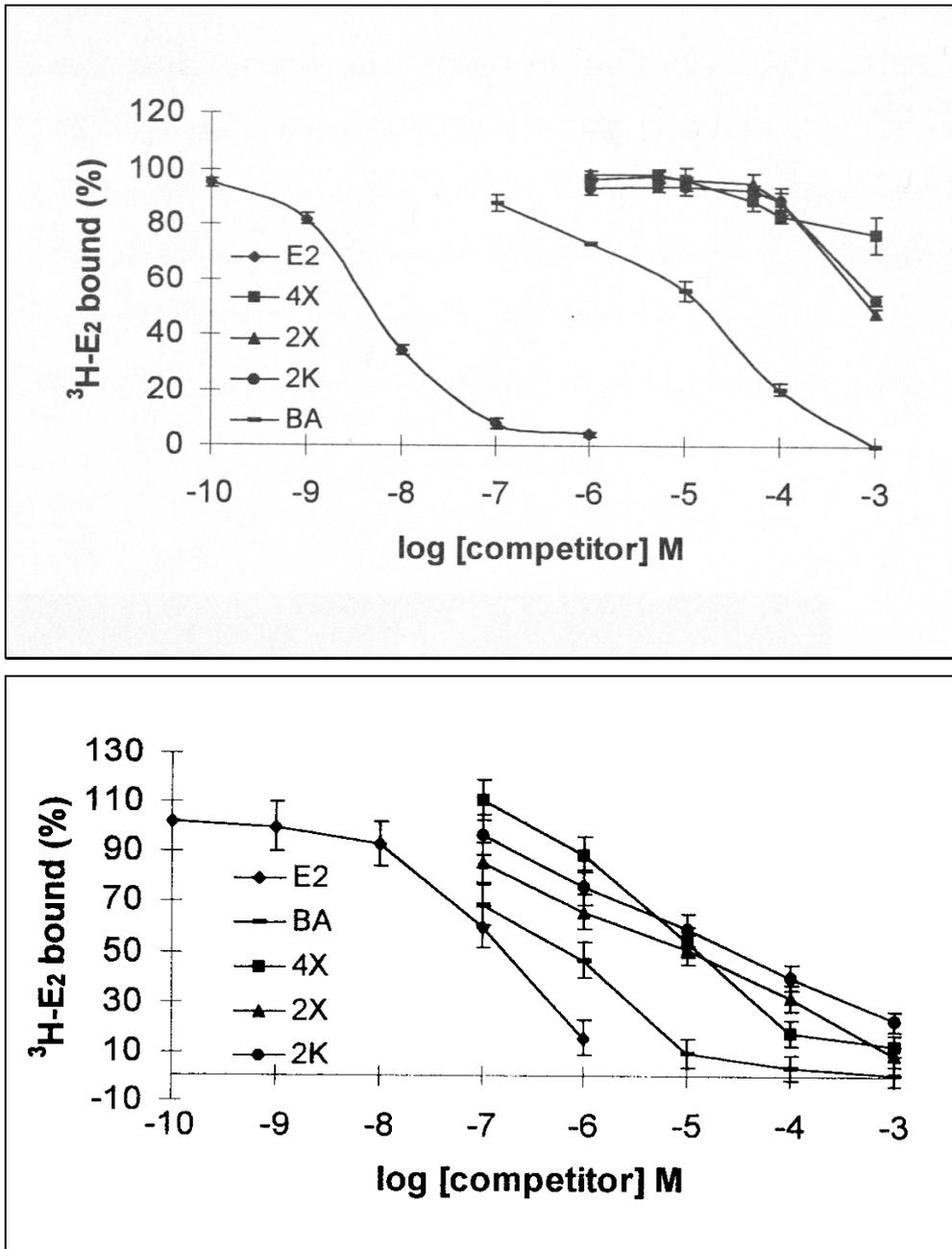


Abbildung 75 : Logarythmische Darstellung der kompetitiven Bindung von 4-Amino-MX (4X), 2-Amino-MX (2X), 2-Amino-MK (2K) Östradiol (E2) und Bisphenol A (BA). Oben: ER der Regenbogenforelle. Unten: ER des Krallenfrosches (Aus :[198])

In der Regenbogenforelle ermittelte die Autorin zwischen den untersuchten Moschusmetaboliten signifikante Unterschiede der Bindungsaffinitäten und damit auch einer potentiellen endokrinen Aktivität. Das höchste kompetitive Bindungspotential wurde hierbei mit einem IC₅₀ von $1,3 \pm 1,1$ mM für 2-Amino-MX erhalten. In diesem Konzentrationsbereich (1 mM) konnten jedoch für 4-Amino-MX und 2-Amino-MK bereits aufgrund der Überlagerung cytotoxischer Effekte keine IC₅₀ Werte mehr bestimmt werden. Die Autorin ermittelte jedoch eine prozentuale Hemmung der jeweils höchsten gemessenen Konzentration für 4-Amino-MX von $19,5 \pm 2,1$ % und für 2-Amino-MK bei $47,0 \pm 2$ %. Abbildung 75 zeigt die von Chou erhaltenen Dosis-Wirkungskurven im Vergleich zu den erzielten

Ergebnissen mit Östradiol und Bisphenol A, welche eine um einen Faktor von etwa 1000-10.000 höhere Affinität zum Rezeptor der Regenbogenforelle aufweisen.

Die Testergebnisse über die ER-Zellen des *Xenopus* stimmten im wesentlichen mit denen zur ER der Regenbogenforelle überein. Allerdings waren in dieser Untersuchung keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den IC₅₀-Werten der einzelnen Metabolite festzustellen. Alle drei Testsubstanzen waren in der Lage, ³H-E₂ aus den Bindungen zu verdrängen (zu konkurrieren). Betrachtet man die kompetitive Hemmung und Affinität von Östradiol zum ER des *Xenopus*, erscheint dieser etwa 100mal empfänglicher für E₂ als der ER der Regenbogenforelle. Da gleiches für die Bindungsaffinität bzw. Wechselwirkung allgemein organischer Xenoöstrogene gilt, eignet sich der *Xenopus Laevis* als amphibische Spezies möglicherweise sogar besser für die Erfassung potentieller Effekte organischer Xenobiotika.

Die jeweils stärkere kompetitive Eigenschaft der *ortho*-substituierten aromatischen Amine ging als ein Ergebnis aus der Studie mit Hilfe der Regenbogenforellen-Rezeptoren hervor. Möglicherweise ist dies durch eine höhere partielle Lipophilie durch die noch vorhandene Nitrogruppe in *para*-Position begründet, wodurch eine erhöhte Stabilität in der Rezeptorbindung gegeben sein kann. Die Bindungsfähigkeit der *para*-substituierten Verbindung ist generell noch vorhanden, erscheint jedoch wesentlich geringer. Es ist denkbar, daß aus der Umwandlung einer Nitrogruppe zur Aminofunktion eine erhöhte Bindungsaffinität zum Rezeptor resultiert. Es wurde zudem angenommen, daß die Rezeptorbindung von aromatischen Aminen ähnlich verläuft, wie sie für phenolische Ringsysteme angenommen wird. Anstead et al. konnten in Untersuchungen mit Brustkrebszellen für 2-Nitrophenol zeigen, daß die Reduktion zu 2-Amino-Phenol ebenfalls die Affinität zum Rezeptor erhöhte (MCF7-Zellen). Dennoch lagen die gemessene Bindungsaffinitäten für Östradiol im Vergleich noch etwa 12mal höher.^[199]

Betrachtet man zusammengefaßt die Konzentrationsbereiche, in denen die Aminometabolite geprüft wurden, in Relation zu realitätsnahen Konzentrationen der Metabolite in aquatischen Systemen, stellt sich unweigerlich die Frage, welche Relevanz die hier erzielten Ergebnisse für eine Risikobewertung haben. In Fließgewässern liegen die Gehalte der Nitromoschusmetabolite im ng/L Bereich. Innerhalb der Klärteichstudie wurden beispielsweise für die Nitromoschustransformationsprodukte 2-Amino-MK und 4-Amino-MX 11 bzw. 8 ng/L ermittelt. Diese Konzentrationen sind generell weit unterhalb der hier gemessenen Wirkkonzentrationen. Für eine Risikoeinschätzung sollte aber das Potential, allein einen Effekt auszulösen, von entscheidender Bedeutung sein. Aquatische Organismen wie Fische oder auch Amphibien sind diesen Stoffen gegenüber in den entsprechenden Gewässern chronisch exponiert. Hierfür gelten generell hohe Sicherheitsfaktoren, so daß eine chronische Toxizität bereits bei 100-10.000fach geringerem Gehalt auftreten kann. Damit kann letztendlich eine potentielle Gefährdung nicht vollständig ausgeschlossen werden.

5 Zusammenfassung

Sedimente stellen in allen Oberflächengewässern Senken für organisches Material dar. Gebundene Schadstoffe werden am Gewässerboden akkumuliert und bilden dadurch ein Gefährdungspotential insbesondere für Bodenlebewesen. Die an Schwebstoffe adsorbierten Schadstoffe erreichen in den Gewässern eine hohe Mobilität. Von Kleinstorganismen aufgenommen, kann über die Nahrungskette eine Akkumulation der Schadstoffe in jeder trophischen Stufe erfolgen. Die Gefährdung durch akkumulierte anthropogene Substanzen ist von vielen verschiedenen Faktoren abhängig, wobei die Bioverfügbarkeit der Stoffe für die einzelnen Organismen sicherlich eine wesentliche Rolle spielt. Die Zusammensetzung und Belastung von Gewässersedimenten ist vielfältig und komplex, da sich nicht nur anthropogene Stoffe ablagern sondern ebenso Produkte aus biogener Aktivität hohe Gehalte aufweisen.

Infolgedessen müssen analytische Methoden so konzipiert werden, daß organische Schadstoffe zunächst unter Ausnutzung von substanzspezifischen Verteilungsgleichgewichten angereichert werden. Daran müssen sich geeignete Aufreinigungs- und Fraktionierungsschritte anschließen, um eine weitgehende Abtrennung der interessierenden Xenobiotika von der Matrix und koeluvierenden Verbindungen zu erreichen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten analytischen Arbeiten der vorliegenden Studie gliedern sich folgendermaßen:

- (1) Methodische Arbeiten zur Erfassung eines möglichst vielfältigen Spektrums nicht-ionischer organischer Inhaltsstoffe in Sedimenten.
- (2) Quantitative Analysen von Zielverbindungen. Untersucht wurde Vorkommen und Verbleib der in Antifoulingfarbanstrichen verwendeten Biozide Irgarol 1051, TBT, TPT sowie der zinnorganischen Transformationsprodukte in Sedimenten ausgewählter Häfen der norddeutschen Ost- und Nordseeküste.
- (3) Mit Hilfe von GC-MS-Methoden wurde eine qualitative Bestandsaufnahme der organischen Inhaltsstoffe dreier Nordseesedimentproben vorgenommen. Ferner wurden diese Probenextrakte mit Hilfe unterschiedlich selektiver Detektionstechniken (ECD, AFID) untersucht, hierbei galt das Interesse vornehmlich stickstoff- und phosphorhaltigen Verbindungen.
- (4) Die erarbeitete Analysenmethode wurde mit biologisch-ökotoxikologischen Testverfahren kombiniert. Im Sinne einer Toxizitätsgeleiteten Analyse wurde eine Auswahl dreier mäßig belasteter Elbesedimente sowohl chemisch als auch bioanalytisch auf Schadstoffe, die eine akute aquatische Toxizität aufweisen, untersucht. Über spezifischere Biotests wurden die Probenextrakte auf Mutagenität und das Vorkommen endokrin wirksamer Substanzen hin überprüft.
- (5) Ein weiterer Teil der durchgeführten Arbeiten beschäftigte sich mit dem Vorkommen sowie der Anreicherung und Transformation synthetischer Moschusverbindungen in der Umwelt. Diese

Substanzklasse gelangt vornehmlich über die Kläranlagen in die Oberflächengewässer. Anhand einer Prozeßstudie innerhalb eines Schönungsteiches, welcher sich an eine kommunale Kläranlage anschließt, konnte das Schicksal der polycyclischen Moschusduftstoffe verfolgt und erweiterte Kenntnisse zu dieser Problematik unter Zuhilfenahme enantioselektiver Untersuchungsmethoden gewonnen werden.

- (6) Die Nitromoschus-Transformationsprodukte wurden für toxikologische Untersuchungen synthetisiert, wodurch ergänzende Daten für eine Riskoeinschätzung dieser Verbindungen im Hinblick auf eine potentielle Gefährdung von Mensch und Umwelt gewonnen werden konnten.

Anhand einer umfassenden qualitativen Bestandsaufnahme und sequentiellen Aufarbeitung einer Nordseesedimentprobe konnte belegt werden, daß die repräsentativ ausgewählten Zielverbindungen über die erarbeitete Methode vollständig erfaßt werden. Insgesamt wurde im entwicklungs-methodischen Abschnitt der vorliegenden Arbeit erkannt, daß für eine vollständige Erfassung sedimentgebundener Inhaltsstoffe eine sequentielle Extraktion über Lösungsmittel unterschiedlicher Polarität notwendig ist. Nach Vergleich verschiedener Extraktionsmittel erwies sich die Kombination Aceton und *n*-Hexan entsprechend den gestellten Anforderungen als am besten geeignet. Über verschiedene chromatographische Trennverfahren gelang es zum einen, makromolekulare Begleitstoffe von den sogenannten Analyten zu trennen, zum anderen erfolgte über eine semipräparative Kieselgelchromatographie eine Separation der Analyten in Substanzklassen mit steigender Polarität.

Für eine spezifische und sensitive Erfassung verschiedener Verbindungsgruppen wurden die Probenextrakte mit Hilfe unterschiedlicher Detektionstechniken vermessen. Die Nachweisempfindlichkeit der Methode ließ sich für chlororganische Substanzen bzw. Verbindungen mit elektronegativen Atomen durch den Einsatz eines ECD-Detektors deutlich erhöhen. Stickstoff- und phosphororganische Verbindungen wurden hingegen bei Verwendung des AFID-Detektors etwa 100 bis 1000mal empfindlicher als durch eine GC-MS-Analyse nachgewiesen, wodurch z.B. die Analyse des in Antifoulingfarbenstrichen enthaltenen Biozids Irgarol 1051 sehr erleichtert wurde. In die Hafengewässer werden hohe Gehalte des Biozids Irgarol 1051[®] über die Farbenstriche der Bootsrümpfe eingetragen. Irgarol stellt eine Alternative zu dem mittlerweile im Sportbootbereich (Bootslänge < 25 m) verbotenen zinnorganischen TBT dar. Ein Vergleich der vorgefundenen Irgarolkonzentrationen im Wasser mit Resultaten extern ermittelter toxikologischer Daten zeigte, daß in nahezu allen untersuchten Ostseehäfen die ermittelten Gehalte bereits Schädigungen aquatischer Pflanzen und Lebensgemeinschaften auszulösen vermögen. Die Belastungen sowohl im Wasser als auch im Sediment unterliegen saisonalen Schwankungen, den jahreszeitlich bedingten Einträgen durch die Spoorbootnutzung entsprechend. Mit einer Halbwertszeit von 201 Tagen in Seewasser gilt Irgarol im Gegensatz zu TBT oder auch TPT als weniger persistent, dennoch zeigen die zum Teil enormen Gehalte in Sedimenten, daß es ebenso zu einer Akkumulation kommt. Unter anaeroben Bedingungen ist zudem der Abbau nicht möglich. Parallel zur Untersuchung auf Irgarol wurden die Sedimente in der Sommerprobenahmeserie zusätzlich auf eine Belastung mit zinnorganischen Substanzen TBT, TPT sowie deren Transformationsprodukten vergleichend überprüft. Es konnte

hierfür festgestellt werden, daß auch 10 Jahre nach dem Bann der toxischen zinnorganischen Komponente für Farbanstriche von Sportbooten die TBT-Konzentrationen in den untersuchten Hafensedimenten kaum abgenommen haben. Immer noch liegen die Gehalte in Bereichen einiger 100 bis zu 17.000 ng/g TG. Berechnet man das Verhältnis im Vergleich zu Irgarol, wurden dementsprechend etwa 700mal höhere Gehalte an TBT im Sediment analysiert.

Neben der zielgerichteten Analyse von Hafensedimenten wurden auch nicht-zielgerichtete Untersuchungen von drei ausgewählten Nordseesedimenten mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden durchgeführt. Über die großen Fließgewässer Elbe, Rhein, Weser und Ems gelangt immer noch der größte Teil organischer Kontaminanten oder allgemein Schadstofffrachten in die Nordsee. Deshalb wurden zwei Proben aus dem Bereich des Elbe-Ästuars gewählt sowie eine Probe, die im Einflußbereich des Rheins und der Weser lag. Die Proben waren durch hohe Konzentrationen an aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen gekennzeichnet, wobei insbesondere sehr hohe Gehalte an alkylierten polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen detektiert wurden. Viele der identifizierten Sedimentinhaltsstoffe waren biogener Herkunft oder deren Transformationsprodukten zuzuordnen und spiegeln daher die natürliche Belastung und biologische Aktivität der Nordsee wider. Hierbei verdeutlichten hohe Gehalte an alkylierten Thiophenen, Thiazolen und stickstoffhaltigen Heterozyklen gleichermaßen auch den petrogenen Charakter der Sedimente. Besonders auffällig waren die hohen Gehalte an bromierten Verbindungen in der Nordseeprobe 3, die größten Signale in den polaren Fraktionen der GC-MS-Chromatogramme wurden durch Dibrom- und Bromindol erzeugt. Ferner wurde in allen Nordseesedimentproben Monobromphenol nachgewiesen. Häufig geht der Ursprung bromierter Verbindungen auf biogene Aktivität bzw. Rückstände zurück, so ist auch für das Auftreten der haloaromatischen Phenole anzunehmen, daß diese über eine Wurmspezies produziert und ins Sediment abgesondert werden. Neben den natürlicher Weise in Sedimenten vorkommenden Substanzen wurden auch anthropogene Komponenten erkannt. Identifiziert wurden u.a. unterschiedliche Isomere chlorierter Aniline und Nitroaromaten. Die am weitesten verbreiteten synthetischen Duftstoffe Tonalid[®] und Galaxolid[®] waren in zwei der drei Proben nachweisbar, ebenso eines der Transformationsprodukte, das HHCb-Lacton. In allen Sedimenten wurden die ubiquitär in Umweltproben meßbaren organischen Phosphorsäureester (TBP, TrBP, TCEP, TCPP) sowie verschiedene Phthalsäureester nachgewiesen. Ferner traten chlororganische Verbindungen in geringen Gehalten auf. Unterschiedlich stark chlorierte Biphenyle waren neben den Chlorbenzolen am höchsten konzentriert. Überdies wurden in einer Probe verschiedene HCH-Isomere sowie DDT, DDD, DDE, Dichlorbenzophenon und chlorierte PAH vorgefunden.

Insgesamt konnte aufgezeigt werden, daß sich die erarbeitete Analysemethode für eine breite nicht-zielgerichtete Erfassung organischer Inhaltsstoffe anwenden läßt. Während sich die herkömmlichen spezifischeren Analyseverfahren ausschließlich für die Erfassung einer Substanzklasse (z.B. chlororganische Pestizide, PAH) eignen und dadurch zumeist eine höhere Empfindlichkeit erreichen, konnte mit Hilfe von GC-MS-Methoden in den fraktionierten Extrakten unterschiedliche Verbindungsklassen parallel identifiziert werden. Es wurden überdies organische Verbindungen unterschiedlicher chemischer Struktur und Eigenschaften ausreichend empfindlich nachgewiesen.

In einem weiteren Teilabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde eine Kombination des chemischen Analyseverfahrens mit bioanalytischen Methoden im Sinne eines toxizitätsgeleiteten Screening angestrebt. Diese methodische Erweiterung sollte im Hinblick auf eine Erfassung des Qualitätszustandes eines Sedimentes erfolgen. Zu diesem Zweck wurden drei schwebstoffbürtige Elbsedimente extrahiert. Über ein abgestuftes Testverfahren wurden die Extrakte der wäßrigen Phase und des Restsedimentes durch Lösungsmittelwechsel zu DMSO für die toxikologischen Untersuchungen bereitgestellt. Jeder methodische Verfahrensschritt bildete hierbei eine Untersuchungsstufe, beginnend mit den Rohextrakten (Stufe I). Über die Abtrennung des elementaren Schwefels durch die Größenausschlußchromatographie (Stufe II) erfolgte abschließend ein toxikologisches und chemisches Screening der Fraktionen, die über Kieselgelchromatographie erhalten wurden (Stufe III). Eine chemische Analyse der organischen Extraktinhaltsstoffe über GC-MS und GC-AFID erfolgte jeweils parallel in einem Aliquot der Probenextrakte. Es fand eine Prüfung auf akute aquatische Toxizität über den Leuchtbakterientest statt sowie die Analyse über spezifischere Testsysteme auf eine mutagene und endokrine Wirkung (Ara-Test, MCF7-Luc-Reporter-Gen-Assay). Alle drei untersuchten Proben erwiesen sich als toxisch, wobei jeweils unterschiedliche Wirkungen analysiert wurden. Die chemische Analyse der jeweiligen Fraktionen, die einen Effekt auslösten, ergab im Hinblick auf potentiell mutagene Verbindungen nur einzelne Hinweise, wobei vor allem das Augenmerk auf nitroaromatische Komponenten gerichtet wurde. Toxische Wirkungen wurden im wesentlichen für die zwei sehr unterschiedlichen Fraktionen 3 und 5 erhalten. Die Zusammensetzung der Fraktion drei war sehr komplex, hier wurden Verbindungen unterschiedlichster Polarität und chemischer Struktur identifiziert (von DDT bis Chlornitrobenzol), während in der fünften Fraktion bereits ausschließlich polare Verbindungen enthalten waren, unter anderem vermutlich mutagene Nitroverbindungen. Ferner erfolgte eine sequentielle Untersuchung eines Probenextraktes auf eine hormonelle Wirkung. Hier wurde ebenfalls einzig eine potentielle Aktivität für die Fraktionen 3 und 5 gemessen. In Fraktion drei des entsprechenden Elbe-Schwebstoff-Extraktes wurden eine Reihe höher kondensierter aromatischer Kohlenwasserstoffe, Furane sowie sauerstoff- und schwefelhaltige PAH identifiziert, denen allgemein bereits durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zu hormonell aktiven Verbindungen ein endokrines Potential zugeschrieben wird. In Fraktion 5 war der beobachtete Effekt möglicherweise auf das Auftreten von phenolischen Verbindungen u.a. auch Alkylphenolen sowie einer Reihe an hochmolekularen Sterolen, die aufgrund ihrer komplexen Struktur nicht eindeutig identifiziert werden konnten, zurückzuführen.

Der letzte Abschnitt der vorliegenden Arbeit befaßte sich mit Untersuchungen zur abiotischen und biotischen Transformation von polycyclischen Moschusduftstoffen. Die Verbindungen werden ubiquitär in Umweltproben vorgefunden und zeichnen sich vor allem durch ein hohes Bioakkumulationspotential aus. Anhand einer Prozeßstudie, durchgeführt bereits im Jahre 1997 im Schönungsteich des Klärwerks Neumünster, wurden speziell das Anreicherungsverhalten und stereoselektive Prozesse eines Galaxolid®-Metaboliten (HHCB-Lacton) im Vergleich zur Muttersubstanz studiert. Es wurden Probenextrakte verschiedener Fischarten aus dem Schönungsteich u.a. auch über enantioselektive GC untersucht. Ein Metabolit des HHCB, das HHCB-Lacton, wird oxidativ in der Umwelt gebildet und ist relativ stabil, so daß neben der Transformation auch eine Anreicherung der Verbindung in Organismen zu beobachten war (passive Akkumulation in SPMD). Aus den experimentell im Wasser

und in Fischen bestimmten Konzentrationen wurden sowohl für Galaxolid[®] als auch für das Lacton Bioakkumulationsfaktoren (BAF) berechnet, die jeweils auf das Frischgewicht (BAF_{FG}) und den Lipidgehalt (BAF_L) bezogen wurden. In allen Fällen wurden für das Lacton deutlich höhere BAF als für Galaxolid[®] gefunden, obwohl der experimentell bestimmte log K_{OW} des Lactons mit 4,0 deutlich unter dem des Galaxolids[®] liegt. Lediglich für SPMD wurde ein kleinerer Faktor für das Lacton ermittelt. Die vorgefundenen Bioakkumulationsfaktoren für Galaxolid[®] ließen sich größtenteils durch passive Biokonzentration allein erklären, hingegen überstiegen die höchsten vorgefundenen Lactonkonzentrationen die durch passive Biokonzentration zu erwartenden Werte. Die erhaltenen Resultate bestärken insgesamt die Annahme eines enzymatischen Abbaus des HHCB im Fisch zum HHCB-Lacton. Sowohl für die Muttersubstanz als auch für den Metaboliten, konnten speziesabhängige Unterschiede in der fettbezogenen Konzentration und den Enantiomerenverhältnissen beobachtet werden. Möglicherweise sind unterschiedliche und vor allem artspezifische Abbauwege für Galaxolid[®] und HHCB-Lacton in Fischen gegeben, wobei einige Fischarten sehr selektive Abbauwege aufweisen und für andere anscheinend eine nichtselektive Biotransformation bevorzugt ist.

Die polaren Transformationsprodukte der Nitromoschusverbindungen sind mittlerweile ebenso ubiquitär in der Umwelt vorzufinden wie ihre Mutterverbindungen. Sie wurden in Wasser, Biota, Sediment und Klärschlamm nachgewiesen. Über ihre toxikologischen Wirkungen ist bislang nur wenig bekannt bzw. untersucht worden. Daher erschien es sinnvoll, Moschus-xylol-amin und Moschusketon-amin zu synthetisieren und toxikologisch arbeitenden Gruppen zur Verfügung zu stellen. Die Metabolite wurden jeweils auf mutagene als auch auf endokrine Wirkung hin untersucht.

6 Summary

The aim of the present work was to perform chemical analyses of North Sea sediments in order to enhance the knowledge about their impact by xenobiotics. Because of the complexity of the investigated samples various analytical approaches were involved:

- ❑ In the first part, a method for sediment analysis of organic micropollutants was developed. For this purpose, different chromatographic techniques were used and specific gas chromatographic detection modes were tested in order to get hold of a wide variety of non-ionic organic substances.
- ❑ Quantitative analysis of the following target compounds was performed: Irgarol 1051[®], TBT, TPT (contained in antifouling paints) as well as tinorganic transformation products were analysed in harbour sediments of the North and Baltic Sea. The study included a seasonal dependent screening of Irgarol in water and sediment samples. The concentration of Irgarol in water samples of the investigated Baltic Sea harbours attained levels of moderate acute toxicity for algae communities. A seasonal dependency due to sailing activity with highest levels of Irgarol in the early summer months was also observed.
- ❑ Using GC-MS methods three sediment samples of the German Bight were analysed qualitatively in a non-target-screening approach. In the extracts of the sediment samples different classes of compounds from biogenic and anthropogenic origin were identified. High contents of bromo-

indoles and -phenols, alkylbenzenes, polycyclic aromatic hydrocarbons were determined. Furthermore, persistent organic pollutants such as chlorobenzenes, DDT and its metabolites, chloronitroaromatics, chloroanilines as well as phosphororganic substances and synthetic musk compounds were identified. In addition, these extracts were investigated using other detection methods (ECD, AFID). The main focus was laid on N and P containing compounds.

- In a next step, the newly developed analytical method was combined with biological-ecotoxicological test methods. Following the idea of a bioassay directed analysis, 3 medium contaminated sediments of the river Elbe were analysed. Acute toxicity, mutagenicity as well as endocrine disrupting properties were the toxicological endpoints of the tests used in the present work. The main toxic effects were located in only two fractions obtained by fractionation of sediment extracts over silica columns. The concentration levels of the main identified compounds are probably not responsible for the observed mutagenic effects. For some substances, which were analysed in the corresponding fractions, mutagenic or endocrine activity is well known. Nevertheless, other unidentified substances could also contribute to the toxic effects.

- Another part of this study dealt with the occurrence, bioaccumulation and transformation of synthetic musks in the aquatic environment. They enter the surface water mainly through waste water treatment plants. In a process study different kinds of samples were collected in a pond affiliated to the treatment plant, including water, SPMD, mussel, and various fish samples. Emphasis was placed upon metabolisation processes of polycyclic musks in different fish species. The measured concentrations were normalised to lipid content, and therefore, a species dependency of concentrations was attained. Furthermore, highest deviations of enantiomeric ratios of the investigated polycyclic musks were obtained by application of enantioselective gas chromatography, especially for HHCB and its transformation product, HHCB-Lacton.

- In order to provide additional data for a risk assessment of nitromusks, the transformation products of musk xylene and musk ketone were synthesised thus enabling toxicological investigations with these metabolites. In the present work, results of mutagenicity and endocrine disrupting testing are for the first time presented for 2-Amino-MX, 4-Amino-MX, and 2-Amino-MK.

7 Experimenteller Teil

7.1 Verwendete Geräte

Für die gaschromatographischen Analysen wurden folgende Geräte der Firma Carlo Erba verwendet:

GC 6000 Vega 2

Trägergas: Helium 5.0, 140 kPa
Säule: NB 54 der Firma HNU-Nordion
Länge: 25 m
Durchmesser: 0,32 mm
Filmdicke: 0,25 µm
Injektion: On-Column, Injiziertes Probenvolumen: 2 - 10 µL
Detektor: ECD
Temperaturprogramm: 343 K (70°C) ->10 K/min ->533K (260 °C)

GC 8185

Trägergas: Helium 5.0, 140 kPa
Säule: SPB 608 Supelco
Länge: ca. 20 m
Filmdicke: 0,25 µm
Durchmesser: 0,25 mm
Injektion: On-Column
Injiziertes Probenvolumen: 2 - 10 µL
Detektor: AFID
Basistemperatur 553 K (280 °C)
Detektorgase: Luft: 140 kPa (Fa.Linde)
Wasserstoff : 90 kPa
Make-up-Gas: Helium(5.0) 85 kPa
Temperaturprogramm: 343 K (70 °C) ->6 K/min ->533K (260 °C)

GC 8000

Trägergas: Helium 5.0, 140 kPa
Säule: NB 54 der Firma HNU-Nordion
Länge: ca. 25 m
Filmdicke: 0,25 µm
Durchmesser: 0,25 mm
Injektion: Split/Splitless
Injiziertes Probenvolumen: 2 µL
Detektor: AFID NP-Modus/ENS-Modus
Basistemperatur 553 K (280°C)
Detektorgase: Luft: 140 kPa (Fa.Linde)
Wasserstoff: 90 kPa
Make-up-Gas: Helium (5.0) 85 kPa
Temperaturprogramm: 343 K (70°C) ->10 K/min ->533K (260 °C)

Integrator:

ChromStar, Bruker-Franzen Analytik; Vers. 3.10

Massenspektrometer (Magnum ITD, Finnegan MAT, Bremen)

EI	70 eV
Scan:	100-550 amu
Emissionstrom:	10 μ A
Manifold:	508 K (235 °C)
Multipliiert:	2000-2700 V
GC:	Varian 3400; Split-Injektor (60 s splitless, 523 K)
Trärgas:	Helium, Vordruck 70 kPa
Säule:	DB 5 MS (J+W) Länge: 30 m Durchmesser: 0,25 mm Filmdicke: 0,25 μ m
Temperaturprogramm:	333 K [3 min] \rightarrow (6 K/min) \rightarrow 533 K [20 min]

GPC:

Säule:	Polygel der Fa. Polymer Laboratories, Amherst, MA, USA Porengröße: 5 nm Partikelgröße: 5 μ m Länge: 300 x 7,5 mm gefüllt mit Polygel (Fa. Polymer Laboratories, Amherst, MA, USA)
HPLC-Pumpe:	L 6200 (Merck-Hitachi, Darmstadt)
HPLC-UV Detektor:	L 4000, Deuterium Lampe (Merck-Hitachi, Darmstadt)

HPLC:

HPLC-System:	Gynkotek, Germering, Deutschland
Probengeber:	Gina 50
Gradientpumpe:	Modell 480
Kolonnenhermostat:	STH 585
Detektor:	UVD 340S
Säule:	8 x 250 mm der Fa. Macherey & Nagel, Düren, Deutschland
Stationäre Phase:	PerMe- β -cyclodextrin monofunktionalisiert (Mono[6-O-(aminohexyl)-2,3-di-O-methyl]hexakis(2,3,6-tri-O-methyl)cyclomalto-heptaose an Aminopropyl-Kieselgel

7.2 Photochemische Umsetzung der Stereosiomere des HHCB zu den reinen Enantiomeren des HHCB-Lactons:

Vor der Umsetzung der reinen Enantiomere des HHCB wurde zunächst ein UV-Spektrum des racemischen HHCB-Lactons aufgenommen, um das Absorptionsmaximum zu ermitteln. Gemäß der chemischen Struktur wurde für das HHCB-Lacton eine maximale Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (Abs. insgesamt von 210-320 nm) erhalten. Die Lösungen der reinen Enantiomere des HHCB wurden in einer sauerstoffhaltigen *iso*-Octan-Lösung bei einer Wellenlänge von 300 nm bestrahlt, anschließend wurden die Proben über eine Kieselgelsäule aufgereinigt und die Isomere des Lactons als Hauptprodukte isoliert.

7.3 Darstellung von 2-Amino-MK

In einem 100 mL-Zweihalskolben, versehen mit Rückflußkühler und Thermometer, wurden zu 10 g (0,034 mol) MK, gelöst in 16 mL Ethanol, 4,1 mL (0,085 mol) Hydrazinhydrat (85 %) gegeben. Die Lösung wurde auf 303 K (30 °C) erhitzt und eine alkoholische Suspension von Raney-Nickel in kleinen Portionen zugegeben. Der Reaktionsverlauf wurde anhand der Stickstoffentwicklung verfolgt. Nach dem Ende der Gasentwicklung wurde 1 h unter Rückfluß erhitzt. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Produkt durch mehrfaches Umkristallisieren und anschließende Säulenchromatographie gereinigt.

Ausbeute: 13 % Reinheitsgrad (GC-ECD-Messung): 96 %

7.4 Darstellung von 2-Amino-MX und 4-Amino-MX

In einem 50 mL Rundkolben, mit einem Septum verschlossen, wurden 327 mg MX und 630,7 g Pd-Katalysator, an Aktivkohle gebunden (10 %), in 5 mL absolutem Ethanol aufgenommen. Die Lösung wurde auf 30 °C (303 K) erwärmt, und anschließend wurde ein H₂-Strom durch das Septum der Lösung zugeführt. Nach Zugabe des Wasserstoffs wurde die Suspension weitere 30 min gerührt, danach wurden die Reaktionsprodukte vom Katalysator abfiltriert und der Ethanol aus dem Filtrat am Rotationsverdampfer abdestilliert. Die Reaktionsprodukte (2- und 4-Amino-MX) wurden über Silica-Chromatographie isoliert und durch Umkristallisieren zusätzlich gereinigt.

Ausbeute: 24 % 2-Amino-MX: 16,8 % Reinheit (ECD): 98 %
 76 % 4-Amino-MX: 53,2 % Reinheit (ECD): 99 %

7.5 Verwendete Chemikalien

Tabelle 58: Verwendete Chemikalien unter Angabe der CAS-Nr., des Herstellers sowie der Gefahrensymbole

Substanz	Hersteller	Gefahrensymbol	CAS-Nr.
Lösungsmittel:			
Aceton z.R.	Merck, Darmstadt	F	[67-64-1]
Cyclohexan z.R.	Merck, Darmstadt	F	[110-82-7]
Ethylacetat z.R.	Merck, Darmstadt	F	[141-78-6]
Dichlormethan z.R.	Merck, Darmstadt	Xn, F	[1665-00-5]
iso-Octan z.R.	Merck, Darmstadt	F	[540-84-1]
n-Hexan z.R.	Merck, Darmstadt	Xn, F	[110-54-3]
Toluol z.R.	Merck, Darmstadt	Xn, F	[108-88-3]
DMSO p.a.	Merck, Darmstadt	Xi	[67-68-5]
Methanol z.R./ Lichrosolv	Merck, Darmstadt	T, F	[67-56-1]
Standardsubstanzen:			
Anilazin	Promochem, Wesel	Xn	[101-05-3]
Atraton	Promochem, Wesel	Xn	[1610-17-9]
Atrazin	Promochem, Wesel	Xn	[1912-24-9]
Cycloat	Promochem, Wesel	Xn	[1134-23-2]
Desethylatrazin	Promochem, Wesel	Xn	[1007-28-9]
Desethylterbutylazin	Promochem, Wesel	Xn	[30125-63-4]
Desisopropylatrazin	Promochem, Wesel	Xn	[1007-28-9]
Dinoseb	Promochem, Wesel	T	[88-85-7]
Irgarol 1051	Hempel, Pinneberg	Xn	[28159-98-0]
Linuron	Promochem, Wesel	Xn	[330-55-2]

Fortsetzung Tabelle 58:

Substanz	Hersteller	Gefahrensymbol	CAS-Nr.
Parathion-methyl	Promochem, Wesel	T	[298-00-0]
Pendimethalin	Promochem, Wesel	T	[40487-42-1]
Pirimicarb	Promochem, Wesel	T	[23103-98-2]
Prometryn	Promochem, Wesel	Xn	[7287-19-6]
Propazin	Promochem, Wesel	Xn	[139-40-2]
Propham	Promochem, Wesel	Xn	[112-42-9]
Propoxur	Promochem, Wesel	T	[114-26-1]
Secbumeton	Promochem, Wesel	Xn	[26259-45-0]
Simazin	Promochem, Wesel	Xn	[12234-9]
Terbutryn	Promochem, Wesel	Xn	[886-50-0]
Terbutylazin	Promochem, Wesel	Xn	[5915-41-3]
Tri- <i>n</i> -butylphosphat	Fluka, Neu Ulm	Xn	[126-73-8]
Tri- <i>iso</i> -butylphosphat	Fluka, Neu Ulm	-	[126-71-6]
Triphenylphosphat	Aldrich, Steinheim	Xn	[115-86-6]
O,O,O-Trimethyl- thiophosphat	Bayer, Leverkusen	T	[152-18-1]
O,O,S-Trimethyldi- thiophosphat	Bayer, Leverkusen	T ⁺	[2953-29-9]
2-Chloranilin	Merck, Darmstadt	T	[95-51-2]
3-Chloranilin	Merck, Darmstadt	-	[121-30-2]
4-Chloranilin	Merck, Darmstadt	T	[10647-8]
2,3-Dichloranilin	Merck, Darmstadt	T	[608-27-5]
2,4-Dichloranilin	Merck, Darmstadt	T	[554-00-7]
2,5-Dichloranilin	Merck, Darmstadt	T	[95-82-9]
2,6-Dichloranilin	Merck, Darmstadt	T	[608-31-1]
3,4-Dichloranilin	Merck, Darmstadt	T	[95-76-1]
2-Chlor-4-nitroanilin	Merck, Darmstadt	T ⁺	[121-87-9]
4-Chlor-2-nitroanilin	Merck, Darmstadt	T ⁺	[89-63-4]
5-Chlor-2-nitroanilin	Merck, Darmstadt	T ⁺	[1635-61-6]
2,6-Dichlor-4-nitroanilin	Merck, Darmstadt	Xn	[99-30-9]
Nitrobenzol	Merck, Darmstadt	T ⁺	[98-95-3]
2-Nitrotoluol	Merck, Darmstadt	T	[88-72-2]
3-Nitrotoluol	Merck, Darmstadt	T	[99-08-1]
4-Nitrotoluol	Merck, Darmstadt	T	[99-99-0]
1-Chlor-2-nitrobenzol	Merck, Darmstadt	T	[88-73-3]
1-Chlor-3-nitrobenzol	Merck, Darmstadt	T	[121-73-3]
1-Chlor-4-nitrobenzol	Merck, Darmstadt	T	[100-00-5]
1-Brom-2-nitrobenzol	Merck, Darmstadt	-	[577-19-5]
1,4-Dichlor-2-nitrobenzol	Merck, Darmstadt	Xn	[89-61-2]
1,2-Dichlor-4-nitrobenzol	Merck, Darmstadt	Xn	[99-54-7]
Moschus-Xylol			[81-15-2]
Moschus-Keton			[81-14-1]
Moschus-Xylol-2-Amin			[107342-67-2]
Moschus-Xylol-4-Amin			[107342-55-2]

7.6 Reinstwasseranlage

Für die Versuche zur Ermittlung der WFR sowie zum Vorspülen der Glasgeräte wurde entionisiertes und in bezug auf organische Spurenstoffe gereinigtes Wasser verwendet. Es wurde eine Reinstwasseranlage Seral-Pur 90 C, der Firma Seral, Ransbach, genutzt.

7.7 Verbleib der Chemikalien

Die zur Reinigung der Glasgeräte verwendeten Lösungsmittel Aceton und *n*-Hexan wurden getrennt gesammelt. Die ausschließlich für analytische Zwecke genutzten Glasgeräte führen zu einer geringen Kontamination der Lösungsmittel, wobei die Reinheit meist höher als die technische Qualität ist. Daher eigneten sich die Lösungsmittel noch gut für synthetische Zwecke und wurden anderen Arbeitsgruppen zur Weiterverwendung überlassen. Stärker verunreinigte Reste sowie anfallendes Cyclohexan, Ethylacetat und Toluol wurden der nichthalogenierten Lösungsmittelverbrennung zugeführt. Dichlormethan und Standardlösungen mit chlororganischen Verbindungen im Bereich $\mu\text{g/mL}$ wurden als halogenierte Lösungsmittel der Entsorgung zugeführt.

Kontaminierte Betriebsmittel sowie verunreinigtes Aluminiumoxid und Silicagel wurden getrennt als solches gesammelt und der „Entsorgungsstelle der Universität“ übergeben.

8 Literaturverzeichnis

- ¹ M. Zeeman, C.M. Auer, R.G. Clements, J.V. Nabholz, R.S. Boethling: US. EPA regulatory perspectives on the use of QSAR for new and existing chemical evaluations, *SAR & QSAR in Environ. Res.* **1995**, 3 (3), 179-184.
- ² Bioaccumulation - New Aspects and Developments. In: The Handbook of Environmental Chemistry. *Springer Verlag*, Berlin, Heidelberg, New York, **2000**
- ³ J. Kukkonen, P. Landrum: Distribution of organic carbon and organic xenobiotics among different particle size fractions in sediments, *Chemosphere* **1996**, 32 (6), 1063-1076.
- ⁴ B. Oepen, W. Kördel, W. Klein: Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes measurements and experience with the applicability of the modified OECD-Guideline 106, *Chemosphere* **1991**, 22 (3-4), 2285-2304.
- ⁵ J.P. Knezovich, L. Harrison, R.G. Wilhelm: The bioavailability of sediment-sorbed organic chemicals: A review, *Water, Air, and Soil Pollution* **1987**, 32, 233-245.
- ⁶ S.W. Karickhoff, D.S. Brown, T.A. Scott: Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Wat. Res.* **1979**, 13, 241-248.
- ⁷ C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding: Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water, *Environ. Sci. Technol.* **1983**, 17, 227-231.
- ⁸ M. Kolb, M. Bahadir: Analyse schwerflüchtiger organischer Schadstoffe in Sedimenten. In: Analytiker-Taschenbuch, *Springer Verlag*, Berlin, Heidelberg, New York, **1995**, Bd 13, 143-176.
- ⁹ Technical guidance documents in support of the Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and the Commission Regulation 1488/94 on risk assessment for existing substances.
- ¹⁰ M. Zimmer, W. Ahlf: Erarbeitung von Kriterien zur Ableitung von Qualitätszielen für Sedimente und Schwebstoffe: *UBA Texte* **1994**, (69/94).
- ¹¹ D.M. Di Toro: A review of the data supporting the equilibrium partitioning approach to establishing sediment quality criteria. **1989** In: *National research Council (eds.): Contaminated marine sediments - assessment and remediation. National Academy Press, Washington, DC.* 100-114.
- ¹² W.J. Adams, R.A. Kimrele, J.W. Barnett, JR: Sediment quality and aquatic life assessment. *Environ. Sci. Technol.* **1992**, 26 (10), 1864-1875.
- ¹³ D.M. Di Toro, J.D. Mahoney, D.J. Hansen, K.J. Scott, A.R. Carlson, T.G. Ankley: Acid volatile sulfide predicts the acute toxicity of cadmium and nickel in sediments. **1992**, *Environ. Sci. Technol.* 26, 96-101.
- ¹⁴ P.M. Chapman: Acid volatile sulfides, equilibrium partitioning, and hazardous waste site sediments, *Environ. Management*, **1997**, 21, 197-201.

- ¹⁵ P.M. Chapman: Sediment quality triad approach, U.S. EPA: *Sediment classification methods compendium*, EPA 823-R-92-006, Washington, DC.
- ¹⁶ K. van de Guchte, **1993** : The sediment quality triad: an integrated approach to assess contaminated sediments. – *Proceedings, international Conference on river water quality-ecological assessment and control*. December 16-18, 1991, Brüssel .
- ¹⁷ G.G. Rimkus, R. Gatermann, H. Hühnerfuss: Musk xylene and musk ketone amino metabolites in the aquatic environment. *Toxicol. Lett.* **1999**, *111*, 5-15.
- ¹⁸ G.G. Rimkus, H. Brunn: Synthetische Moschusduftstoffe - Anwendung, Anreicherung in der Umwelt und Toxikologie - Teil 1: Herstellung, Anwendung, Vorkommen in Lebensmitteln, Aufnahme durch den Menschen, *Ernährungs-Umschau* **1996**, *43* (12), 442-448.
- ¹⁹ R. Gatermann, H. Hühnerfuss, G. Rimkus, A. Attar, A. Kettrup: Occurrence of musk xylene and musk ketone metabolites in the aquatic environment, *Chemosphere* **1998**, *36*, 2535-2547.
- ²⁰ G.G. Rimkus: Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment. *Toxicol. Lett.* **1999**, *111*, 37-56.
- ²¹ H.D. Eschke, J. Traud, H. J. Dibowski: Studies on the occurrence of polycyclic musk flavours in different environmental compartments. 1st communication: Detection and analysis by GC/MS chromatograms in surface and sewage waters and fish. *UWSF Z. Umweltchem Ökotox.* **1994** (4), 183-189.
- ²² F. Balk, R. A. Ford: Environmental risk assessment for the polycyclic musks AHTN and HHCB in the EU-I. Fate and exposure assessment. *Toxicol. Lett.* **1999**, *111*, 57-79.
- ²³ G.G. Rimkus: Synthetische Moschusverbindungen in der Umwelt. *Umweltmed. Forsch. Prax.* **1998**, *3* (6), 341-346.
- ²⁴ R. Kallenborn, R. Gatermann, S. Planting, G.G. Rimkus, M. Lund, M. Schlabach, I.C. Burkow: Gas chromatographic determination of synthetic musk compounds in Norwegian air samples, *J.Chromatogr. A* **1999**, *846*, 295-306.
- ²⁵ J.W. Tas, F. Balk, R.A. Ford, E.J. van de Plasche: Environmental risk assessment of musk ketone and musk xylene in the Netherlands in accordance with the EU-TGD, *Chemosphere* **1997**, *35*, 2973-3002.
- ²⁶ F. Balk, R. A. Ford: Environmental risk assessment for the polycyclic musks, AHTN and HHCB - II. Effect assessment and risk characterisation. *Toxicol. Lett.* **1999**, *111*, 81-94.
- ²⁷ A. Maekawa, Y. Matsushima, H. Onodera, M. Shibusani, H. Ogasawara, Y. Kodama, Y. Kurokawa, Y. Hayashi: Long-term toxicity/carcinogenicity of musk xylene in B6C3F₁ mice, *Fd. Chem. Toxic.* **1990**, *28*, 581-586.
- ²⁸ V. Mersch-Sundermann, A. Reinhardt, M. Emig: Examination of mutagenicity, genotoxicity, and cogenotoxicity of nitro musks in the environment, *Zbl. Hyg.* **1996**, *198*, 429-442.

- ²⁹ A. Behechti, K.W. Schramm, A. Attar, J. Niederfellner, A. Kettrup: Acute toxicities of four musk xylene derivatives on *daphnia magna*. *Wat. Res.* **1998**, 32, 1704-1707.
- ³⁰ G. Frater, U. Müller, J.A. Bajgarowicz, M. Petrzilka: Musky and odorless diastereomers of Galaxolide. In: Flavours, Fragrances and essential Oils. *Proceedings of the 13th International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils*. Istanbul, Turkey, 15-19 October **1995** Vol. 3.
- ³¹ W.C. Agosta: Dialog der Düfte: Chemische Kommunikation, In: *Spektrum Akademischer Verlag*, New York **1992**.
- ³² T. Ellerichmann, Å. Bergmann, S. Franke, H. Hühnerfuss, E. Jakobsson, W.A. König, C. Larsson: Gas chromatographic enantiomer separation of chiral PCB methyl sulfons and identification of selectively retained enantiomers in human liver. *Fresenius Environ. Bull.* **1998**, 7, 244-257.
- ³³ C. Larsson, T. Ellerichmann, S. Franke, M. Athanasiadu, H. Hühnerfuss Å. Bergman: Enantiomeric separation of chiral methylsulphonyl PCB congeners in liver and adipose tissue from rats dosed with A50. *Organohal. Compounds* **1999**, 40, 427-430
- ³⁴ S. Biselli: Untersuchung zur gaschromatographischen Analyse von stickstoff- und phosphorhaltigen Verbindungen in Sedimenten, Diplomarbeit, Universität Hamburg **1997**
- ³⁵ J. Schwarzbauer: Screening, Identifizierung und quantitative Analyse organischer Substanzen in Sediment und Schwebstoff des Elbesystems, Dissertation, Universität Hamburg, **1997**
- ³⁶ R. Holzhauser: Clean-up XL - Möglichkeiten der modernen Rückstandsanalytik- *Anwendungsbericht Nr. 253*; ABIMED
- ³⁷ P. Fernandez, M. Grifoll, A.M. Solanas, J.M. Bayona, J. Albaiges: Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments, *Environ. Sci. Technol.* **1992**, 26, 817-829.
- ³⁸ P. Fernandez, C. Porte, D. Barceló, J.M. Bayona and J. Albaigés: Selective enrichment procedures for the determination of polychlorinated biphenyls and polycyclic hydrocarbons in environmental samples by Gel-Permeation-Chromatography, *J. Chromatogr.* **1988**, 456, 155-164.
- ³⁹ D. Puig, D. Barceló: Comparative study of various size exclusion chromatographic columns for the clean-up of selected pesticides in soil samples, *J. Chromatogr. A* **1994**, 673, 55-64.
- ⁴⁰ G.G. Rimkus, M. Rummeler: PCB/Toxaphene group separation by HP-GPC and HPLC prior to congener specific analysis of Toxaphene. *Organohal. Compounds* **1999**
- ⁴¹ W. Specht, M. Tillkes: Gaschromatographische Bestimmung von Pflanzenschutzmitteln nach Clean-up über Gelchromatographie und Mini-Kieselgelsäulenchromatographie, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1985**, 322, 443-455.
- ⁴² W. Brack, R. Altenburger, U. Eschenbach, M. Möder, H. Segner, G. Schürmann: Bioassay directed identification of organic toxicants in river sediment in the industrial region of Bitterfeld

- (Germany) - A contribution to hazard Assessment. **1999** *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **37**, 164-174.
- ⁴³ H.-J. Hübschmann: Handbuch der GC-MS, *VCH-Verlag*, Weinheim, **1996**
- ⁴⁴ K. Olah, A. Szoke, Z. Vajta: On the mechanism of Kolb's N-P selective detector, *J. Chromatogr. Sci.*, **1979**, **17**, 497-502.
- ⁴⁵ D.D. Bombick, J. Allison: Investigations into the response mechanism of the gas chromatographic thermoionic ionisation detector, **1989** *J. Chromatogr. Sci.*, **27**, 612-619.
- ⁴⁶ M.P. Yurawecz, B.J. Puma: Nitro musks fragrances as potential contaminants in pesticides residue analysis, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1983**, **66**, 241-247.
- ⁴⁷ K.S. Helbing, P. Schmid, C. Schlatter: The trace analyses of musk xylene in biological samples: problems associated with its ubiquitous occurrence, *Chemosphere* **1994**, **29**, 477-484.
- ⁴⁸ H. Hühnerfuss, W. Giger, H. Schröder: ALOSON Abschlußbericht zum F+E-Vorhaben Nr 29625609, Universität Hamburg **1999**
- ⁴⁹ R. Gatermann: Verteilung, Anreicherung und Transformation nitroaromatischer und polycyclischer Moschusduftstoffe sowie weiterer N- und P-haltiger Problemstoffe in der Umwelt, Dissertation, Hamburg **1998**
- ⁵⁰ H. Parlar, D. Angerhöfer: Chemische Ökotoxikologie, *Springer Verlag*, Heidelberg, Berlin, New York **1994**.
- ⁵¹ M.A. Champ: The need for the formation of an independent, international marine coating boards: *Mar. Pollut. Bull.* **1999**, **38**, (4), 239-246.
- ⁵² B. Dahl: On the ecotoxicology of antifouling agents. The use of marine microalgal communities in predictive and retrospective assessments, *Ph.D. Thesis*, Göteborg University, **1996**, Schweden
- ⁵³ Rogers, H.R., Watts, C.D. and Johnson, I.: Comparative predictions of Irgarol 1051 and atrazine fate and toxicity, *Environ. Sci. Technol.* **1996**, **17**, 553-556.
- ⁵⁴ K. Bester: Über Eintrag, Verbleib und Auswirkungen von stickstoff- und phosphorhaltigen Schadstoffen in der Nordsee, Dissertation, Hamburg, **1995**
- ⁵⁵ A. Scarlett, M.E. Donkin, T.W. Fileman, P. Donkin: Occurrence of the marine antifouling agent Irgarol 1051 within the Plymouth Sound locality: Implications for the green macroalga *Enteromorpha Intestinalis*. *Mar. Pollut. Bull.* **1997**, **34**, 645-651.
- ⁵⁶ J.W. Readman, L.L.W. Kwong, D. Grondin, J. Bartocci, J.P. Villeneuve, L.D. Mee: Coastal water contamination from a triazine herbicide used in antifouling paints, *Environ. Sci. Technol.* **1993**, **27**, 1940-1942.
- ⁵⁷ M.A. Gough, J. Fothergill, J.D. Hendrie: A survey of southern England coastal waters for the s-triazine antifouling compound Irgarol 1051. *Mar. Pollut. Bull.* **1994**, **28**, 613-620.

- 58 I. Tolosa, J.W. Readman, A. Blaevoet, S. Ghilini, J. Bartocci, M. Horvat: Contamination of Mediterranean (Côte d'Azur) coastal waters by organotins and Irgarol 1051 used in antifouling paints. *Mar. Pollut. Bull.* **1996**, 32, 335-341.
- 59 J.L. Zhou, T.W. Fileman, S. Evans, P. Donkin, R.F.C. Mantoura, J. Rowland: Seasonal distribution of dissolved pesticides and polynuclear aromatic hydrocarbons in the Humber Estuary and Humber Coastal Zone. *Mar. Pollut. Bull.* **1996**, 32, 599-608.
- 60 I. Ferrer, B. Ballesteros, M.-P. Marco, D. Barceló: Pilot survey for the determination of the antifouling agent Irgarol 1051 in enclosed sea water samples by a direct enzyme-linked-immunosorbent assay and solid-phase-extraction followed by LC-DAD detection. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, 31, 3530-3555.
- 61 K. Fent, J. Hunn: Organotins in freshwater harbors and rivers: Temporal distribution, annual trends and fate. *Environ. Toxicol. Chem.* **1995**, 14, 1123-1132.
- 62 P.H. Dowson, J.M. Bubb, J.N. Lester: Temporal distribution of organotins in the aquatic environment: five years after the UK 1987 retail ban on TBT based antifouling paints. *Mar. Pollut. Bull.* **1993**, 26, 487-494.
- 63 R.J. Huggett, M.A. Unger, P.F. Seligman, A.O. Valkirs: The marine biocide tributyltin. Assessing and managing the environmental risks. *Environ. Sci. Technol.* **1992**, 26, 232-237.
- 64 K.V. Thomas T.W. Fileman, J.W. Readman, M.J. Waldock: Antifouling paint booster biocides in the UK coastal environment and potential risks of biological effects. *Mar. Pollut. Bull.* **2000**, 40 (9), 739-745.
- 65 J. Oehlmann: Erfassung morpho- und histopathologischer Effekte von Organozinnverbindungen auf marine Mollusken und Prüfung ihrer Verwendbarkeit für ein zukünftiges biologisches Effektmonitoring, **1996**, Umweltforschungsplan des Umweltbundesamtes, Forschungsbericht 10240303/01.S.194.
- 66 W.J. Langston, N.D. Pope: Determination of TBT adsorption and desorption in estuarine sediments. *Mar. Pollut. Bull.* , 31,1-3,32-43.
- 67 S. Toth, K. Becker-van Slooten , L.L.F. Spack de Alencastro, J. Tarradellas: Irgarol 1051, an antifouling compound in freshwater, sediment and biota of Lake Geneva. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1996**, 57, 426-433.
- 68 Ballesteros B., Barceló D., Camps F., Marco M.P.: Preparation of antisera and development of a direct enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of the antifouling agent Irgarol 1051, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 347, 139-147.
- 69 B. Ballesteros, D. Barceló, F. Sanchez-Baeza, F. Camps, M.P. Marco: Influence of the hapten design on the development of a competitive ELISA for the determination of the antifouling agent Irgarol 1051 at trace levels, *Anal. Chem.* **1998**, 70 (19), 4004-14.

- 70 J. Penalva, M.A. Gonzalez-Martinez, R. A. Puchades, Maquieira, M.P. Marco, D. Barceló: Immunosensor for trace determination of Irgarol 1051 in seawater using organic media, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 387, 3, 227-233.
- 71 I. Tolosa and J. Readman: Simultaneous analysis of the antifouling agents: Tributyltin, triphenyltin and Irgarol 1051 in marina water samples, *Anal. Chim. Acta* **1996**, 335, 267-274.
- 72 R. J. C. A. Stehen, P. E. G. Leonards, U. A. T. Brinkman and W. P. Cofino: Ultra-trace-level determination of the antifouling agent Irgarol 1051 by gas chromatography with tandem mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A* **1997**, 766, 153-158.
- 73 S. Weigel: Entwicklung einer Methode zur Extraktion organischer Spurenstoffe aus großvolumigen Wasserproben mittels Festphasen, Diplomarbeit **1998**, Universität Hamburg.
- 74 B. Dahl, H. Blanck: Toxic effects of the antifouling agent Irgarol 1051 on periphyton communities in coastal water microcosms *Mar. Pollut. Bull.* **1996**, 32, 342-350.
- 75 K. Bester, H. Hühnerfuss, U. Brockmann, H. J. Rick: Biological effects of triazine herbicide contamination on marine phytoplankton. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1995**, 29, 277-283.
- 76 Ciba Geigy: Irgarol 1051 ® in antifouling paints. *Technical Information Bulletin* **1988**
- 77 A. Scarlett, P. Donkin, T.W. Fileman, S.V. Evans, M.E. Donkin: Risk posed by the antifouling agent Irgarol 1051 to the seagrass, *Zoetra marina*, *Aquat.Toxicol.* **1999**, 45, (2-3), 159-170.
- 78 E. Jantzen R.D. Wilken: Zinnorganische Verbindungen in Hafensedimenten - Analytik und Beurteilung, *Vom Wasser* **1991**, 16, 1-11.
- 79 J. Kuballa: Einträge und Anwendungen von toxischen Organozinnverbindungen. In: Warnsignale aus dem Wattenmeer, *Blackwell Wissenschaftsverlag*, Berlin, **1994**, S. 42-45.
- 80 K. Kannan, J. Falandysz: Butyltin residues in sediment, fish, fish-eating birds, harbour porpoise and human tissue from the Polish coast from the Baltic Sea, *Mar. Pollut. Bull.* **1997**, 43, (3), 203-207.
- 81 P. Michel, B. Averty: Contamination of French coastal waters by organotin compounds: 1997 Update, *Mar. Pollut. Bull.* **1999**, 38, (4), 268-275.
- 82 "Kalte Füße bekommen": In: *Ökotest*, gedruckte Ausgabe (03) **2000**. – Online www.oekotest.de-Februar, 2000.
- 83 K. Fent: Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* **1996**, 26, 1-117.
- 84 B. Bauer, P. Fioroni, U. Schulte-Oehlman, J. Oehlman, W. Kalbfus: The use of *Littorina Littorea* for tributyltin effect monitoring - Results from the German TBT survey 1994/1995 and laboratory experiments, *Environ. Pollut.* **1996**, 3, 299-309.
- 85 K. Kannan, K. Senthikumar, J.P. Giesy: Occurrence of butyltin compounds in human blood. *Environ. Sci. Technol.*, **1999**, 33, (10), 1776-1779.

- ⁸⁶ WWF News: TBT in Fischkonserven. WWF fordert sofortiges Produktionsverbot für TBT, WWF-Fachbereich Meere und Küsten, Veröffentlicht am 24.01.2000.
- ⁸⁷ Es geht drunter und drüber: In *Ökotest*, (02) **2000**. - Online Ausgabe Februar 2000.
- ⁸⁸ D.S. Page, C.C. Ozbal, M.E. Lanphear: Concentration of butyltin species in sediments associated with shippyard activity, *Environ. Pollut.* **1996**, 91 (2), 237-243.
- ⁸⁹ D. Steffen : Zinnorganische Verbindungen in Sedimenten niedersächsischer Oberflächengewässer (1998). *Beitrag zum 8. Chemischen Kolloquium der Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz. Aus: Organozinnbelastung von Meeressäugern, Seevögeln und Speisefischen*. Eine Studie der Umweltstiftung WWF-Deutschland, November **1999**
- ⁹⁰ W. Kalbfus: F+E-Bericht des Umweltbundesamtes FKZ 10240303/2-Teilprojekt Analytik von Oberflächenwasser, Sediment und Mollusken. **1996**
- ⁹¹ Hamburger Umweltberichte 55/98: Endokrin wirksame Stoffe und andere Schadstoffe in Fischen aus Hamburger Gewässern, Hamburger Umweltbehörde - Amt für Umweltschutz – Umweltuntersuchungen.
- ⁹² L.W. Hall JR., J.M.Giddings, K.R.Solomon, R. Balcomb: An ecological risk assessment for the use of Irgarol 1051 as an algaecide for antifouling paints, *Crit. Rev. Toxicol.* **1999**, 29 (4), 367-437.
- ⁹³ *Resolution A 895 (21)*, November **1999**
- ⁹⁴ B. Watermann, M. Haase, J. Isensee, S. Sievers, R. Dannenberg, U. Rohweder, O.H. Bauer, R. Wohnout: Alternativen zu TBT: Chemisch-analytische und ökotoxikologische Untersuchungen an biozidfreien Unterwasseranstrichen, Abschlussbericht; Pilot-Projekt der Hamburger Umweltbehörde und der Umweltstiftung WWF - Deutschland in Zusammenarbeit mit der HADAG - Reederei und Schiffsfarbenherstellern, **1999**.
- ⁹⁵ J. van Genderen, M.N. Mons, J.A. van Leerdam: Inventory and toxicological evaluation of organic micropollutants, *Association of river waterworks RIWA*, März **2000** .
- ⁹⁶ Eigene Beobachtung und persönliche Mitteilung eines Sportseglers.
- ⁹⁷ M. Ahel, W. Giger: Determination of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in environmental samples by high-performance-liquid-chromatography. *Anal. Chem.* **1985**, 57, 1577-1583.
- ⁹⁸ J.M.A. Stoll, W. Giger: Determination of detergent-derived fluorescent whitening agent isomers in lake sediments and surface waters by liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 2594-2599.
- ⁹⁹ H. Schröder; Selective determination of non-biodegradable polar, organic pollutants in waste water related to functional groups using flow injection combined with tandem mass spectrometry. *Wat. Sci. Tech.* **1996**, 34, 21-28; *Water Quality International '96 Singapore, Proceedings Vol. 6*, pp. 290-297.

- ¹⁰⁰ H. Schröder: Analysis of polar organic pollutants in the Elbe river using tandem mass spectrometry - an excellent method to improve characterisation and to identify compounds. *J. Chromatogr. A* **1997**, 777, 127.
- ¹⁰¹ M. Zhao, F. van der Wielen, P. de Voogt: Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with sequential clean-up for the determination of alkyphenol ethoxylates in biological tissues. *J. Chromatogr.* **1999**, A 837, 129.
- ¹⁰² BLMP (1999): Bund-Länder-Meßprogramm für die Meeresumwelt von Nord- und Ostsee , *Heft 1, Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie* (BSH), Hamburg und Rostock.
- ¹⁰³ S. Franke, S. Hildebrandt, J. Schwarzbauer, M. Link, W. Francke: organic compounds as contaminants of the River Elbe and its tributaries, part II: GC/MS screening for contaminants of the Elbe water. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1995**, 353, 3949.
- ¹⁰⁴ V. Dethlefsen: Quellen und Auswirkungen der Schadstoffe in der Nordsee. *Wasser und Boden 2* **1988**, 75-79.
- ¹⁰⁵ O. Heemken: Optimierung der überkritischen Fluidextraktion und der beschleunigten Lösemittelextraktion für Untersuchungen zu Eintrag und Verteilung organischer Kontaminanten in der Nordsee, Dissertation, Siegen **1997**.
- ¹⁰⁶ Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe: Wassergütedaten der Elbe, von Schmilka bis zur See; Zahlentafel 1996, April **1998**, 176-183.
- ¹⁰⁷ R. Götz, O.H. Bauer, P. Friesel, K. Roch: Organic trace compounds in the water of the river Elbe near Hamburg Part II, *Chemosphere*, **1998**, 36, 2103-21118.
- ¹⁰⁸ Internationale Arbeitsgemeinschaft der Wasserwerke im Rheineinzugsgebiet (IAWR): Erfassung und Identifizierung von trinkwassergängigen Einzelsubstanzen in Abwässer und im Rhein, Köln **1996**, *Rheinthemen Bd 1*.
- ¹⁰⁹ R. Gatermann, H. Hühnerfuss, G. Rimkus, M. Wolf, S. Franke: The distribution of nitrobenzene and other nitroaromatic compounds in the North Sea, *Mar. Pollut. Bull.* **1995**, 30, 221-227.
- ¹¹⁰ K. Bester, R. Gatermann, H. Hühnerfuss, W. Lange, N. Theobald: Results of non target screening of lipophilic organic pollutants in the German Bight IV: Identification and quantification of chloronitrobenzenes and dichloronitrobenzenes, *Environ. Pollut.* **1998**.
- ¹¹¹ K. Bester, S. Biselli, R. Gatermann, H. Hühnerfuss, W. Lange, N. Theobald: Results of non target screening of lipophilic organic pollutants in the German Bight III: Identification and quantification of 2,5-dichloroaniline, *Chemosphere* **1998**, 36,(9), 1973-1983.
- ¹¹² K. Bester, R. Gatermann, H. Hühnerfuss, W. Lange, N. Theobald: Results of non target screening of lipophilic organic pollutants in the German Bight II: Polycyclic musk fragrances, *Wat. Res.* **1998**, 32, 1857-1863.

- ¹¹³ M. Herrchen, P. Lepper: Vorschlag für eine Liste von prioritären Stoffen im Rahmen einer zukünftigen Wasserrahmenrichtlinie der EU, Forschungsbericht 29728708, UBA-FB 99-091, *UBA-Texte 64/99*, **1999**.
- ¹¹⁴ R. Gatermann, K. Bester, S. Franke, H. Hühnerfuss: The distribution of O,O,O-trimethylthiophosphat and O,O,S-trimethyldithiophosphate in the North Sea, *Chemosphere* **1996**, 32, 1907-1918.
- ¹¹⁵ S. Franke: Gaschromatographische und massenspektrometrische Analyse organischer Substanzen in Elb-, Spülfeld- und Grundwasser, Dissertation, Universität Hamburg **1990**.
- ¹¹⁶ G. Bormann, J. Gandraß, H.D. Knauth, R.D. Wilken: Nitrogen-/phosphorus pesticides in the river Elbe from the Czech boarder to the estuary, *Vom Wasser* **1993**, 80, 15-27.
- ¹¹⁷ R. Götz, P. Friesel, K. Roch, C. Ebel, J. Siebert, H. Reincke, S. Wolff, W. Specht, R.D. Weeren, J. Pahnke, P. Rußbütt: Pesticides in the river Elbe, in tributaries of the river Elbe and in small surface waters of the river Elbe catchment area, *Vom Wasser* **1994**, 83, 43-55.
- ¹¹⁸ BUA-Stoffbericht 20: *Tris*(2-chloroethyl)-phosphat; *VCH-Verlagsgesellschaft mbH*, Weinheim, **1988**.
- ¹¹⁹ H. D. Eschke, J. Traud, H.J. Dibowski: Untersuchungen zum Vorkommen polycyclischer Moschus-Duftstoffe in verschiedenen Umweltkompartimenten, . UWSF Z. *Umweltchem. Ökotox.* **1994**, 7 (3), 131-138.
- ¹²⁰ R. Gatermann: Untersuchungen zur gaschromatographischen Analyse von nitroaromatischen Verbindungen in wäßrigen Proben, Diplomarbeit, Universität Hamburg **1993**.
- ¹²¹ G. Lach, D. Steffen: Orientierende Untersuchungen von Gewässersedimenten auf Nitro-/Polymoschusverbindungen und die Flammenschutzmittel TCEP und TCPP. In: Oberirdische Gewässer 3/97. *Niedersächsisches Landesamt für Ökologie*, Hildesheim, Germany, **1997**.
- ¹²² M. Winkler, G. Kopf, C. Hauptvogel, T. Neu: Fate of artificial musk fragrances associated with suspended particulate matter (SPM) from the river Elbe (Germany) in comparison to other organic contaminants, *Chemosphere* **1998**, 37, 1139-1156.
- ¹²³ C. Fooker, R. Gühr, M. Häckle, P.Seel: Orientierende Messungen gefährlicher Stoffe – Landesweite Untersuchungen auf organische Spurenverunreinigungen in hessischen Fließgewässern, Abwässern und Klärschlämmen, 1991-1996. In : Umweltplanung, Arbeits- und Umweltschutz, **1997** Heft 233, *Hessische Landesanstalt für Umwelt*, Wiesbaden, Germany.
- ¹²⁴ R.M.A. Breukel, F. Balk: Musken in Rijn en Maas, *RIZA Werkdocument* 96.197x. RIZA, The Netherlands cited in van de Plassche and Balk **1997**.
- ¹²⁵ E.J van de Plassche, F. Balk: Environmental risk assessment of the polycyclic musks AHTN and HHCB according to the EU-TGD. **1997**, *Report no. 601503008*.

- ¹²⁶ R.A. Silva-Wilkinson, L. P. Burkhard, B.R. Sheedy, G.M. DeGraeve, R.A. Lordo: A simple comparison of mass spectral search results and implications for environmental screening analysis, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1999**, 36, 109-114.
- ¹²⁷ G. Ourisson: Vom Erdöl zur Evolution der Biomembranen **1986**, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 34, 8.
- ¹²⁸ Römp: CD-ROM, *Thieme Verlag*, **1995**.
- ¹²⁹ G.M. King: Inhibition of microbial activity in marine sediments by a bromophenol from a hemichordate, *Nature* **1986**, 323, (18/9), 257-259.
- ¹³⁰ C.C. Steward, C.R. Lovell: Respiration and assimilation of 4-bromophenol by estuarine sediment bacteria, *Microb. Ecol.* **1997**, 33, 198-205.
- ¹³¹ B. Brunström, D. Broman, L. Dencker, C.Näf, E. Vejens, Y. Zebühr: Extracts from settling particulate matter collected in Stockholm archipelago waters: embryoletality, immunotoxicity and erod-inducing potency of fractions containing aliphatics/monoaromatics, diaromatics, or polyaromatics, *Environ. Toxicol. Chem.* **1992**, 11 (10), 1441-1449.
- ¹³² W. Ahlf: Biotests an Sedimenten - In: C. Steinberg, H. Bernhardt, H. Klappner (Hrsg.), *Handbuch angewandte Limnologie - Teil Aquatische Ökotoxikologie*, **1995** *Ecomed*, Landsberg, Kapitel V-3.6.1, pp. 1-43.
- ¹³³ G.A. Burton, JR: Assessing the toxicity of freshwater sediments, *Environ. Toxicol. Chem.* **1991**, 10 (12), 1585-1627.
- ¹³⁴ G.A. Burton, C. Mac Pherson: Sediment toxicity testing issues and methods - In: D.J. Hoffman, B.A. Rattner, G.A. Burton, J. Cairns (Hrs.), *Handbook of ecotoxicology*, Kapitel 5, *Lewis Publishers*, **1995**, 70-103.
- ¹³⁵ B. Schmidt: Biotest-geleitete chemische Analyse von Sedimenten, Dissertation, Universität Hamburg, **2000**.
- ¹³⁶ R.W.P.M. Laane (ed): Background concentrations of natural compounds in rivers, seawater, atmosphere and mussels. *Directorate-General of public works and water management*, **1992**, Report DGW-92.033.
- ¹³⁷ D.M. Di Toro, C.S. Zarba, D.J. Hansen, W.J. Berry, R.C. Swartz, C.E. Cowan, S.P. Pavlou, H.E. Allen, N.A. Thomas, P.R. Paquin: Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals by using equilibrium partitioning. *Environ. Toxicol. Chem.* **1991**, 10 (12), 1541-1583
- ¹³⁸ D. Shea: Developing national sediment quality criteria. Equilibrium partitioning of contaminants as a means of evaluating sediment quality, *Environ. Sci. Technol.* **1988**, 22 (11), 1256-1261.
- ¹³⁹ K.T.Y. Ho, J.G. Quinn: Physical and chemical parameters of sediment extraction and fractionation that influence toxicity as evaluated by Microtox, *Environ. Toxicol. Chem.* **1993**, 12, 615-625.

- ¹⁴⁰ T. Braunbeck: Zelltest in der Ökotoxikologie-Cytotoxizitätstests mit Zellkulturen aus Fischen als Alternative und Ergänzung zu konventionellen Fischtests - Veröfftl. *PAÖ der Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg*, **1995**, 11, 204.
- ¹⁴¹ P.M. Chapman, E.A. Power, G.A. Burton: Integrative assessment in aquatic ecosystems. **1992**, In: G.A. Burton, Jr (ed.) : *Sediment Toxicity Assessment*. *Lewis Publishers*, Boca Raton, FL: 313-340.
- ¹⁴² ICES – International Council for the Exploration of the sea: characteristics of sediments which influence contaminant exposure to marine organisms and methods for their quantification.- In : *ICES: Report of the study group on the biological significance of contaminants in marine sediments*. **1992** Poll: 7, Ref.L, Sess. V, 24.July, ICES, Copenhagen: 1-15.
- ¹⁴³ M. Haitzer, G. Abbt-Braun, W. Traunspurger, C.E.W. Steinberg: Effects of humic substances on the bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons: Correlation with spectroscopic and chemical properties of humic substances. *Environ. Toxicol. Chem.* **1999**, 18 (12), 2782-2788.
- ¹⁴⁴ J.D. Macrae, K.J. Hall: Comparison of methods used to determine the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments, *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32, 3809-3815.
- ¹⁴⁵ L. Clevel, E.E. Little, J.D. Petty, B.T. Johnson, J.A. Lebo, C.E. Orazio, J. Dionne, A. Crockett: Toxicology and chemical screening of Antarctica sediments: Use the whole sediment toxicity tests, Microtox, Mutatox and semipermeable membrane devices (SPMDs), *Mar. Pollut. Bull.* **1996**, 34 (3), 194-202.
- ¹⁴⁶ M. Gülden, A. Turan, H. Seibert: Endocrine active substances in surface waters. **1997**, *UBA-Bericht* **1997** Heft 97-068.
- ¹⁴⁷ R. Santodonato: Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: Relationship to carcinogenicity; *Chemosphere* **1997**, 34, (4), 835-845.
- ¹⁴⁸ R. Rojickova-Patrova, B. Marsalek, I. Holoubek: Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: Selection of an optimal test battery, *Chemosphere* **1998**, 37, 3, 495-597.
- ¹⁴⁹ M. Weidborg, E.A. Vok, G.D. Ofjord, O. Kjonno: Comparison of three marine screening tests and four Oslo and Paris commission procedures to evaluate toxicity of offshore chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* **1997**, 16, 2, 384-389.
- ¹⁵⁰ N. Reineke: Methodenentwicklung zur biotestgeleiteten Analytik von organischen Substanzen in Umweltproben mit Hilfe des Leuchtbakterientests. Diplomarbeit, Hamburg **1999**.
- ¹⁵¹ M. Richardson (ed.): *Ecotoxicology Monitoring*, *VCH Weinheim*, **1993**.
- ¹⁵² H.H. Vahl, J. Westendorf: The use of the *Salmonella* BA 9 forward mutation assay in sediment quality assessment: mutagenicity of freshly deposited sediments of the River Elbe *J. Aquatic Ecosys. Health* **1995**, 4, 277-283.

- ¹⁵³ M.R. Samoiloff, J. Bell, D.A. Birkholz, G.R.B. Webster, E.G. Arnott, R. Pulak, A. Madrid: Combined bioassay chemical fractionation scheme for the determination and ranking of toxic chemicals in sediments, *Environ. Sci. Technol.* **1983**, 17 (6), 329-334.
- ¹⁵⁴ M Grifoll, A.M. Solanas, J.M. Bayona: Characterisation of genotoxic components in sediments by mass spectrometric techniques combined with *Salmonella* Microsome Test; *Arch. Env. Contam. Toxicol.* **1990**; 19, 175-184.
- ¹⁵⁵ Ruiz-Vázquez, R., C. Pueyo, E. Cerdá-Olmedo: A mutagen assay detecting forward mutations in an arabinose-sensitive strain of *Salmonella typhimurium*, *Mutation Res.* **1978**, 54, 121-129.
- ¹⁵⁶ J.Jurado, E. Alejandre-Duràn, C. Pueyo: Genetic differences between the standard Ames tester strains TA 100 and TA 98, *Mutagen.* **1993**, 8, 527-532.
- ¹⁵⁷ Jurado, E. Alejandre-Duràn, C. Pueyo: Mutagenicity testing in *Salmonella typhimurium* strains possessing both the his revision and ara forward mutation systems and different levels of classical nitroreductase or O-acetyltransferase activities, *Environ. Mol. Mutagen.* **1994**, 23, 286-293.
- ¹⁵⁸ F. Gagné, M. Pardos, C. Blaise, P. Turcotte, B. Quémerais, A. Fouquet: Toxicity evaluation of organic sediment extracts resolved by size exclusion chromatography using rainbow trout hepatocytes, *Chemosphere* **1999**, 39 (9), 1545-1570.
- ¹⁵⁹ American Society for Testing and Materials: Guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediments for toxicological testing. **1991** ASTM Standard E1391-90, (Allen Burton; 513/873-2201), S. 1-15.
- ¹⁶⁰ B.L.Stemmer, G.A. Burton, JR., G. Sasson-Brickson: Effect of sediment spatial variance and collection method on *cladoceran* toxicity and indigenous microbial activity determinations. *Environ. Toxicol. Chem.* **1990**, 9, 1035-1044.
- ¹⁶¹ G.S. Schuytema, A.V. Nebeker, E.E. Griffis, C.E.Miller: Effects of freezing on toxicity of sediments contaminated with DDT and endrin. *Environ. Toxicol. Chem.* **1989**, 8, 883-891.
- ¹⁶² P.G. Watson, P. Frickers, C. Goodschild: Spatial and seasonal variations in the chemistry of sediment interstitial waters in the Tamar estuary. *Estuarine, Coastal Shelf Sci.* **1985**, 21,105-119.
- ¹⁶³ W. Schuller: Etablierung und praktische Anwendung eines Testsystems mit humanen Brustkrebszelllinien zum Nachweis östrogenartiger Wirkungen (E-Screen-Assay). Dissertation, **1998**, Unviersität Tübingen.
- ¹⁶⁴ M.P. Beck, P. Balguer, J.C. NicolasA. Blankenship, J.P. Giesy, B. Stachel, L. Karbe: Estrogenic and antiestrogenic potentials of freshley deposited sediments along the River Elbe, *9th Annual Meeting of SETAC-Europe*, 25-29 May **1999**, Leipzig, Germany.
- ¹⁶⁵ M. Padros : Confirmation of elemental sulfur toxicity in the Microtox assay during organic extracts assessment of freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* **1999**, 18 (2), 188-193.

- ¹⁶⁶ C.A. Hordijk : Determination of total sulphur in freshwater sediments by ion chromatography. *Wat. Res.* **1989**, 23, 853-859.
- ¹⁶⁷ H. Marquardt, S.G. Schäfer: Lehrbuch der Toxikologie, *BI Wissenschaftsverlag* **1994**
- ¹⁶⁸ G. Neurath, B. Gutendorf, J. Westendorf, S. Franke, W. Francke, H. Marquardt: Mutagenic activity of chlorinated bis(propyl)ethers: Major pollutants in the Elbe River. *Mut. Res.* **1997**, 397, 102-106.
- ¹⁶⁹ DIMDI-Online-Datenbank: Deutsches Institut für medizinische Dokumentation und Information
- ¹⁷⁰ ECDIN-Online-Datenbank: Environmental Chemicals Data and Information Network
- ¹⁷¹ Landesamt für Wasser und Abfall Nordrhein-Westfalen: Phthalate in der aquatischen Umwelt *LVA-Materialien 6/93*, **1993**.
- ¹⁷² N.R. Itrich, S.L. Simonich, T.W. Federle: Biotransformation of the polycyclic musk, HHCB, during sewage treatment. *SETAC 19th Annual Meeting*, 14-15 November **1998**, Charlotte, NC, USA.
- ¹⁷³ D.E. Langworthy, N.R. Itrich, S.L. Simonich T.W. Federle: Biotransformation of the polycyclic musk, HHCB, in activated sludge and river Water, *SETAC-World Congress, Brighton*, 24-29 May **2000**.
- ¹⁷⁴ S. Franke, C. Meyer, N. Heinzl, R. Gatermann, H. Hühnerfuss, G.G. Rimkus, W.A. König, W. Francke: Enantiomeric composition of the polycyclic musks HHCB and AHTN in different aquatic species. *Chirality* **1999**, 11, 795-801.
- ¹⁷⁵ R. Haas: Rüstungsatlasten – Einschätzung des Gefährdungspotentials auf dem Wasserpfad, *UWSF Z. Umweltchem. Ökotox.* **1992**, 65, 273-282.
- ¹⁷⁶ G. Rimkus, R. Gatermann, S. Biselli, H. Hühnerfuss: Nachweis von Moschus-Xylol- und Moschus-Keton-Metaboliten in der aquatischen Umwelt. *Lebensmittelchemie* **1999**, 53, 88.
- ¹⁷⁷ D. Herren, J.D. Berset: Nitro musks, nitro musk amino metabolites and polycyclic musks in sewage sludge. Quantitative determination by HRGC-ion-trap-MS/MS and mass spectral characterisation of the amino metabolites, *Chemosphere* **2000**, 40, 565-574.
- ¹⁷⁸ S. L. Simonich, W.M. Begley, G. Debaere, W.S. Ekhoﬀ: Trace analysis of fragrance materials in wastewater and treated wastewater. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34 (6), 959-965.
- ¹⁷⁹ R. Gatermann, S. Biselli, H. Hühnerfuss, G.G. Rimkus, M. Hecker, L. Karbe: Synthetic musks in the environment. Part 1: Species dependent bioaccumulation of polycyclic and nitro musk fragrances in freshwater fish and mussels, (In Preparation 2001)
- ¹⁸⁰ A. N. Noureldin, D. Zhao, D.G. Lee: Heterogeneous permanganate oxidations. 7. The oxidation of aliphatic side chains. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 8767-8772.
- ¹⁸¹ G. Schürmann, B. Markert, Ecotoxicology, *Spektrum Verlag*, Heidelberg, Berlin **1998**, S.444.

- ¹⁸² R. Loskill, R. Nagel: Entwicklung von Kriterien zur Bewertung der Bioakkumulation für den Vollzug ChemG/PflSchG, Literaturstudie, *UBA Texte* 42/91, Berlin **1991**.
- ¹⁸³ H. Geyer, I. Scheunert, F. Korte: Relationship between the lipid content of fish and their bioconcentration potential of 1,2,4-Trichlorobenzene, *Chemosphere* **1985**, *14*, 545-555.
- ¹⁸⁴ H. Alasdair Nelson: PAHs and related compounds-Biology- In: The handbook of environmental chemistry, *Springer Verlag*, **1998**, *3J*.
- ¹⁸⁵ T.C. van Brummelen, B.van Hartum, T.Crommentuijn, D.F. Kalf: Bioavailability and ecotoxicity of PAHs. Aus: *The handbook of environmental chemistry*. PAHs and related compounds **1998**, (*3J*), 222-224.
- ¹⁸⁶ R. Kallenborn, H. Hühnerfuss: Chiral environmental pollutants – Trace analysis and ecotoxicology. *Springer Verlag*, **2001**.
- ¹⁸⁷ R. Kallenborn, H. Hühnerfuss, W.A. König: Enantioselektiver Metabolismus von (+/-)- α -1,2,3,4,5,6-hexachlorcyclohexan in Organen der Eiderente, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 328-329.
- ¹⁸⁸ B. Pfaffenberger: Untersuchung zur enantioselektiven Anreicherung von chiralen organischen Schadstoffen im marinen und terrestrischen Ökosystem, Dissertation, Universität Hamburg **1995**.
- ¹⁸⁹ S. Franke, C. Meyer, M. Specht, W.A. König, W. Francke: Chloro-bis-propyl ethers in the Elbe river - isomeric distribution and enantioselective degradation. *J. High Resol. Chromatogr.* **1998**, *21*, 113-120.
- ¹⁹⁰ R. Gatermann, S. Biselli, H. Hühnerfuss, G.G. Rimkus, S. Franke, M. Hecker, R. Kallenborn, L. Karbe, W.A. König: Synthetic musks in the environment. Part 2: Enantioselective transformation of the polycyclic musk fragrances HHCB, AHTN, AHDI, and ATII in freshwater fish. (In Preparation, 2001).
- ¹⁹¹ N. Heinzel: Synthese von Bis(1,3-dichlor-2-propyl)ether und (4*S*,7*RS*)-Galaxolid als Referenzsubstanzen häufiger Schadstoffe in Ökosystemen, **1997**, Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- ¹⁹² D. Döpp, K.H. Sailer: Vergilbung von kristallinen Keton-Moschus, Xylol-Moschus und Tibetemoschus. *Chem. Ber.* **1975**, *108*, 3483-3496.
- ¹⁹³ H.U. Käfferlein, T. Göen, J. Angerer: Musk Xylene: Analysis, occurrence, kinetics, and toxicology *Crit. Rev. Toxicol.* **1998**, *28* (5), 431-476.
- ¹⁹⁴ D.Salvito: Comment on "Acute aquatic toxicities of four musk xylene derivatives on *Daphnia magna* by A. Behechti, K.W. Schramm, A. Attar, J. Niederfellner, and A. Kettrup. In: *Wat.Res.* **2000**, *34* (9), 2625.
- ¹⁹⁵ J. Riedel, W. Dekant: Biotransformation and toxicokinetics of MX in humans. *Tox. Appl. Pharmacol.* **1999**.

- ¹⁹⁶ H.H. Vahl, S. Biselli, R. Gatermann, H. Hühnerfuss, J. Westendorf: Genotoxicity of amino derivatives of nitro musks. *Third SETAC world Congress, Brighton, UK, 21-25 May 2000*, Poster Presentation (5I/P018, p. 249).
- ¹⁹⁷ S. Schwarz, B. Runnebaum, I. Gerhard: Erste Hinweise auf den Einfluß von Nitromoschusverbindungen bei endokrinen Störungen der Frau. *Arch Gynek.* **1998**, *261, Suppl.1*, 191.
- ¹⁹⁸ Y.J. Chou: Embryotoxic, teratogenic, and endocrine modulating activity of musk fragrances in fish and amphibians. Dissertation, **1999**, University of Konstanz.
- ¹⁹⁹ G.M. Anstead, K.E. Karlson, J.A. Katzenellenbogen: The estradiol pharmacophore: Ligand structure-estrogen binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids*, **1997**, *62*, 268-303.

ANHANG

SOP	Abkürzung
1. <i>Reinigung von Glasgeräten</i>	SOP REI
2. <i>Probenahme</i>	SOP ProN-W/SED
3. <i>Homogenisierung</i>	SOP Hom-S/B
4. <i>Trockengewichtsbestimmung Sediment</i>	SOP-STG
5. <i>Extraktion</i>	SOP SoxE-S/B
6. <i>Einengen und Lösungsmittelwechsel</i>	SOP Rot
7. <i>GPC</i>	SOP GPC
8. <i>Silica-Fraktionierung</i>	SOP SiF
9. <i>SPMDs</i>	SOP SPMD
10. <i>Überführung von Proben in DMSO</i>	SOP-LW-DMSO
11. <i>Probenbeschriftung</i>	

1. Reinigung von Glasgeräten

SOP REI: Reinigung von Glasgeräten

Vorreinigung der Glasgeräte mit Leitungswasser:

Die Glasgeräte werden mit Hilfe von Spülbürsten bzw. Flaschenbürsten mechanisch grundgereinigt. Hierfür sollte möglichst warmes Leitungswasser verwendet werden.

Vorreinigung im Extranbad (für extrem verschmutzte Glasgeräte):

Stark verschmutzte Glasgeräte in einem nach Gebrauchsanweisung (s. Flaschenetikett) angesetzten, 313 K (40 °C) warmen Extranbad, einweichen und mit Hilfe einer Flaschenbürste von sichtbarem Schmutz befreien. Nach Reinigung alles gründlich mit Leitungswasser oder Seralwasser spülen.

Aceton- und n-Hexanspülung:

Alle Glasgeräte werden gründlich dreimal mit Aceton (p.a.) gespült. Hierbei ist besonders auf Problembereiche wie z.B. ausgezogene Spitzen oder andere Verengungen ähnlicher Art zu achten. Die Geräte müssen nach jedem Spülgang vollständig trocknen. Ist der Acetonspülgang beendet, erfolgt gleiches Vorgehen mit n-Hexan (z.R.).

Bei allen Spülvorgängen ist unbedingt darauf zu achten, daß die Pipettenspitze weder mit dem Schliff eines Kolbens, mit Kleidung oder anderen Gegenständen, noch mit den Fingern in Berührung kommt.

Überprüfung der Reinheit:

Vor Beginn jeder Probenserie müssen für Kolben, Extraktionsgeräte etc. zur Überprüfung der Reinheit Blindwerte bestimmt werden.

2. Probenahme

SOP ProN-W: Probenahme von Wasserproben in Yachthäfen

Eine 1 L-Wasserprobe aus dem Hafenbecken wird mit Hilfe einer 1 L Glasflasche unterhalb des Oberflächenfilms (in Abhängigkeit vom jeweiligen Gewässer zw. 0,5-4 m), entnommen. Hierfür wird die Glasflasche über einen Draht möglichst schnell herabgesenkt, die Flasche wird herausgezogen sobald keine Luftblasen mehr zu beobachten sind. Im Labor wird über einen Messzylinder 1 L für die anschließende Extraktion eingestellt.

SOP ProN-S: Sediment-Probenahme

Präparation der Aluminiumschalen:

Aluminiumschalen werden als Probenbehälter zur Konservierung der frischen Sedimentproben verwendet. Da diese im neuwertigen Zustand mit einer Wachsschicht belegt sind, müssen sie vorgereinigt werden. Hierfür werden die Schalen 3-4 mal mit Aceton (p.A.) gespült und anschließend bei 250 °C (523 K) über Nacht in einem gut belüfteten Trockenschrank ausgeglüht. Die abgekühlten Schalen werden dann noch einmal mit *n*-Hexan (z.R.) endgespült.

Die Sedimentprobe wird je nach örtlicher Gegebenheit (Hafen, Fluß, Nordsee) mit Hilfe eines:

- a) Backengreifers => 250 - 500 g
- b) Stechröhres => 250 - 500 g (10 cm Oberfläche)
- c) Kastengreifers => 250 - 1000 g (2-4 cm der Oberfläche)
- d) Gemini-Corer => 2-4 cm Schichten

entsprechend der jeweiligen Geräteverfahrenstechnik entnommen. Die Sedimentproben kommen dabei ausschließlich mit, für organische Spurenanalytik geeignetem, rostfreiem Edelstahl (V4A) bzw. vorgereinigtem Glas in Berührung. Die entnommenen Sedimentproben werden direkt nach der Probenahme in ausgeglühte und für die organische Spurenanalytik gereinigte Aluminiumboxen überführt, welche mit einem Deckel verschlossen bei 253 K tiefgefroren bis zur Extraktion gelagert werden.

Das geeignete Probenahmegerät sollte der analytischen Aufgabenstellung entsprechend gewählt werden.

3. Homogenisierung

SOP Hom-B: Homogenisierung von Biota-Proben

Homogenisieren von Organproben mit der Analysenmühle IKA A10 (IKA, Staufen, Germany)

Allgemeine Angaben

Die IKA-Analysenmühle ist zum Homogenisieren von Proben mit einem Volumen von 1-50 mL ausgelegt (Die resultierende Probengröße ist etwa 0,5 - 15g). Zu diesem Zweck erreicht sie etwa 20 000 U/min und ist mit einer Wasserkühlung ausgestattet, die gleichzeitig Proben- und Motorraum kühlt. Die Kühlung ist für einen Betrieb länger als 1 min zwingend notwendig, da sonst eine Notabschaltung wegen Überhitzung erfolgt. Bei Proben < 5 mL ist eine Verkleinerung des Probenraumes mit Hilfe eines Zwischendeckels möglich. Der Probenraum besteht aus Edelstahl.

Reinigung der Mühle

Die Mühle ist gegen den Motorraum durch mehrere Dichtungen isoliert, es gibt jedoch eine Öffnung, durch die Flüssigkeiten dort eindringen können, was aber zu vermeiden ist: Das Loch befindet sich auf dem oberen Rand des geöffneten Gerätes und stellt die Verbindung zu einem Schalter dar, der bei geöffneter Mühle das Gerät abschaltet. Es ist darauf zu achten, daß nicht zuviel Flüssigkeit zum Zweck der Probenraumreinigung verwendet wird: etwa 2-5 mL sind erfahrungsgemäß genug. Die Reinigung erfolgt, nach Anstellen der Kühlung, grob durch Auswischen mit Papier, danach können Salzreste mit Wasser entfernt werden (etwa 2-5mL, Deckel schließen, kurz anstellen, etwa 5 sek.). Wasser kann mit 2-Propanol oder Aceton entfernt werden (gleiches Verfahren), zuletzt wird mit *n*-Hexan durchgespült. Das schmutzige Lösungsmittel wird in ein Abfallgefäß geschüttet und der Entsorgung zugeführt (s. Punkt Entsorgung).

Der obere Bereich kann auch komplett auseinandergenommen werden (Werkzeug liegt bei).

Trocknen des Na₂SO₄

Natriumsulfat wird in eine Porzellanschale gefüllt, mit einem Deckel versehen und in einem Muffelofen bei 650°C für mindestens zwei Stunden geglüht. Das Abkühlen dauert etwa ½ Tag. Dann wird es in ein dicht zu verschließendes Gefäß gefüllt, das mit Datum und tara versehen ist. Man kann es etwa 1-2 Wochen danach noch verwenden.

Homogenisieren

Die zu homogenisierende Probe wird abgewogen und in das gesäuberte Gerät gegeben. Danach verfährt man ebenso mit dem Natriumsulfat. Man verwendet meist ein Verhältnis 1:3 oder 1:5, d.h. 3- oder 5-fache Menge an Natriumsulfat, auf jeden Fall soviel, daß die Probe nach der Homogenisierung in Pulverform vorliegt. Gegebenenfalls kann mehr verwendet werden. Dann läßt man das Gerät etwa 5 sek. laufen. Man öffnet es vorsichtig (bei größeren Probenmengen ist diese auch im oberen

Mühlenraum lokalisiert) und stellt fest, daß das meiste an den Wänden klebt. Man kratzt es mit dem Spatel herunter und läßt es ein zweites Mal (etwa 20 sek.) laufen, wobei der Inhalt sich mehr und mehr in ein Pulver verwandeln sollte. Ist dies der Fall, kann die Probe nun in ein vorbereitetes Gefäß (Pulvertrichter) gegeben werden, wobei man die Mühle schräg hält oder besser kippt und den Inhalt mit dem Spatel herausschabt.

Reinigung der Mühle siehe oben.

Entsorgung

Die gesammelten Reinigungsflüssigkeiten werden in den „Halogenfrei-Behälter“ gegeben.

Homogenisierung von Feuchtsediment

Die tiefgefrorene Sedimentprobe wird bei Raumtemperatur aufgetaut, anschließend wird die Probe aus der Aluschale in ein 250 mL Braunglas überführt, Steine und Muscheln entfernt und mit Hilfe eines Spatels/Löffels durch Rühren homogenisiert. Bei Proben sehr hoher Wassergehalte wird ein besseres Ergebnis durch schütteln der Probe im Braunglas erzielt (ca. 20 min).

Bestimmung des Trockengewichtes von Sedimenten

SOP-STG

Ein gewichtskonstantes Braunglas wird mit 5 g der homogenisierten Probe befüllt und anschließend das Feuchtgewicht notiert. Die Probe wird dann für eine erste Trocknung 48 h bei 60 °C (333 K) in einem speziell für diesen Zweck vorhandenen Trockenschrank getrocknet. Die gut abgekühlte Probe wird dann wiederum gewogen, das Gewicht nach der ersten Trocknung notiert. Anschließend erfolgt eine weitere Trocknungs-Einheit von 8 h, wenn das Probengewicht nach der zweiten Trocknung bereits konstant ist, kann es für die Berechnung des Wassergehalts verwendet werden. Sollte hingegen ein weiterer Gewichtsverlust entstanden sein, muß die Probe abermals 8h getrocknet werden, bis sich eine Gewichtskonstanz eingestellt hat.

4. Extraktion

Feuchtsediment SOP SoxE-S

Die homogenisierte Sedimentprobe (20-50 g) wird in den mit Seesand beschichteten (1 cm Schicht) Glaseinsatz (Extraktionshülse 100 mL) der Soxhlet-Apperatur genau eingewogen (Feinwaage). Dabei sind Pinzetten zu verwenden, um Kontaminationen durch Berührung mit den Fingern zu vermeiden. Die Extraktion wird unter Verwendung von 200 mL Aceton (z.R.) unter Rückfluß (333 K) über 8 Stunden durchgeführt. Für Sedimente mit einem hohen Anteil an organischen

Kohlenstoff sollte die Sedimentprobe zu quantitativen Erfassung aller Analyten weitere 8 h mit *n*-Hexan extrahiert werden. Die Extrakte werden anschließend vereinigt und der weiteren Aufarbeitung zugeführt.

SOP SPE-S: Phasentrennung und Festphasenextraktion (SPE)

Phasentrennung der wäßrigen und organischen n-Hexan-Phase durch Tiefgefrieren

Das am Rotationsverdampfer auf 50 ml eingeeengte Sedimentextrakt wird zur Separation der wäßrigen und organischen Phase in einem 250 mL-Rundkolben bei 253 K tiefgefroren. Anschließend wird die flüssige organische Phase in einen 50 mL-Spitzkolben überführt und die feste Wasser-(Eis)Phase wird 2-3 mal mit je 5 mL *n*-Hexan gespült. Dabei ist besonders darauf zu achten, daß auftauendes Wasser nicht mit überführt wird. Eventuell vorhandene Reste von organischen Lösungsmitteln in der wäßrigen Phase werden, wenn diese vollständig aufgetaut ist, bei 100 mbar und (313 K) am Rotationsverdampfer abdestilliert.

Festphasenextraktion über 1000 mg SPE-Kartuschen (RP18-Phase)

Für die Festphasenextraktion werden Glas-Kartuschen verwendet, die mit 1000 mg der RP 18 Festphase (Fa. Baker-Bond) gepackt sind. Die Kartuschen werden mit je 5 mL Methanol und 5 mL Wasser für die Extraktion der Wasser-Phase konditioniert. Anschließend wird direkt die zu extrahierende Wasserprobe aufgegeben. Die Analyten können fraktioniert eluiert werden, wobei die Analyten mit Hilfe von Lösungsmittel steigender Polarität von der Festphase desorbiert werden.

1. Fraktion: 5 mL *n*-Hexan
2. Faktion: 5 mL *n*-Hexan / Essigester (4:1)
3. Faktion: 5 mL Essigester (nur wahlweise)

Die Festphase enthält, je nach Schwebstoffgehalt der Probe, unterschiedliche Mengen an Wasser welches durch die organischen Lösungsmittel zusammen mit den entsprechenden Analyten von der Festphase mit eluiert wird. Es ist wichtig die Eluate vor weiteren Clean-up Schritten zu trocknen. Im Fall der Sedimentaufarbeitung erfolgt die Trocknung der Eluate durch ausfrieren des Wasseranteils. Die erhalten Eluate unterschiedlicher Polarität werden nach der Trocknung vereinigt und am Rotationsverdampfer auf 4,5 mL eingeeengt.

SOP SoxE-B: Soxhlet-Extraktion von Biotaprogen

Allgemeine Angaben

Die Apparatur besteht aus sechs einzeln regelbaren 250 mL-Heizpilzen und dazugehörigen Soxhlets mit einem Extraktionshülsvolumen von entweder 30 oder 100 mL. Die aufsitzenden Rückflußkühler mit Calciumchlorid- bzw. Aktivkohleröhrchen sind an einen Wasserkreislauf angeschlossen.

Reinigung der Apparatur

a) Grobreinigung zur Entfernung von Na_2SO_4 - und ähnlichen Teilchen:

Soxhlets und Hülsen in Extranbad legen (1 Tag), mit Seralwasser (demineralisiert) abspülen, übliche Aceton/Hexan-Reinigung (siehe SOP: Reinigung von Glasgeräten).

b) Vorextraktion :

Kolben mit etwa 130 mL Lösungsmittel befüllen (hierbei wird das Lösungsmittel oder –Gemisch verwendet, das auch bei der Extraktion zum Einsatz kommt), Hülsen etwa 1 mm hoch mit geglühtem Seesand versehen (2 h, $>650^\circ\text{C}$ erhitzt) und einsetzen, Apparatur zusammensetzen, Kühlung anstellen, Schläuche und Verbindungen auf Dichtigkeit prüfen, Regler auf 4-5 stellen. Mindestens zwei Stunden laufen lassen. Ausstellen; Unmittelbar vor dem Befüllen mit Probe ausleeren (Behälter für Lömi-Weiterverwertung).

Befüllen der Soxhlets

a) Hülsen

Die aus Quarzglas bestehenden Hülsen mit einer Büroklammer o.ä. aus der vorextrahierten Apparatur nehmen (möglichst nicht mit den Fingern berühren) und auf den mit einer Alufolie (alternativ: Becherglas) vorbereiteten Waagenteller stellen. Das pulverige Homogenat (siehe SOP Homogenisierung) sollte bei den 30 mL Hülsen über einen Pulvertrichter (Glas) eingefüllt werden (Waage vorm Einfüllen tarieren). Gewicht notieren.

b) 250 mL-Kolben

Die Kolben werden mit einer definierten Menge an Lösungsmittel gefüllt. Zum Abmessen benutzt man einen vorher gespülten Meßzylinder. Bewährt haben sich 120 mL Lösungsmittel im Falle der 30 mL- und 150 mL für die 100 mL-Soxhlets.

Extraktion

Wenn die Anlage komplett befüllt ist und zusammengebaut ist wird erst die Kühlung angestellt, nochmals auf Dichtheit geprüft und dann die Regler auf etwa 3 gestellt. Während der Extraktion sollte zumindest die erste halbe Stunde (oder bis zum ersten Rücklauf) die Apparatur beaufsichtigt sein. Danach öfter mal nachsehen.

Lösungsmittel: n-Hexan/Aceton 1:1; 8 h

Ende der Extraktion

Nach Ablauf der Zeit erst die Regler auf Null stellen, etwa 10 min warten, dann die Kühlung ausdrehen. Apparatur abkühlen lassen.

Leeren der Apparatur

Es befindet sich meistens noch Lösungsmittel im Hülsenraum. Die Hülse wird deshalb unterm Abzug mit der o. g. Büroklammer langsam herausgenommen und zum Abdampfen in eine Kristallisierschale gestellt, wobei das Extraktionsmittel im Hülsenraum verbleibt. Dieses wird dann in den 250 mL-Kolben geschüttet, wobei man auf die Ausrichtung des Soxhlets achten sollte.

Entsorgung

Die trockenen Extraktionshülsen werden mit Leitungswasser ausgespült. Danach ins Extranbad legen.

5. Einengen und Lösungsmittelwechsel

SOP Rot: Einengen und Lösungsmittelwechsel

Einengen des Lösungsmittelvolumens am Rotationsverdampfer

Die nach der Extraktion erhaltenen 200 mL des Extraktionsmittels werden in einem 250mL-Rundkolben am Rotationsverdampfer auf ca. 20 mL eingengt und anschließend in einen 50 mL-Spitzkolben überführt. Temperatur und Druckeinstellung am Rotationsverdampfer variieren entsprechend der verwendeten Lösungsmittel:

<i>n</i> -Hexan:	360 mbar	313 K (40 °C)
<i>n</i> -Hexan/Dichlormethan (4 / 1):	580-400 mbar	313 K (40 °C)

Für Probenextraktvolumina zwischen 25 und 50 mL werden 50 mL-Spitzkolben zum Einengen der Lösungsmittel verwendet. Je nach Belastungssituation der Proben können Kolben mit ausgezogener Spitze (Spitzenverengung) oder Standard-Spitzkolben verwendet werden. Für die unterschiedlichen Schliffmate der Rotationsverdampferhülse und der Kolben wird ein Reduzierübergangstück, Schliffgröße NS 29 auf NS 14,5, verwendet. Temperatur und

Druckeinstellung am Rotationsverdampfer variieren entsprechend den verwendeten Lösungsmittel:

<i>n</i> -Hexan:	360 mbar	313 K (40 °C)
<i>n</i> -Hexan/Dichlormethan:(90 / 10)	380 mbar	313 K (40 °C)
(40 /60)	580-400 mbar	313 K (40 °C)
Dichlormethan	580 mbar	313 K (40 °C)
Aceton	450 mbar	313 K (40 °C)
Cyclohexan/EE	330 mbar	

Hierbei werden die leichter flüchtigen Lösungsmittel zuerst entfernt, so daß der Druck entsprechend dem Siedeverhalten der Lösungsmittel nachreguliert werden muß. Die Probenextrakte werden auf ca. 6 mL Volumen eingengt und anschließend mit Hilfe einer 2 mL-Einmalpipette in einen 10 mL-Spitzkolben mit ausgezogener Spitze überführt. Hierbei wird der 50 mL-Kolben 2- 3mal mit je 1 mL *n*-Hexan nachgespült. Nun wird entsprechend der Belastungssituation und speziellen Probenmatrix auf ein Probenvolumen zwischen 1,5 und 0,5 mL eingengt.

Zugabe eines höhersiedenden Lösungsmittels als „Keeper“

Bei einem Probenextraktvolumen von ca. 2-3 mL kann der Probe ein höhersiedendes Lösungsmittel als "Substanz-Keeper" zugefügt werden. Hierfür werden 150-400 µL Isooctan oder Toluol, abgemessen durch eine HPLC-Spritze, dem Probenextrakt zugegeben, der dann anschließend auf das zugegebene Isooctan-Volumen eingengt wird.

6. GPC

SOP GPC: Gelpermeationschromatographie (GPC)

Allgemeine Beschreibung:

Zur Abtrennung von makromolekularen Verunreinigungen wird die GPC eingesetzt, die eine Auftrennung nach der Molekülgröße ermöglicht. Es kommt eine selbstgepackte Säule (Glassäule der Firma Latex: M 2-48; Innendurchmesser: 20 mm; Länge: 48 cm; Füllvolumen: 50 - 132 mL), gefüllt mit Biobead SX3 (Füllhöhe: 30 cm), zum Einsatz. Als Laufmittel wird eine 1:1-Mischung von Essigester und Cyclohexan verwendet. Die GPC-Säule ist mit einer HPLC-Pumpe (Merck L 6200) verbunden und mit einem UV-Detektor (Merck L 4006; mit Deuteriumlampe) ausgestattet.

Standard-Arbeitsbedingungen:

- Laufmittel:** Cyclohexan und Essigester (zur Rückstandsanalytik; Merck) im Verhältnis 1:1.
Zur Herstellung des Gemisches werden jeweils 2,5 L-Braunglasflaschen (Originalgebinde) an die Pumpe angeschlossen (Einlaß A: EE; Einlaß C: Cyclohexan).
- Flow:** 2,7 mL/min (große Säule), 1,5 mL/min (kleine Säule). (Weiteres s. Gerätebuch GPC)
- Injiziertes Volumen:** 2 mL (Ein Volumen zwischen 0,5 und 5 mL ist möglich. Es ist aber zu beachten, daß sich bei unterschiedlichen injizierten Volumina Verschiebungen der Retentionszeiten der Zielsubstanzen ergeben können. Bei der großen Säule ist eine Fettmenge von mehr als 1 g zu vermeiden, da es ansonsten zu einer Überladung der Säule kommt. (Kleine Säule: 0,2 - 0,5 g)
- UV-Detektor:** Auf größte Empfindlichkeit einstellen („Recorder Range“ auf 0,001;).
Wellenlänge: 254 nm.

Als *Druck-Maximum* sind für die große Säule 30 bar einzustellen. Für die kleine Säule ist die Einstellung 80 bar. Vor Beginn des ersten Tageslaufes muß das System von Luft befreit werden. Dazu muß an der Pumpe die Ventilschraube geöffnet werden und für ca 2 min „gepurged“ werden.

Auf gründliches Spülen der Säule nach jedem Lauf (mindestens 30 min, bei einer gesamten Laufzeit von ca 60 min) ist zu achten. Außerdem ist auf ein gründliches Spülen auch des Injektors zu achten. Dazu sollte er mehrfach auf und zu gedreht werden. Bei der großen GPC-Säule ist es nicht möglich, die Zusammensetzung des Laufmittel-Gemisches zu verändern, da es durch unterschiedliches Quellen zu einer Veränderung der Packungsdichte der Säule kommt, die nicht durch Veränderung der Stempelstellungen o. ä. ausgeglichen werden kann.

Fraktionierung

Um ein reproduzierbares Schneiden der Fraktionen zu gewährleisten, müssen für alle zu untersuchenden Verbindungsklassen Kontrollläufe mit Standardmischungen zur Bestimmung der Retentionszeiten durchgeführt werden. Diese müssen mindestens monatlich wiederholt werden, da es durch Veränderungen an der Säule zu Verschiebungen der Retentionszeiten kommen kann.

Das Erscheinen der Standardsubstanzen kann mit Hilfe des UV-Detektors verfolgt werden, allerdings sind zusätzlich WFR mit einer Quantifizierung der Einzelsubstanzen nötig.

Wechsel der Säulen

Die GPC-Anlage kann im Wechsel mit zwei verschiedenen Säulen betrieben werden, ohne daß eine Neuinstallation bzw. ein Umbau nötig sind. Neben der großen Säule ist eine kleine Säule (Länge: 30 cm, Innendurchmesser: 7,5 mm, Füllmaterial: Polygel der Firma Polymer Laboratories, Amherst, MA, USA; Partikelgröße 5 µm) fest eingebaut. Um die kleinere Säule in Betrieb zu nehmen, muß das Umschaltventil (an der rechten Seite der HPLC-Anlage) von Einstellung „G“ auf „K“ umgestellt werden.

Eintragungen in das Gerätejournal

Jeder Nutzer trägt jeden GPC-Lauf in das ausliegende Gerätejournal ein. Damit bleibt der Zustand der Säule in bezug auf Kontaminationen und Packungsdichte kontrollierbar, und etwaige Veränderungen sind gegebenenfalls interpretierbar.

7. Silica-Fraktionierung

SOP SiF: Silica-Fraktionierung

Füllen der Mini-Säulen

Es werden Bakerbond SPE Glas-Extraktions-Säulen (8 mL) mit PTFE-Fritten verwendet, die mit 2 g Kieselgel z.A. für die Flash-Chromatographie (Partikelgröße 30-60 µm, J.T. Baker, Deventer, Holland) gefüllt werden. Die Glas-Säulen werden vor der Verwendung analog zu anderen Glasgeräten gespült. Die untere PTFE-Fritte wird vor dem Spülen mit den organischen Lösungsmitteln eingesetzt. Beim Befüllen mit Kieselgel ist durch leichtes Klopfen an die Säule eine möglichst dichte Packung herbeizuführen. Die obere PTFE-Fritte wird ohne nachfolgendes Spülen mit Hilfe einer Pinzette fest auf das Kieselgel aufgesetzt. Um Kontaminationen zu verhindern, müssen Berührungen mit den Fingern vermieden werden.

Aktivierung

Die gepackten Säulen werden für 15 Stunden bei 393 K (120 °C) im Trockenschrank getrocknet.

Fraktionierung

Die auf etwa 0,5-1 mL eingeeengte, in *n*-Hexan bzw. *iso*-Oktan gelöste Probe wird mit Hilfe einer Pasteurpipette aufgetragen. Kolben und der Innenrand der Glassäule werden anschließend mit kleinen Mengen *n*-Hexan nachgespült, wobei darauf zu achten ist, daß zwischenzeitlich das Lösungsmittel vollständig in die PTFE-Fritte eingedrungen ist, die Kieselgel-Säule aber auf keinen Fall trocken gelaufen ist. Es werden jeweils 8 mL der folgenden Lösungsmittel(gemische) verwendet. Sie werden mit jeweils neuen Pasteurpipetten aufgetragen. Zwischen den einzelnen Fraktionen ist auf ein vollständiges Eindringen der Lösungsmittel zu achten, damit es zu scharfen Trennungen kommt.

1. Fraktion: *n*-Hexan
2. Fraktion: *n*-Hexan/Dichlormethan 90:10
3. Fraktion: *n*-Hexan/Dichlormethan 40:60
4. Fraktion: Dichlormethan
5. Fraktion: Dichlormethan/Essigester 1:1
6. Fraktion: Essigester
7. Fraktion: Aceton (entfällt bei Biota-/Sediment-Proben)
8. Fraktion: Methanol (entfällt bei Biota-Proben)

Die einzelnen Fraktionen werden jeweils in 8 mL-Probengläschen mit Schraubdeckel aufgefangen.

8. SPMDs

SOP SPMD: Semi-permeable-membrane-devices (SPMDs)

1. Vorbereitung:

Die Polyethylen-Schläuche werden in ca. 115 cm lange Stücke geschnitten und 2 x 24 Stunden in 1 Liter - Erlenmeyerkolben mit einer *n*-Hexan-Dichlormethan-Lösung (4 : 1) vorgereinigt.

2. Präparation

Die gereinigten Folien („Membranen“) werden ca. 7 cm von einem Ende entfernt verschweißt und der 7 cm lange Überstand zu einer Lasche verschmolzen. Dazu wird ein Folienschweißgerät (Polystar 242) verwendet. Die Masse der Membran wird in einem 250 mL Becherglas auf einer Mikrowaage (Mettler AT201) bestimmt. Mit einer Pasteurpipette werden ca. 0,910 mg (1mL) Triolein in die Membran pipettiert. Bei diesem Vorgang sollte die Membran möglichst nicht mit der Pipette berührt werden. Das Triolein wird auf einer glatten Unterlage mit einem Metallstab gleichmäßig innerhalb der Folie verteilt und die Luft ausgedrückt. 100 cm von der ersten Schweißnaht entfernt wird die Membran erneut verschweißt. Dabei ist darauf zu achten, daß keine Luft in dem mit Triolein gefüllten Raum eingeschlossen wird oder Fett austritt. Auch an diesem Ende wird eine Lasche angebracht. Nach Abschluß der Präparation werden die Membranen in Alufolie gewickelt, um eventuelle Verunreinigungen durch die Luft auszuschließen. Die exakte Länge und die genaue Einwaage an Triolein werden notiert.

3. Exposition

Die Exposition der SPMDs erfolgt in eigens hierfür hergestellten Aluminiumrahmen. Die Rahmen besitzen eine Länge von 60 cm, eine Breite von 39 cm und sind mit einer Spannvorrichtung aus Aluminium und Edelstahl versehen. In jedem Rahmen können 12 SPMDs eingesetzt werden. Um Kontaminationen zu vermeiden, dürfen die Membranen beim Einsetzen in die Rahmen keinesfalls berührt werden. Zum Festhalten können Pinzetten, die wie die verwendeten Glasgeräte gespült wurden, verwendet werden. Um Kontaminationen zu vermeiden ist bei der Herstellung und Wartung der Rahmen der Kontakt mit Mineralölen oder anderen Schmiermitteln zu vermeiden.

4. Probenahme

Nach der Exposition werden die SPMDs zum Zweck der anschließenden Analyse aus dem Rahmen vorsichtig gelöst, ohne dabei in Berührung mit Fremdgegenständen zu kommen, und direkt in ein vorgereinigtes 250 mL-Braunglas überführt und sofort fest verschlossen.

5. Dialyse

Nach den Probenahmen werden die Membranen in 250 mL-Braungläser mit Schraubdeckel überführt. Die Gläser dienen dem Transport und der sich im Labor anschließenden Dialyse. Dialysiert wird zweimal 24 Stunden mit jeweils ca. 80 mL *n*-Hexan-DCM-Lösung (4 : 1). Das Extraktionsmittel wird in einen 250 mL-Rundkolben überführt, wobei jeweils mit 20 mL Lösungsmittel nachgespült wird.

6. Clean-up

Die Probenaufarbeitung erfolgt nun analog der Biota-Proben. (SOP GPC → SOP SiF)

9. Überführung von Probenextrakten in DMSO

SOP-LW-DMSO

Die Proben liegen nach der Extraktion bzw. der jeweiligen Clean-Up-Schritte in einem 6 mL-Glasvial in *iso*-Oktan bzw. *n*-Hexan gelöst vor. Es wird je nach Belastungsstärke der Probe ein unterschiedliches DMSO-Volumen auf die Probe gegeben (250-1500 µL), hierbei ist zu beachten das die Menge DMSO ausreicht, um alle Inhaltsstoffe der Probe zu lösen, so daß keine Partikel oder Feststoffe vorhanden sind. Da sowohl *iso*-Oktan als auch *n*-Hexan nicht mit DMSO mischbar sind, ist eine Phasengrenze zwischen der Probe und DMSO gut erkennbar. Durch schütteln werden die beiden Lösungen vermengt. Es sollte sich bereits anhand der Färbung erkennen lassen, daß die Inhaltsstoffe von der organischen Phase in die DMSO-Phase wechseln. Für eine bessere Durchmischung und Extraktion der organischen Phase werden die Lösungen 10 min im Ultraschallbad homogenisiert. Anschließend wird die organische Phase unter N₂-Strom abgedampft, hierbei sollte das Probenvial zusätzlich auf ca. 30 °C (303 K) temperiert sein, um ein Ausfrieren von DMSO zu vermeiden. Der Siedepunkt von DMSO liegt mit 190 °C (463 K) weit über den Siedepunkten der meisten verwendeten organischen Lösemitteln, so daß diese bequem aus der Probe entfernt werden können. Es muß jedoch vorher sichergestellt sein, das diese nicht mit DMSO mischbar sind, dadurch wäre ein Abdampfen unter Stickstoff schwieriger und erfolgt häufig nur unvollständig.

9. Probenbeschriftung

SOP PName: Probenbeschriftung

Beschriftungsvorlage

AA97BB
C-DD-Nr.
Datum

Bsp.:

AL97SW
W-HHN-17.1
P 14.10.97

A) Projektkennung

AL : ALOSON

OR : ORSIN

B) Bindende Namenskürzel

BB : Bianca Bethan

SB : Scarlett Biselli

SW : Stefan Weigel

NP : Nils Peters

NR : Ninja Reineke

C) Art der Probe

W : Wasser

SE : Sediment

SS : Schwebstoff

R : Regen

PM : SPMD

B : Biota

F : Fisch

H : Mensch

B : Biota

M: Muschel

Le : Leber

Lu : Lunge

Fe : Fett

Hi : Hirn

Mu : Muskelfleisch

Go : Gonade

D) Ort

FL : Flensburg

HU : Husum

SV : Seglerverein

STM : Stadtmitte

BÜS : Büsum

CUX : Cuxhafen

WH : Wilhemshaven

KAP : Kappeln

HLH : Heiligenhafen

NIE : Niendorf

WIS : Wismar

WA : Warnemünde

KS : Kiel Schilksee

WE : Wedel

SCH : Schulau

HH : Hamburg

HHN : Hamburg-Neumühlen

Datum

P : Datum der Probenahme

A : Datum des Aufarbeitens/Abfüllens

Die experimentelle Vorgehensweise hinsichtlich der in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen durchgeführten toxikologischen Biotests wird im folgenden dargestellt:

1. **Leuchtbakterientest**
2. **Ara-Test**
3. **MCF7-Luciferase -Reporter-Gen-Assay**

11. Lumineszenzhemmtest

1. Allgemeine Beschreibung:

Die Bestimmung der akuten Toxizität mit Hilfe von Leuchtbakterien erfolgt mit einem Luminometer der Firma Dr. Lange, LUMISmini. Zur Temperierung der Küvetten auf 15 °C (288 K) wird ein Thermostat (LUMIStherm) verwendet. Das Meßgerät ist an einen Drucker (LD 500) angeschlossen, der am Ende jeder Messung die Ergebnisse ausdrückt. Die verwendeten Leuchtbakterien LCK 480 sind konserviert und tiefgefroren (-18°C/255 K). Das Abmessen der Volumina erfolgt mit einstellbaren Eppendorfpipetten.

2. Durchführung:

Als erstes muss der Thermostat angestellt werden, da dieser einige Minuten benötigt, um die erforderlichen 15 °C (288 K) zu erreichen. Danach wird die Reaktivierungslösung bei Raumtemperatur im Wasserbad aufgetaut, gut geschüttelt und für mindestens 15 min im Thermostaten temperiert. Während dieser Zeit NaCl abwiegen (0.040 g (0.030 g) für 2 mL (1.5 mL) Probe, damit sich eine 2 %ige Lösung ergibt). Anschließend werden die Küvetten in den Meßschächten des Thermostaten aufgestellt. Die Leuchtbakterienkultur muss nun 2 min lang unter Schütteln im Wasserbad bei Raumtemperatur auftauen. Sie wird mit 500 µL Reaktivierungslösung versetzt, unter Schwenken vollständig gelöst und für 15 min in den Vorratsschacht gestellt. Während dieser Zeit können die Proben in die Küvetten umgefüllt und zum Temperieren in die A-Reihe des Thermostaten gestellt werden (In A 1 wird immer eine 2 %-ige NaCl-Lösung als Kontrolle mitgemessen). Nach der 15 min Temperierung wird die Leuchtbakteriensuspension in die restliche Reaktivierungslösung pipettiert (2mal Nachspülen durch Pipettieren mit der Reaktivierungslösung selbst) und geschüttelt. Jeweils 500 µL der Bakteriensuspension werden in die Küvetten der Reihen B (Kontrollreihe) und C (Probenreihe) geben. Dort müssen sie weitere 15 min inkubieren. Während dieser Zeit wird das Meßgerät eingestellt (Art des Tests, Probenzahl, Zeit der Chemikalieneinwirkung): Man beginnt mit Test 484 zur Messung der Standardlösung (7.5 %ige NaCl, die zwischen 40 und 60% Hemmung ergibt), im Anschluß daran erfolgt Test 488 (30 min, 9 Proben). Zuerst wird das Ausgangsleuchten gemessen: Als erstes B 1 (Nullküvette) vermessen, dann 500 µL NaCl-Lösung (2%) in B 1 dazu pipettieren. Als zweites C 1 (Probenküvette) messen und anschließend 500 µL Probe hinzugeben. So wird mit den weiteren Küvetten (bis B 9 und C 9) auch verfahren. Zur Messung des Endleuchtens nach 30 min werden wie zuvor nacheinander die Küvetten B 1, dann C 1 usw. im Luminometer erfaßt. Die Ergebnisse werden am Ende der Messung automatisch ausgedruckt.

3. Sonstige Hinweise

Die Durchführung einer Messreihe dauert insgesamt ca. 2 h. In dieser Zeit können acht Proben, bzw. vier Doppelbestimmungen durchgeführt werden.

Wenn die Umgebungstemperatur deutlich höher ist als 15°C (288K), kann es passieren, daß die Küvetten beschlagen und somit die Werte stark streuen, da der Meßschacht nicht temperiert ist. Daher sollten die Küvetten jeweils direkt vor der Messung mit einem weichen Tuch abgewischt werden.

12. Arabinose-Resistenz-Test

*Durchführung des Ara-Tests mit *S. Typhimurium**

Der Ara-Test mit *S. Typhimurium* wurde nach einer Modifikation der Vorinkubationsmethode von Hera und Pueyo (1986) durchgeführt. Dieser Ansatz wurde sowohl auf Einzelsubstanzen als auch auf Schwebstoffextrakte angewendet.

Bakterienaufbewahrung, -anzucht und Vorbehandlung für die Tests

Frische Stammkulturen (ca. 10^9 Keime/mL) wurden in Nährlösung (Nutrient Broth Nr.2) unter Zusatz von 8 % DMSO bei -80°C (193 K) eingefroren. Zur Anzucht für die Tests wurden 10 mL Nährlösung mit 100 µL dieser Stammkultur beimpft und 7 Stunden bei 37°C (310 K) und Schütteln (90 Umdrehungen pro Minute) bebrütet. Die Nährlösung enthielt 25 mg/L Ampicillin. Für die Stämme BA 146 und BA 149 war außerdem der Zusatz von 10 mg/L Tetracyclin notwendig. Nach dieser Wachstumszeit hatten die Bakterien eine Dichte von 5×10^9 Keimen/mL erreicht. Jeder Stamm wurde mit Davis-Mingioli (DM)-Medium auf 5×10^8 Keime/mL verdünnt. Für die Ansätze mit metabolischer Aktivierung wurden kurz vor Gebrauch 150 µL S9-Fraktion zu 5 ml Bakteriensuspension zugefügt.

Mutagenesetest

In 5-mL-Polypropylenröhrchen wurden 20 µL 10fach konzentriertes DM-Medium mit 2,5 mg/mL D-GLUCOSE und 750 µg/mL L-HISTIDIN vorgelegt. Bei den Ansätzen mit metabolischer Aktivierung enthielt das Medium zusätzlich die S9-Cofaktoren. 140 µL Testsubstanz- bzw. Extraktprobenlösung (max. 5 % DMSO) wurden dazugegeben. Die Vorinkubation wurde durch Hinzufügen von 50 µL Bakteriensuspension und kräftiges Mischen des Ansatzes gestartet. Nach 2stündiger Inkubation bei 37°C (310 K) und Schütteln (90 Umdrehungen pro Minute) wurden 2 mL Weichagar dazugegeben und die Mischung auf Selektiv- bzw. Minimalagar gebracht. Die Inkubation der Selektivagarplatten (für den Mutagenesetest) erfolgte 72 Stunden bei 37°C (310 K).

Tabelle A1 a: Phänotypische Merkmale der in dieser Arbeit verwendeten Ara-Stämme von *S. typhimurium*.

– kein Bakterienwachstum, höchstens einzelne Mutantenkolonien, + Wachstum eines dichten Bakterienrasens.				
	BA 9	BA 14	BA 146	BA 149
Ara-Sensitivität	–	–	–	–
Ampicillin	+	+	+	+
Tetracyclin	–	–	+	+
EMB-Agar	–	–	–	–
UV-Sensitivität	–	–	–	–

Tabelle A1b: Spontanmutationsraten der *Salmonella*-Stämme des Ara-Tests bei Zugabe von DMSO.

	BA 9	BA 14	BA 146	BA 149
ohne S9-Mix	66 ± 15	75 ± 15	84 ± 13	82 ± 12
mit S9-Mix	57 ± 14	65 ± 10	98 ± 10	108 ± 18
n =	60	60	40	40

Überprüfung der Phänotypen

Zu jedem Versuch wurden die Phänotypen der verwendeten Stämme routinemäßig überprüft. Zu diesem Zweck wurden Kontrollplatten mit Zusatz von Antibiotika (Nähragar plus Antibiotikum) hergestellt. Die Arabinose-Sensitivität wurde auf Selektivagarplatten geprüft. Auf Eosin- gelb- Methyleneblau(EMB)- oder Kristallviolett-Agar konnte die Zellwandpermeabilität geprüft werden. Zusätzlich wurde die Empfindlichkeit gegenüber UV-Licht auf Nähragar getestet. Es wurde jeweils ein Tropfen (ca. 20 µL) der vorbereiteten Kultur (ca. 5 x 10⁸ Keime/mL) auf die entsprechende Platte gegeben und 24 Stunden bei 37°C (310 K) inkubiert. Im Falle des UV-Tests wurde die Platte mit dem Tropfen der Bakteriensuspension zuvor 20 Sekunden ohne Deckel von einer UV-Lampe (3 Watt) aus ca. 15 cm Entfernung bestrahlt. Tabelle 1a bezeichnet die Phänotypen der verwendeten *S. typhimurium*-Stämme. Die Zahl der Spontanmutanten pro Platte war mit und ohne Lösungsmittelzugabe nur unwesentlich verschieden (Tabelle 1b).

Anlage der Tests und Auswertung

Bei jeder Testsubstanzdosis bzw. Extraktprobe wurden für jeden Stamm drei Parallelansätze angelegt und jedes Experiment einmal unabhängig wiederholt. Daneben wurden – in jeweils dreifacher Ausführung – für jeden Stamm die Zahl der Spontanmutanten bestimmt (Lösungsmittel ohne Testsubstanz) sowie Referenzsubstanzen eingesetzt. Die Zahl der Bakterienkolonien wurde von einem automatischen Koloniezählgerät (Artek Counter 880) erfaßt.

Der mutagene Effekt ergab sich als Induktionsrate (IR):

$$IR = \frac{\text{Zahl der induzierten Mutanten (I)}}{\text{Zahl der spontanen Mutanten (S)}}$$

13. MCF7-Luc-Reporter-Gen-Assay

Material und Methoden

Zell-Linien

Für den bioanalytischen Nachweis der Wirkungspotentiale wurden Rezeptor-Reporter-Gen-Assays eingesetzt unter Verwendung von vier Typen gentechnisch veränderter humaner Zell-Linien.

MCF7-Luc oder MVLN-Zellen

Bei den MVLN-Zellen handelt es sich um humane MCF-7 Brustkrebszellen, die mit einem Östrogen-Rezeptor-kontrollierten Luciferase-Reporter-Gen (ERE-Gal4-Luc-SVNeo Plasmid) stabil transfiziert wurden (Pons *et al.* 1990). Diese Zell-Linie wurde uns von John P Giesy und Alan Blanckenship (Dept. Fisheries & Wildlife, Pesticide Research Centre & Institute on Environmental Toxicology, Michigan State University, East Lansing, USA zur Verfügung gestellt. Die Erlaubnis zur Nutzung der MVLN-Zellen wurde von Jean-Claude Nicolas, Institut National de la Sante' et de la Recherche Medicale" (INSERM 439, Montpellier, France) erteilt.

MELN-Zellen

Bei den MELN-Zellen handelt es sich um eine andere von MCF-7 Zellen abgeleitete Linie. Sie wurde stabil mit einem ERE- β -Glob-Luc-SVNeo Plasmid transfiziert (Balaguer *et al.* 1998). Diese Zellen beinhalten einen stärkeren Promoter als die MVLN-Zellen. Dies ermöglicht eine höhere Expression des Reporter-Gens bei gleicher Stimulation, was diese Zellen besonders für Untersuchungen an Stoffen oder Stoffgemischen mit niedrigen östrogenen Potentialen qualifiziert.

HELN-RE α - oder HeLa ER α -Zellen

Hierbei handelt es sich um humane *Cervix uteri* Krebszellen (HeLa). Im Gegensatz zu den MCF-7 Zellen verfügen diese von Natur aus über keine Östrogenrezeptoren (ER). Sie wurden mit dem ERE- β -Glob-Luc-SVNeo und dem pSG5ER- α -puro Plasmid stabil cotransfiziert (Balaguer *et al.* 1998). Da diese Zellen nicht in der Lage sind, endogene ER zu bilden, werden mit diesem Bioassay nur Interaktionen mit dem ER vom Typ alpha (ER α) erfaßt.

HELN-ER β - oder HeLa ER β -Zellen

Im Gegensatz zu den HeLa ER α -Zellen wurde diese Zell-Linie durch Transfektion mit dem Plasmid pSG5ER β puro mit einem ER von Typ beta (ER β) ausgestattet.

Der MCF-7 ERE-Luciferase (MVLN)-Biotest

Der *in vitro* Bioassay der mit dem Rezeptor-Reporter-Gen transfizierte MCF-7 Zelllinie ist eine bioanalytische Methode zur Identifizierung von östrogenen und antiöstrogenen Stoffen. Damit können reine Chemikalien oder komplexe Umweltmischungen untersucht werden.

Das Prinzip des Systems besteht darin, daß Substanzen wie 17-beta-Östradiol (E2) oder andere östrogene Agonisten an den Östrogen-Rezeptor binden und entsprechend die Expression von „firefly“-Luciferase promovieren. Diese Enzym-Aktivität wird nach Zugabe der nötigen Substrate als hoch-sensitive Licht-Emission gemessen. Östrogene Antagonisten wie die Referenz-Substanz ZM 189, 154 (Astra-Zeneca Pharmaceuticals, Brixham, England; Beck et al. in prep.) können durch eine Minderung der Luciferase-Produktion in Abwesenheit oder/und in Gegenwart von 17-beta Östradiol bestimmt werden.

Zellen-Konservierung und Anzucht für die Tests

Frische Stammkulturen von MVLN-Zellen wurden in Wachstums-Medium unter Zugabe von 10% DMSO in Flüssigstickstoff eingefroren. Zur Wieder-Anzucht für die Experimente wurden 20 mL Wachstums-Medium mit einem 1 mL Aliquot der aufgetauten Zellsuspension beimpft und in einem Brutschrank bei 37°C (310 K), 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Adhärenz Zellen wurden in kontinuierlichen Stock-Kulturen gehalten bis zu einer maximalen Zelldichte von 80-90% Konfluenz. Entsprechend wurden für laufende Untersuchungen alle 34 Tage die Stock-Kulturen mit Trypsin/EDTA behandelt und zu 1:2 überimpft.

Durchführung des MCF-7 ERE-Luciferase (MVLN)-Biotests

Vorinkubation

In je einer Vertiefung der 96-Weh Kulturplatte wurden 250 μ L Zellsuspension ä 15000 Zellen in Hormonreduziertem Medium (HR-Medium) ausplattiert. Um Kontaminationen am Rande der Platten während der Arbeiten zu vermeiden, wurden die 36 äußeren Vertiefungen nur mit Dulbecco's PBS Lösung aufgefüllt. Innerhalb einer Inkubationszeit von ca. 24 Stunden hatten die Zellen eine Adhärenz zum Boden der Vertiefungen entwickelt.

Exposition

Das Medium wurde durch 200 μ L frisches HR-Medium ersetzt. Dazu wurden 50 μ L HR-Medium mit 5fachen Konzentrationen der Referenz-Substanzen und Proben bzw. Extrakte gegeben. Die Positiv- und Negativkontrollen bestanden aus 6 Standardverdünnungen der Referenzsubstanzen E2 (Agonist; im Konzentrationsbereich zwischen 0,5 pM und 5 nM) und ZM 186,154 (Antagonist; im Konzentrationsbereich zwischen 1 pM und 500 nM).

Die Lösungsmittel-Kontrollen wurden wie folgt angesetzt: 0,1% EtOH oder 0,1% DMSO im HR-Medium. Alle Versuchsansätze und Lösungsmittel-Kontrollen wurden in Triplikaten angesetzt. Als eine zusätzliche Kontrolle wurden 3 Vertiefungen mit insgesamt 250 μ L HR-Medium ausgefüllt (unbehandelte Zellen).

Bei den Ansätzen für einen Kompetitiven-Test zu 17-beta-Östradiol wurde das Medium in den für ZM 186,154 und den Proben bzw. Extrakten zugeteilten Vertiefungen statt durch 200 μ L nur durch 150 μ L frisches HR-Medium ersetzt. Hinzugefügt wurden zunächst 50 μ L Medium mit der Referenz-Substanz ZM 186,154 bzw. Extrakt und anschließend 50 μ L einer Lösung mit 0,5nM E2 in HR-Medium (Exposition-Konzentration zu den Zellen: 0,1 nM). Die Versuchsansätze wurden für ca. 72 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Messung Luciferase-Aktivität und Zytotoxizitätstest

Zur Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität wurde 100 μ L Kultur-Überstand von den Zellkulturplatten entnommen und jeweils in eine Vertiefung einer Mikrophotometerplatte gegeben. Nach Zusatz von 100 μ L des „Cytotoxicity Detection Kit“-Reagenz (Boehringer-Mannheim) wurde die abgedunkelte Mikrophotometerplatte für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ L einer 1N HCl Lösung je Vertiefung beendet. Anschließend wurde die Absorption im Mikrotiterphotometer bei 492 nm gemessen.

Das restliche Medium der 96-Weil-Zellkulturplatten wurde durch 100 μ L Lysis-Puffer pro Vertiefung ersetzt. Die Platte wurde abgedunkelt und bei Raumtemperatur für 15-20 Minuten abgelegt. Anschließend wurden 20 μ L des Zell-Lysats in einer weißen, für luminometrische Messungen geeignete Platte überführt und in das Mikrotiterluminometer eingeführt. Automatisch wurden für jede Vertiefung 50 μ L Luciferase-Assay-Reagenz zugegeben, und nach einer Reaktionszeit von 20 Sekunden wurde über eine Integrationszeit von 15 Sekunden die Licht-entwicklung gemessen.

Medien und Reagenzien

Wachstums-Medium: 900 mL Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium mit Ham's F-12 Nutrient Mixture (1:1) ohne Phenolrot, mit 1,2 g Natriumhydrogencarbonat, 15 mM HEPES Puffer und L-GLUTAMIN, pH 7,3, 80 mL Kalbserum, 1 mM Natrium-Pyruvat, 1 mM Rinder Insulin, 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung, 0,8 mg/mL Neomycin. Steril filtrieren und bei 4⁰C (277 K) lagern.

Hormon-Reduziertes (HR-Medium): 960 mL Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium mit Ham's F- 12 Nutrient Mixture (1:1) ohne Phenolrot, mit 1,2 g Natriumhydrogencarbonat, 15 mM HEPES Puffer und L-GLUTAMIN, pH 7.3, 30 ml dextran/charcoal stripped Kalbserum, 1 mM Natrium-Pyruvat, 1 mM Rinder Insulin. Steril filtrieren und bei 4⁰C (277 K) lagern.

Dulbecco's PBS Lösung mit Ca²⁺ und Mg²⁺: 2 g KCl, 2 g KH₂PO₄, 80 g NaCl, 11,5 g Na₂HPO₄, in 10 Liter Nanopurwasser. In 1 Liter dieser Lösung 0,1 g CaCl₂ wasserfrei und 0,1g MgCl₂, 6 H₂O zugeben, sterilfiltrieren und bei 4⁰ C (277 K) lagern.

Östradiol Stock-Lösung 10^{-3} M: 2,82 mg 17-beta-Östradiol in 10 mL Ethanol absolut. Lagerung bei 253 K (max. für 6-8 Monate).

ZM 189,154 Stock-Lösung 10^{-3} M: 5,88 mg ZM 189,154 in 10 mL Ethanol absolut. Lagerung bei 253 K (max. für 6-8 Monate).

Lysis-Puffer 5x: 125 mM Tris-phosphate (pH 7,8 mit H_3PO_4 einstellen), 10 mM EDTA, 6 mM DTT, 50 % (v:v) Glycerol, 5% (v:v) Triton X-100 in Nanopure-Wasser (Lagerung bei $-20^{\circ}C/253$ K). Kurz vor Gebrauch auf eine 1 x Lösung mit Nanopure-Wasser verdünnen.

Assay Puffer 2x: 40 mM Diglycin, 2,14 mM $MgCl_2$, 5,4 mM $MgSO_4$, 0,2 mM EDTA, 77,5 mM DTT in Nanopure-Wasser (pH 7,8). Lagern bei $-20^{\circ}C$ (253 K).

Luciferase-Assay Reagenz: 0,53 mM ATP (Stock Lösung 10^{-2} M: 121mg ATP in 20 mL Nanopure-Wasser, Lagerung bei 253 K), 0,27 mM Coenzym A (Stock Lösung 102 M: 10 mg Coenzym A in 1,303 mL Nanopure-Wasser, Lagerung bei 253 K), 0,48 mM (Stock Lösung 102 M: 10 mg Luciferin in 3,308 mL 10 mM Tris-Puffer pH 7,8, Lagerung bei $-20^{\circ}C/253$ K) in 2,5 mL Assay Puffer 2 x und 1,9 mL Nanopure-Wasser. Kurz vor Gebrauch vorbereiten und dunkel halten.

Luciferase Stock-Lösung: 1 mg Luciferase from firefly in 1mL Lysis-Puffer mit 1 mg/mL BSA bzw. Dulbecco's PBS Lösung mit Ca^{2+} und Mg^{2+} mit 1 mg/ml BSA.

Durchführung des MELN und HELN Biotestes (nach Balaguer *et al.* 1998)

Die Zellen wurden zunächst 3 Tage auf 24-Well Kulturplatten in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) ohne Phenol-Rot und supplementiert mit 3 % stripped Kalbserum kultiviert und anschließend über 16 Stunden mit den Standardsubstanzen bzw. Extrakten behandelt. Nach dieser Expositionszeit wurden die Zellen kurz mit 1 mL PBS gewaschen und mit 0.4 mL Lysis-Puffer (25 mM Tris-Phosphat pH 7,8, 2 mM EDTA, 10% Glycerol, 1% Triton X-100) für 10 Minuten inkubiert. Das Zell-Lysat wurde aus den Kulturplatten entnommen und kurz zentrifugiert. Nach Überführung von 100 μ L des Überstandes in LKB Küvetten wurde dann die Lichtentwicklung nach Zugabe von 100 μ L Luciferase-Assay Reagenz (20 mM Tricin pH 7,8, 1,07 mM $MgCO_3$, $MgO(II)$ 5 H_2O , 2,67 mM $MgSO_4$, 0,2 mM EDTA, 0,53 mM ATP, 0,27 mM Coenzym A, 0,48 mM Luciferin) über eine Integrationszeit von 10 Sekunden gemessen.

Vorbehandlung der Sedimentproben, die für die biotestgeleitete Analyse verwendet wurden:

Die aus den Sedimentationsbecken gewonnenen schwebstoffbürtigen Sedimente wurde bei 277K gelagert und innerhalb von maximal 3 Tagen weiterverarbeitet. Nach Zentrifugation des Probenmaterials bei 500 x g und 277 K wurde die überstehende Wasserphase dekantiert. Das verbleibende

feuchte Sediment wurde von Hand homogenisiert und für die nachfolgenden Untersuchungen und Extraktionen in Aliquote aufgeteilt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 203 K.

Tabelle A2: Wiederfindungsraten (WFR) und Bestimmungsgrenzen (BG) der Moschusverbindungen für Biotaprobieren ab dem Aufreinigungsschritt der GPC

Verbindung	WFR \pm (σ -n) [%] (n=5)	BG [ng/g Fett]
HHCB	75 \pm 3	8
AHTN	77 \pm 3	6
MX	84 \pm 5	2
MK	85 \pm 6	6
2-Amino-MX	71 \pm 3	5
4-Amino-MX	75 \pm 1	4
2-Amino-MK	66 \pm 4	4

Tabelle A3: Wiederfindungsraten (WFR), Standardabweichungen (Stabw.) und Bestimmungsgrenzen (BG) für Biotaprobieren im Konzentrationsbereich zwischen 5 und 500 ng/0,5 g Fett; Doppelinjektion und Quantifizierung Frkt = Substanz entstammt Fraktion #

Verbindung	P _{ow}	IS	WFR [%]					$(\sigma$ -n) [%]	BG ng/g Fett
			Frkt	5 ng	20 ng	100 ng	500 ng		
HaloKW									
Photo- <i>cis</i> -Chlordan		337/373	3			71	85	7	100
Photo- <i>cis</i> -Chlordan		337/373	3			71	85	7	100
Photo- <i>cis</i> -Chlordan		337/373	3			71	85	7	100
Photo-Heptachlor		301/337	3			81	84	2	100
Pentabromtoluol	7.0	265/280	1		79	84	82	3	20
Octachlorstyrol	6.2	308/343	1	78	86	92	85	5	5
Dieldrin	6.2	263/279	3		68	73	71	3	5
<i>p,p'</i> -DDT	6.19	165/235	2	97	81	98	89	7	5
Hexachlorbenzol	5.47 - 6.18	249/284	1,2	89	76	95	82	8	5
PCB-54	6.1	258/292	2	80	72	68	65	6	5
Oxychlordan	6.1	264/301	3		72	81	77	4	20
<i>cis</i> -Chlordan	6.0	237/266	2		85	89	89	2	20
<i>trans</i> -Chlordan	6.0	237/266	2		86	93	91	3	20
<i>o,p'</i> -DDT	5.75	165/235	2	97	82	94	88	6	5
<i>p,p'</i> -DDE	4.28 - 5.69	176/246	2	96	86	92	97	5	5
Heptachlor	5.44	237/272	2	81	96	92	85	6	5
<i>cis</i> -Heptachlorepoxyd	5.4	237/253	3		68	92	71	11	20
Hexachlorbutadien	4.78	190/225	1	96	91	98	96	3	5
α -HCH	3.8	181/219	3		68	65	70	3	20
ϵ -HCH		181/219	3		64	63	71	4	20
Duftstoffe + Metabolite									
Galaxolid (HHCB)	5.9	243/258	4,5	100	91	94	87	5	5
Tonalid (AHTN)	5.8	243/258	4,5	89	94	96	90	3	5
Moschusxylol (MX)	4.9 - 5.2	282	3		65	61	79	8	20
Moschusketon (MK)	4.2	279/294	4		78	87	98	10	20
4-Amino-MX		252/267	4		64	58	74	7	20
Anisole									
Pentachloranisol	5.7	237/265	3		81	83	80	2	20
Tribromanisol	4.48	331/346	3		78	68	87	8	20

Fortsetzung Tabelle A3

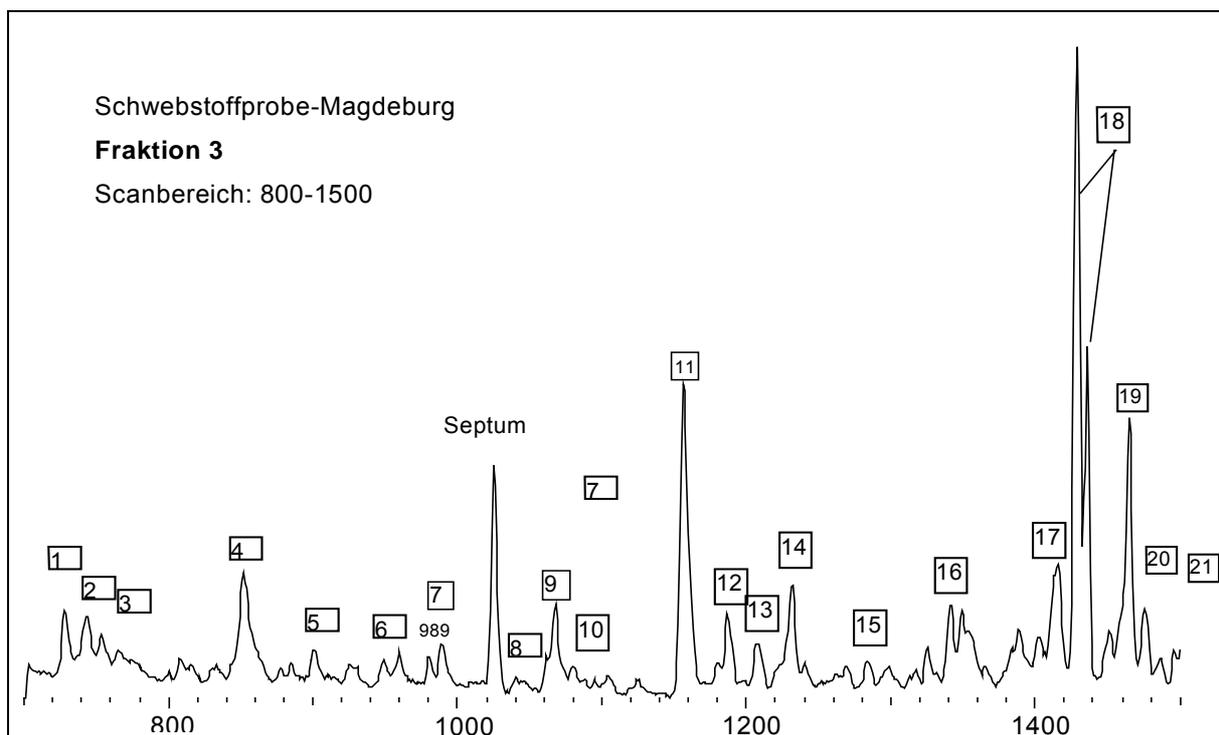
Verbindung	P _{ow}	IS	WFR[%]					(σ-n) [%]	BG ng/g Fett
			Frkt	5 ng	20 ng	100 ng	500 ng		
2,4-Dibromanisol		223/266	3		81	73	85	5	20
4-Methyl-2-nitroanisol		133/163	5,6		72		96	11	20
4-Nitroanisol	2.03	123/153	4		78	79	89	5	20
Phosphate									
Tri- <i>n</i> -butylphosphat	3.7	154	4,5		58	52	54	3	40
Tri- <i>iso</i> -butylphosphat	3.5	155/211	4,5		44	49	58	6	40
Acetanilide									
Metolachlor	3.45	162/238	5		58	61	68	5	40
Metazachlor	2.13	132/209	5		79	96	89	7	40
Phosphorsäureester									
Parathionmethyl	3.0	109/263	4	68	64	61	77	6	10
Malathion	2.89	149/173	5		40	41	45	3	10
Nitro-Aromaten									
1,2-Dichlor-4-nitrobenzol	3.0 - 3.29	145/191	3		70	75	73	3	20
1,4-Dichlor-2-nitrobenzol		145/191	3		69	72	68	2	20
1-Brom-2-nitrobenzol	2.5	155/201	3		79	78	84	3	20
1-Chlor-3-nitrobenzol	2.41 - 2.6	127/157	3		70	68	82	7	20
1-Chlor-4-nitrobenzol	2.39 - 2.58	127/157	3		79	74	89	7	20
4-Nitrotoluol	2.4 - 2.6	107/137	3		59	62	65	3	20
3-Nitrotoluol	2.4 - 2.6	107/137	3		49	45	51	3	20
2-Nitrotoluol	2.25 - 2.4	120	3		68	61	71	5	20
Nitrobenzol	1.85 - 2.0	123	3		28	32	23	4	20
Aniline									
2,5-Dichloranilin	2.8	161	3		74	79	72	3	20
2,4-Dichloranilin	2.6	161	4		74	79	72	3	20
Benzothiazole									
Benzothiazol		108/335	5		73	69	71	2	40
Carbamate									
Cycloat	3.9	154	5		5	6	12	4	40
Pirimicarb	1.8	166/238	5,6		71	68	72	5	40
Propham		137/179	5		64	65	55	2	40
Propoxur	1.56	110/152	5,6		62	68	58	5	40
Triazine									
Terbutylazin	3.03 - 3.06	214/229	5		74	68	78	5	20
Propazin	2.91 - 3.0	172/214	5		85	83	91	4	20
Atrazin	2.23 - 2.68	200/215	5		90	83	97	6	20
Simazin	1.5 - 2.34	173/186	5	75	82	81	84	8	10
Desethylterbutylazin		145/186	6	71	73	68	81	6	20
Secbumeton		196/225	6		93	87	100	4	10
Secbutylazin		200	5	74	72	75	92	5	10
Diverse									
Nonylphenol	4.48	121/135/ 149	3,4,5			41-60	44-68		100-200
bis(4-Chlorphenylsulfon)		159	4		82	89	86	3	40
Xanthenon		168/196	5		54	59	45	6	20

Tabelle A4: Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, die neben den bereits im Kapitel 3.4 aufgeführten Verbindungen im Proben-Extrakt der Elbe-Schwebstoffprobe bei Magdeburg identifiziert wurden

PAH	Hydrierte PAK	Sauerstoffhaltige PAH
Ethyl-naphthalin	Dihydronaphthalin	Benzofuran
Dimethylnaphthalin	Tetralin	Dibenzofuran
Trimethylnaphthalin	Diethyl-Tetrahydro-naphthalin	Methyldibenzofuran
Propylnaphthalin	9,10-Dihydrophenanthren	Benz-naphthofuran
Ethylmethylnaphthalin	Dimethyldihydrobenzazulen	Methylbenzonaphthofuran
Biphenyl	Trimethyltetrahydrochrysen	
Methylierte Biphenyle		
Phenyl-naphthalin	Schwefelhaltig PAH	Stickstoffhaltige PAH
Methylfluoren	Benzthiophen	9H-Carbazol
Methylphenanthren	Dibenzothiophen	Methyl-Carbazol
Ethylphenanthren	Ethyl-dibenzothiophen	
Dimethylphenanthren	Dimethyl-dibenzothiophen	
Benzo(a)fluoren		
Terphenyl		
Benz(a)anthracen		
Binaphthyl		
Phenylphenanthren		
Coronen		
	Alkylierte PAH	Aldehyde
9-Methylantracen	Dimethylphenanthren	Benzaldehyd
2,9-Dimethylantracen	Methylfluoren	Methylbenzaldehyd
9,10-Dimethylantracen	Dimethylfluoren	Dimethylbenzaldehyd
2,9,10-Trimethylantracen	Methylbenzonaphthothiophen	
	e	
2,3,9,10-Tetramethylantracen	Methylchrysen	
Methylphenanthren		
	sonstige	
9H-Fluoren	Acetophenon / Benzophenon	
9,10-Anthrachinon	Diphenylether	
Dimethoxyphenanthren	Methyldiphenylether	

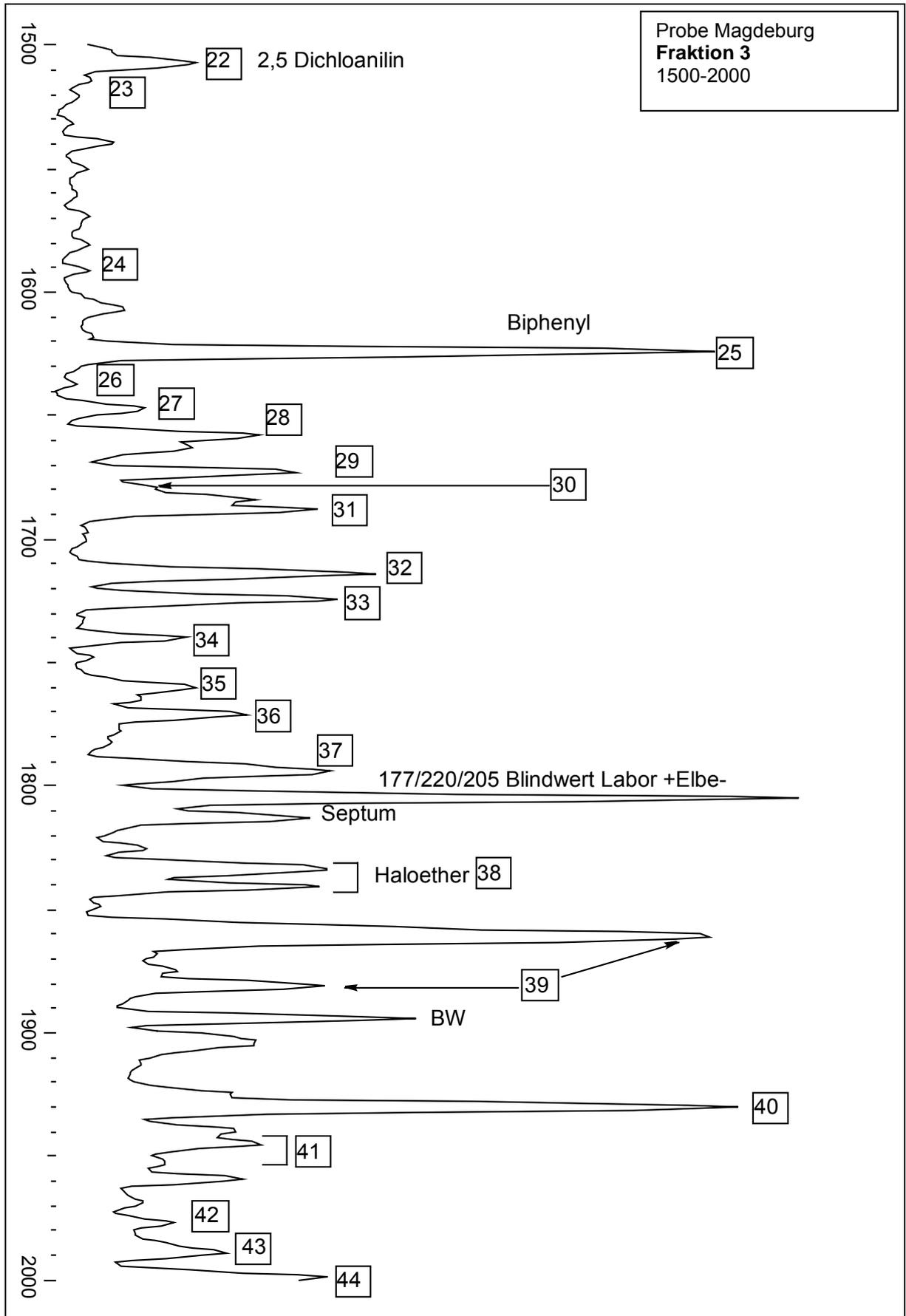
Tabelle A5: Zuordnung der im Probenextrakt der Elbe-Schwebstoffprobe bei Magdeburg identifizierten Substanzen, Silica-Fraktion 3

Nr.	m/z	Verbindung
1	146/111	Dichlorbenzol
2	119/105	Trimethylbenzol
3	134/119	Dimethylethylbenzol
4	105/121/150	Ethoxyethylbenzol
5	134/119	Alkylbenzol
6	131/103	2-Methylbenzofuran
7	134/119	Alkylbenzol
8	132/117	Nicht zugeordnet
9	134/119	Alkylbenzol
10	130/115	1-Methyl-1 <i>H</i> -Indene
11	128/102	Naphthalin
12	148/133/121	Nicht zugeordnet
13	146/131	Nicht zugeordnet
14	145/131/115	2-Ethyl-1 <i>H</i> -Benzimidazol
15	161/163	Chlorierte Verbindung

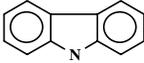
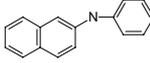


Fortsetzung Tabelle A5:

Nr.	m/z	Verbindung
16	165/123	
17	204/206/169/171	Dichlortricyclodecan
18	141/115	1-Methylnaphthalin
19	141/115	Methylnaphthalin
20	160/145	Alkylbenzofuran
21	160/145	Trimethylbenzofuran
22	161/126	2,5-Dichloranilin
23	159/145	Tetramethylindan
24	105/176/158/143/128	Methylhexylbenzol
25	154/128	Biphenyl
26	174/159	Nicht zugeordnet
27	159/145	Trimethyltetrahydronaphthalin
28	159/145	Trimethyltetrahydronaphthalin
29	170/141	1,1'-Oxybisbenzol
30	195/124	Trichloranilin
31	156/141	Alkylbenzol
32	156/141	Alkylbenzol
33	156/141	Alkylbenzol
34	167/145	Methylbiphenyl
35	156/141	Alkylbenzol
36	163/133	Dimethylphthalat
37	173/152	Acenaphthylen
38	189/191/141/143/111/113	2,3-Dichlor-1-propyl-1,3-dichlor-2-propylether bzw. Isomer
39	168/152	Methylenbisbenzol
40	168/139	Dibenzofuran
41	170/155	Trimethylnaphthalin
42	182/167	1-Methyl-4-(phenylmethyl)benzol
43	170/155	Trimethylnaphthalin
44	187/105	stickstoffhaltig
45	170/155	Trimethylnaphthalin
46	182/167	Dimethylbiphenyl o. anderes AB.
47	165 +170/155	Fluoren + Trimethylnaphthalin
48	182/167	Diphenylethan
49	181/152	Methyldibenzofuran
50	210/195/167/181	1,1'-Bis- <i>p</i> -tolylethan
51	133/218/196	Dimethylbenzaldehyd
52	193	2-Methylbenzo- <i>t</i> -quinolin
53	221/143/181	Alkylinden
54	238/223/196/181	Evt. 1,1-Bis(ethylphenyl)ethan
55	219/181	α -HCH
56	199/243/234/184	Nitrobiphenyl
57	210/195/180	Dimethyltetrahydroanthracen
58	178/152	Benz- <i>a</i> -azulen o. Anthracen
59	223/238	Bis(<i>p</i> -ethylphenyl)ethan (s.a. Nr 54)



Fortsetzung Tabelle A5:

Nr.	m/z	Verbindung
60	167/238/223/140	
61	224/209/118	Nicht zugeordnet
62	210/195	Isomeres zu 57
63	249/264/223	Akylphenylethan
64	292	Methylphenanthren
65	238/192	Phenylnitroindazolizin
66	292/256	Tetrachlorobiphenyl
67	267(181/149)	Chloriert /Koelution
68	149/223	Butylphthalat
69	204	Phenylanthralin
70	239	Ethylanthracendion
71	202	Pyren
72	223/238/181	<i>iso</i> -Propylxanthen-9-on
73	252/237/195	
74	307/270/235	
75	235/205/165	DDD
76	318/246/176	<i>p,p'</i> -DDE
77	235/199	<i>p,p'</i> -DDT
78	234/219/204	(Reten) 1-Methyl-7- <i>iso</i> -propylphenanthren
79	219	Phenyl-naphthylamin 
80	370/333 + 264	a) chloriert b) Benz- <i>a</i> -pyren
81	235/165	<i>o,p'</i> -DDT
82	178	Phenanthren/benz- <i>a</i> -azulen
83	292	PAH
84	274/218	Difenoxin (Vorschlag, Nist)

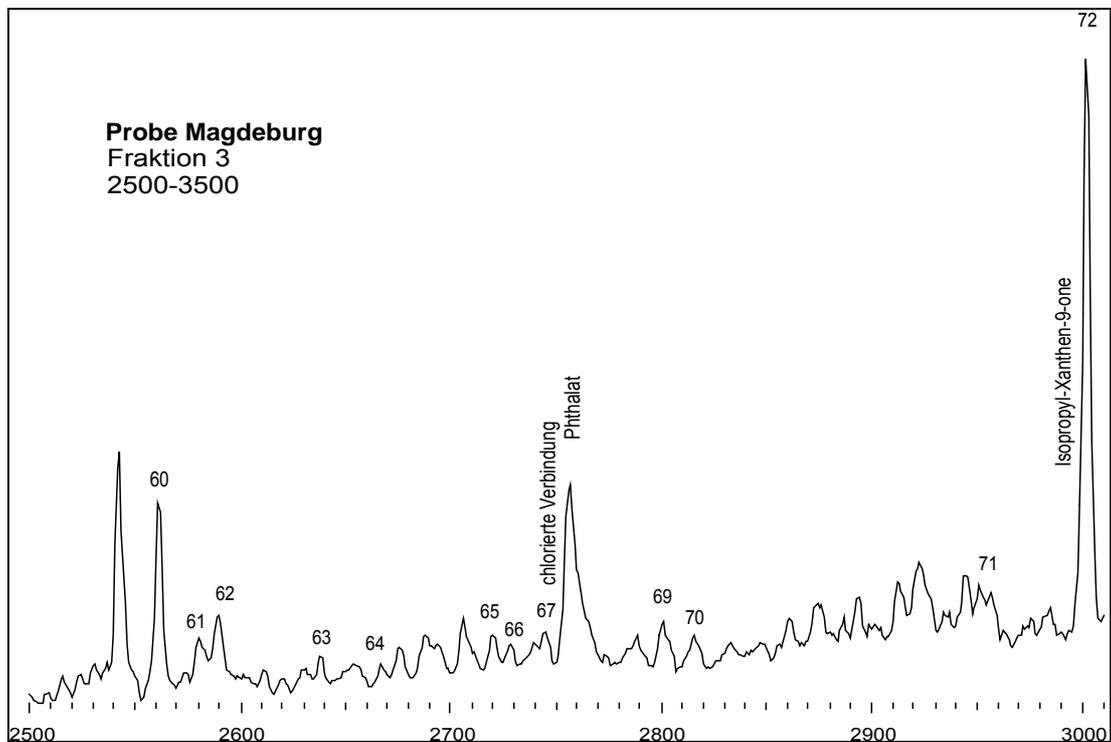
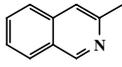
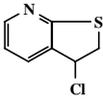
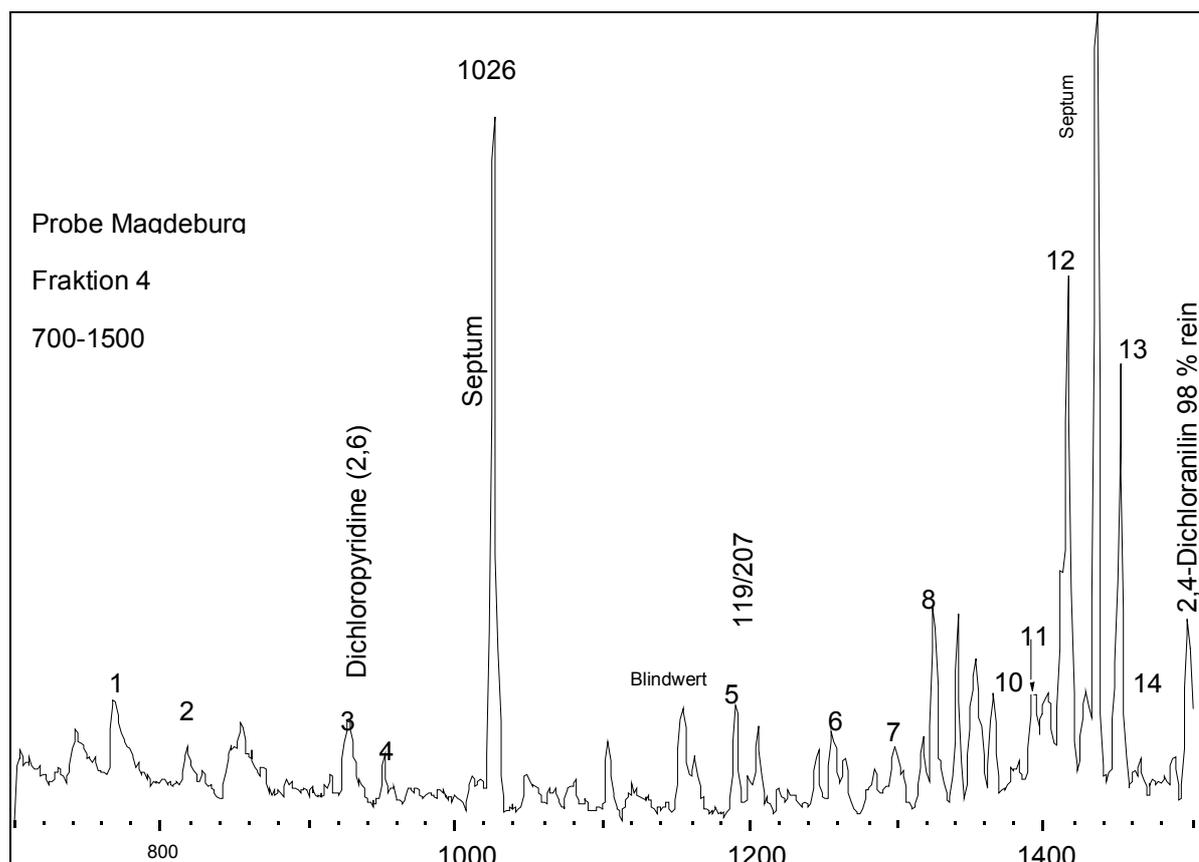


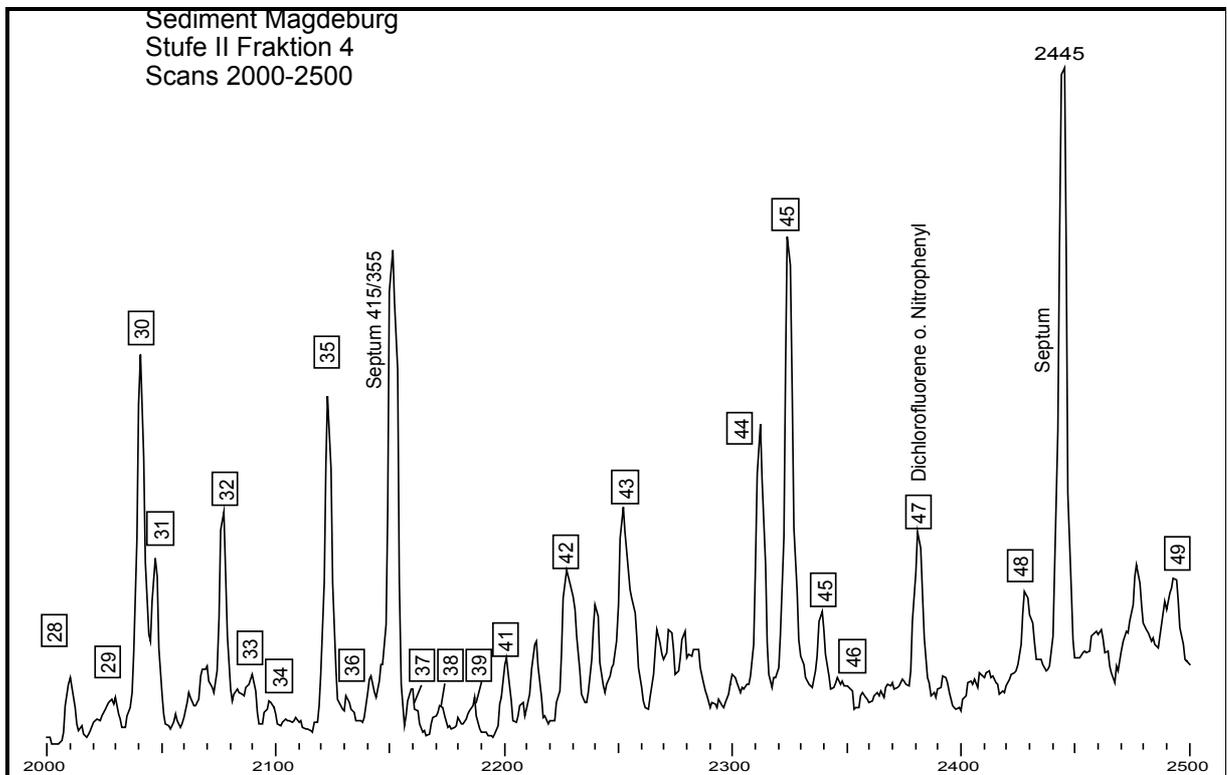
Tabelle A6: Zuordnung der im Extrakt der Elbe-Schwebstoffprobe bei Magdeburg identifizierten Substanzen, Silica-Fraktion 4

Nr.	m/z	Verbindung
1	113/115	Nicht zuzuordnen
2	121	Nicht zuzuordnen
3	147/112	2,6-Dichlorpyridin (Std.)
4		Methylquinolin 
5	137/121/106	
6	135/108	Fluorhaltig
7	148/133/119	
8	193/165/141/123/109	Vorgeschlagen wurde ein Amin
9	165/123/109	PAH
10	191/123/109	Dichlornitrobenzol
11	165/123/109	s.a. Nr. 9
12	(204)169/133/119	3-Chloro-thieno(-2,3-B)-Pyridin 
13	137/109	Hydroxybenzaldehyd

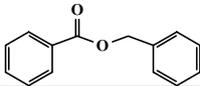
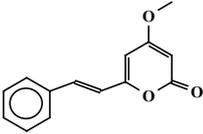
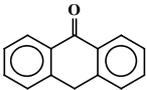


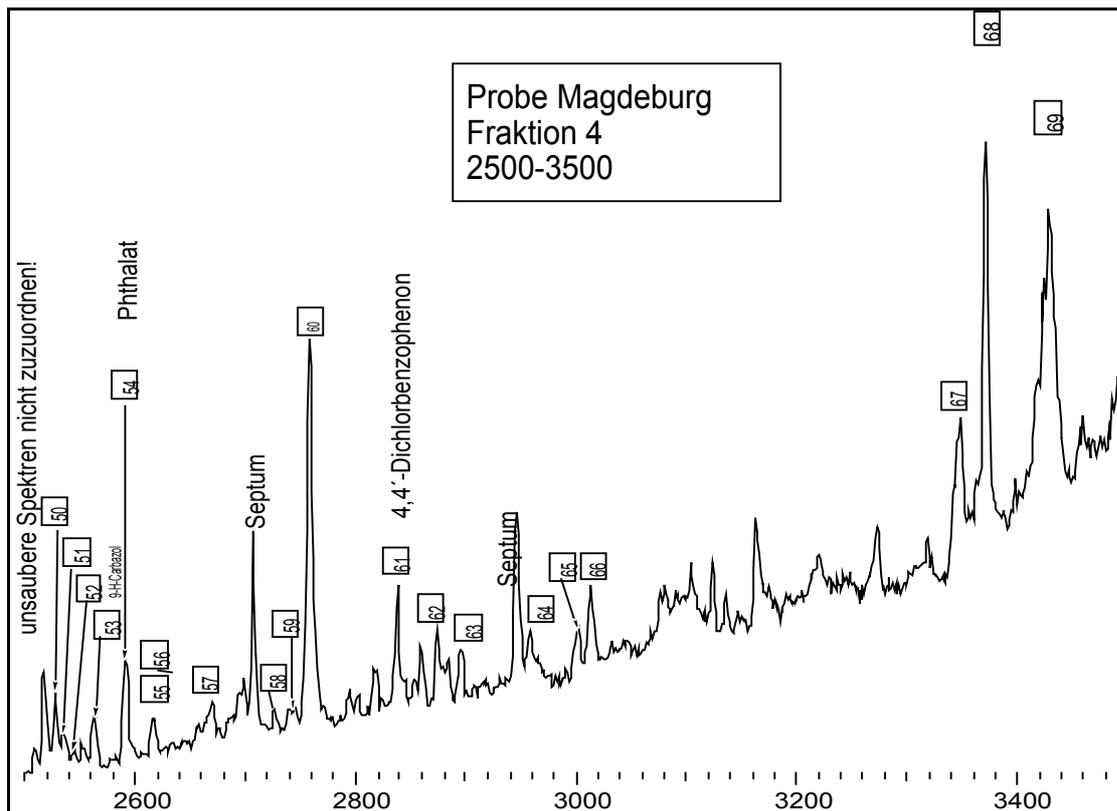
Fortsetzung Tabelle A6

Nr.	m/z	Verbindung
14	161/126	2,4-Dichloranilin (Std.)
15	161/126	2,5-Dichloranilin (Std.)
16	190/147	4-Butyl-indan-5-ol
17	109/(123/138)	Nicht zugeordnet
18	163/133	Dimethylphthalat
19	165/180/137	Phenolische Verbindung
20	167/149	Nicht zugeordnet
21	201/203/180/182/114/116	3,5-Dichloro-tri-fluoropyridin (Vorschlag NIST)
22	153/126	1-Naphthalincarbonitril
23	109/199/152/123	Evt. Fluorhaltig
24	153/126	Isomeres zu 22
25		Lilial (Vorschlag NIST)
26	195/124	Trichloranilin (Std.)
27	200/157/147	Calacoren
28	200/185/170	Koelution: a) Methoxyphenylpyridin b) 200/185
29	120/105	Alkylbenzol (BW)
30	141/127/113+	a) BW
	111/123/135/179	b) chlorierte Verbindung
31	111/123/135	Nonylphenol
32	196/183/166/152/138/124/110	
33	172/142	5-Chlor-2-nitroanilin (Std.)
34	166/135/105	Schwefelhaltige Verbindung
35	166/138/123/110	Koelution: a) Hexahydronaphthalen b) ?
36	169	Vorgeschlagen wurde ein Diphenylamin
37	105/204/182/123	Nicht zugeordnet

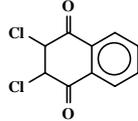


Fortsetzung Tabelle A6:

Nr.	m/z	Verbindung
39	179	Benzoquinolin
40	107/105	Nicht zugeordnet
41	a)193/181 b) 181/167	2230 Alkyldihydroanthracen 2227 Thiophen
42	274/259/231/205/189	a) Aminoethoxyquinoxalin b) b) PAH dehydriert
43	105/123/113	
44		Makromolekül
45	242/199/157/143/129	Neopentylquinolin (Vorschlag Bibliothek)
46	206	2,6-Dichlor-4-nitroanilin (Std.)
47	234/199/184/169	Vorgeschlagen wurde Dichlorfluoren oder Nitrophenyl Verb.
48	212/194/105/167	Benzyloxybenzoat
		
49	214/120	?????
		
50	228/(199)/185/171/157/143/129	Isopropylmyristat wurde vorgeschlagen
51	194/165	
52	152/165	N,O-haltig
53	167/139	9H-Carbazol



Fortsetzung Tabelle A6

Nr.	m/z	Verbindung
54	149/223	Butylphthalat
55	235/199/185/170	9-Cl-[1,4]-Benzoxatino[3,2]-pyridine (Vorschlag)
56		Dehydr. PAH
57	165/208	Methoxyphenanthren
58	250/139/111	Dichlorbenzophenon s.a. 61
59	119/267/151	Nicht zugeordnet
60	a) 208/165 b) b)267/155/119 c) c)149/223	a) Hexahydropyren o. s.57 b) Pentachloromethylbiphenyl ? c) Dibutylphthalat
61	250/139/111	4,4'-Dichlorbenzophenon
62	213/241/256	Nicht zugeordnet
63	261/226/199 *	Evt. 2,6-Dichlorphenyl-amino-benzacetaldehyd s.a. 65
64	173	Nicht zugeordnet
65	281/261/226/199 /190*	 2,3-Dichlor-1,4-naphthalendion
66	281/261/226/199 /190*	s.a.63,65

Fortsetzung Tabelle A6

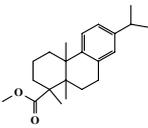
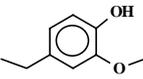
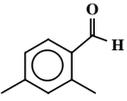
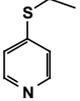
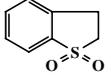
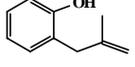
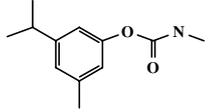
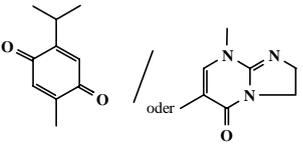
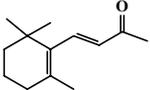
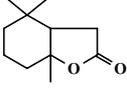
Nr.	m/z	Verbindung
67	329/243/258	
68	299/239	Nicht zugeordnet
69	293/227	Makromolekül
70	149	DEHP

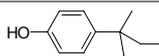
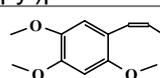
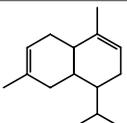
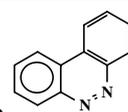
Tabelle A7: Zuordnung der im Extrakt der Elbe-Schwebstoffprobe bei Magdeburg identifizierten Substanzen, Silica-Fraktion 5

Nr.	m/z	Verbindung
1	107/124	2-Fluoro-4-methylanilin
2	109/125	Fluorhaltige Verbindung
3	109/125	Nicht zugeordnet
4	107	Nicht zugeordnet
5	124/109	3-Fluoro- <i>o</i> -xylol
6	154/139/110	3-Ethyl-2-Thiomethylpyrazin
7	137/152/109	4-Ethyl-2-methoxyphenol 
8		2,4-Dimethylbenzaldehyd 
9	119/134	Alkylbenzol
10	137/152/121/109	Nicht zugeordnet
11	137/121/105	Nicht zugeordnet
12	109/152/125	1-Fluoro-4-(2-methoxyethenyl)-benzol
13	139/123/110	4-Methoxy-6-methyl-2-pyrimidinamin
14	152/137/123/109	Trischlorophosphorsäuredimethylester
15	139/124/110	4-Ethylthiopyridine 
6	137/109/165	1,1-Dioxidbenzo[<i>B</i>]thiophen 
17	133/148/105	2-(2-Methyl-2-propenyl)phenol 

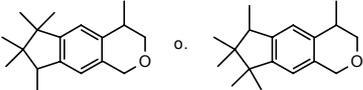
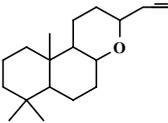
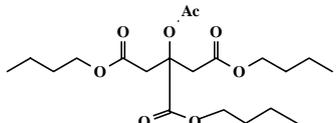
Fortsetzung Tabelle A7

Nr.	m/z	Verbindung	
18	171/142/127/111	2-Ethylaminothioxothiophen	
19	161/126	2,4-Dichloranilin (Reste)	
20	133/165/123/105	Koelutionen	
21	133/105	1-Methyl-indan-1-ol	
22	125/109	Nicht zugeordnet	
23	147/119/103	Trimethylbenzaldehyd	
24	205/171/135	Nicht zugeordnet	
25	125/109	Nicht zugeordnet	
26	150/135	3-Methyl-5 (1-methylethyl)- methylcarbammat	
27	127	Nicht zugeordnet	
28	164/149/121	Dimethylaminobenzoessäure	
29	151/133/123/109	Diol ?!	
30	127/111	Alkylbutansäure Derivat	
31	125/109 + 164/149/136/121/107	1. Alkohol (triol) 2.	
32	147/109	Evt.chlorierte Verb.(-HCl)	
33	163/133	Dimethylphthalat	
34	165/180/193/221/137	2,6-Di- <i>t</i> -butyl-4-hydroxy-4-Me-2,5-cyclohexadienon	
35	177	β -Jonon (Duftstoff, Std-Test)	
36	123/109	C ₁₃ H ₁₀ O ₂ Keton	
37	141/201	N,O-haltige Verbindung	
38	141/113	Diethylmethylphosphat	
39	149/163/135	Phthalsäureester	
40		Diethyl-4-nitrophenylamin; Koelution	
41	182/167/125	Dodecylethylthiophen	
42	172/144/115	Ethoxynaphthalin	
43	211/196/154	Aminothiophen	
44	180/137/111	Tetrahydrobenzofuranon	
45	191/105	<i>N</i> -Acetylbenzimidäureethylester (-C ₄ H ₅ O ₂)	
46	165/150/136/122	Phenylthiophen	

Fortsetzung Tabelle A7:

Nr.	m/z	Verbindung
47	153/175/196/134/105	Nicht zugeordnet
48	127/100+119/109	Nicht zugeordnet
49	111/234/219/191/173/161/145	Nicht zugeordnet
50	149/177	Phthalsäurediethylester (Diethylphthalat)
51	194/151/121	Dimethoxy- <i>N,N</i> -dimethylbenzamine
53	188/173/146/118	Dihydronaphthalenon
52	135/107	 Octylphenol-Isomer oder 4-(1,1-Dimethylpropyl)phenol
54	208/193/105/137	 <i>β</i> -Asaron ?
55		Nicht zugeordnet
56		Septum
57	182/105	Diphenylmethanon
58	208/1193/175/165/151/125	Nicht zugeordnet
59	204/189/161/108	
60	163/206/191/121	C ₁₄ H ₂₀ O ₁
61	181/209/167/138/111	Nicht zugeordnet
62	151/124/175/190	N,O-haltige Verbindung
63	129/185/111	Alkylbutansäureester
64	172/142	2-Chlor-4-nitroanilin (Std.)
65	215/196 181/152	a) Moschus-Nebenprodukt b) Trichlortoluolen
66	244/229/148	Celestolid (Std.)
67	199/108/135/137	Nicht zugeordnet
68	173/145/129	Trimethyl-3-buten-2-on
69	216/201/173	C ₁₄ H ₁₆ O ₂
70	180/152	 Benzo[<i>c</i>]cinnolin
71	151/175/190/124	Isomer zu 62
72	a) 173/188 b) 244/229	a) 2,3-Dihydro-tetramethyl-1 <i>H</i> -Indenon b) Phantolid (Std.)
73	219/234/203/191	Alkylphenol o. Butylhydroxytoluol
74	109/234/204	C ₁₄ H ₁₀ N ₄
75	170/141	Nicht zugeordnet
76	234/215/204/136	Nicht zugeordnet

Fortsetzung Tabelle A7

Nr.	m/z	Verbindung
77	229/199	Nebenprodukt Moschusverbindung
78	151/229/236	Nicht zugeordnet
79	241/212/197/182/123	2,3-Diacetylnaphthalin
80	a) 215/258 b) 165/123/109	a) Traseolid b) Nicht zugeordnet
81	243/254/213	Galaxolid
82	258/243	Tonalid
83	149/223/167 193/149	<i>iso</i> -Butylphthalat Alkylphenoxyalkohol
84	a) 258/243/213/223 b) 243/213 c) 243/213	Nebenprodukt Moschusverb. 
85	149	<i>n</i> -Butylphthalat
86	208/180/152	Anthracen-9,10-dion
87	243/214/199/156	Beiprodukt Moschusverb. (Verunr.)
88	275/257/192/177/137	 Strukturvorschlag
89	149	Cyclohexylphthalat
90	257/239/213/128	2-Iodmethylindol
91	243/225	Hydroxyestratrienon
92	235	Nicht zugeordnet
93	259/185	Tributylacetylcitrat 
94	239/206/149	Butylbenzylphthalat
95	326	Phosphorsäuretriphenylester (TPP)
96	149/391/279/107	Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP)

Probenahme Protokolle/ Laufzettel

Probenahme Protokoll (Wasser / Sediment)

Ort:	Projekt:
Datum: Uhrzeit:	Probenbezeichnung:

Angaben zur Probenahme

Probenahmestelle:	Wetter:
Probenahmegerät:	Wasserstand / Tide:
Probenart:	Wassertiefe:
Probenmenge:	Temperatur / Wassertemp.:
Probenbehältnis:	Probenehmer:
<i>Besonderheiten:</i>	

Probentransport:

Datum:	Transportgefäß:
Transportart:	Zwischenlagerung:
<i>Besonderheiten:</i>	

Probenaufbewahrung :

Datum:	Raumnr.
Konservierungsart:	Kühlschrank/Gefrierschrank:
<i>Besonderheiten:</i>	

Probenaufarbeitung am:

Probenlaufzettel: 10 L Wasserproben (Flüssig / Flüssig - Extraktion)

Probenbezeichnung: _____

1. Extraktion: Im Schöpfer nach Absaugen auf 10 L mit 200 mL *n*-Hexan, Übertreiben in 500 mL- Schliffflasche, Überführen in 250 mL-Rundkolben, Volumen bestimmen

Datum	Ausführender	Besonderheiten	Volumen	

2. Einengen In 250 mL-Rundkolben, bei 43° C und 360 mbar auf 20 mL; überführen in 25 mL-Spitzkolben (mit Spitze), nachspülen mit *n*-Hexan, auf ca 1mL bei 43° C und 360 mbar am Rotationsverdampfer

Datum	Ausführender	Besonderheiten	Volumen	

3. Silicafraktionierung 1.Fr Hexan, 2. Hexan/DCM 9:1, 3. Hex/DCM 4:6, 4. DCM, 5. DCM/EE 1:1, 6. EE Fr. 1,2,6 in 8mL Probengläschen, 3,4,5 in 10 mL-Spitzkolben mit Spitze, je 6 volle Pasteurp.

Datum	Ausführender	Besonderheiten	Volumen	

4. Einengen und Lömiwechsel Fr. 3,4,5 jeweils 3mal, Zugabe von zweimal je 5 mL Hexan und 100 µL Isooctan, Bedingungen wie oben

Datum	Ausführender	Besonderheiten	Volumen	

5. Alox Clean-up (optional) Minisäule mit 2 Fraktionen (1. Fr.: *n*-Hexan, 2. Fr.: *n*-Hexan/EE 4:1); in 25 mL-Spitzkolben, jeweils 8 mL Laufmittel

Datum	Ausführender	Besonderheiten	Volumen	

6. Einengen Bei 43° C und 360 mbar auf ca 1mL am Rotationsverdampfer, 2. Fraktion zweimal mit *n*-Hexan nachspülen

Datum	Ausführender	Besonderheiten	Volumen	

7. GC Messung Fr. 3 Fr.4 Fr. 5 andere

Datum	Ausführender	Besonderheiten	Volumen	

7b. GC/MS Messung Fr. 3 Fr.4 Fr. 5 andere

Datum	Ausführender	Besonderheiten	Volumen	

8. Auswertung / Dokumentation

Probenlaufzettel 1 L Wasserproben / Festphasenextraktion (RP 18)

Datum:	Probenbezeichnung:
Uhrzeit:	Bearbeitung:

1. RP 18 Extraktion: Extraktion von 1 L Wasser durch Festphasenextraktion (RP 18)

Datum:	
Kartuschenart:	
Gesamtextraktionsvolumen:	

2. Elution der Kartusche:

Elution in 10 mL-Reagenzgl.; 2 Fraktionen ; je 5 mL Hexan bzw. 5 mL H/EE (4:1)

Datum:	
Besonderheiten	

3. Einengen der Lösungsmittel: Verwendung von 25 mL-Spitzkolben, am Rot. auf 0,5 mL

Datum:	
Besonderheiten:	

4. Lösungsmittelwechsel zu Isooctan:

Zugabe von 10 mL Hexan, Einengen auf 0,5 mL und Zugabe von 150 µL Isooctan

Datum:	
Besonderheiten:	

Volumen Hexan-Fr:		Volumen H/EE-Fr:	
-------------------	--	------------------	--

5. Probenaufbewahrung:

Datum:	Ort:
Besonderheiten	

6. Messung der Probe:

Datum:	
Verzeichnis:	
Chr.star-Daten:	
Exel-file:	

Probenlaufzettel: SPMDS

Probenbezeichnung:

1. Dialyse: Im 250 mL-Braunglas mit Schraubd. mit ca 100 mL *n*-Hexan/DCM 4:1; zweimal je 24 h

Datum	Ausführender	Besonderheiten

2. Einengen In 250 mL-Rundkolben, bei 43 °C stufenweise von 700 bis 360 mbar auf 20 mL; überführen in 25 mL-Spitzkolben (mit Spitze), nachspülen mit *n*-Hexan, auf ca 1mL bei 43°C und 360 mbar am Rotationsverdampfer

Datum	Ausführender	Besonderheiten

3. GPC Gr. Säule; Vol. mit Cyclohex/EE 1:1 auf 2,5 mL auffüllen; Flow: 2,7 mL/min; in 50 mL-Spitzkolben

Datum	Ausführender	Besonderheiten

4. Einengen und Lömiwechsel Einengen bei 43 °C und 360 mbar Zugabe von zweimal je 25 mL Hexan und 100 µL Isooctan

Datum	Ausführender	Besonderheiten

5. Silicafraktionierung 1.Fr: *n*-Hex., 2. *n*-Hex./DCM 9:1, 3. *n*-Hex./DCM 4:6, 4. DCM, 5. DCM/EE 1:1, 6. Fr.: EE; Fr. 1,2,6 in 8 mL-Probengläschen, 3,4,5 in 10 mL-Spitzkolben mit Spitze; je 6 volle Pasteurp. Lösungsmittel

Datum	Ausführender	Besonderheiten

6. Einengen und Lömiwechsel Fr. 3,4,5 jeweils 3mal, Zugabe von zweimal je 5 mL *n*-Hexan und 100 µL Isooctan, Bedingungen wie oben

Datum	Ausführender	Besonderheiten

7. GC Messung Fr. 3 Fr.4 Fr. 5 andere

Datum				

7b.GC/MS Fr. 3 Fr.4 Fr. 5 andere

Datum				

8. Auswertung / Dokumentation

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hühnerfuß für die Überlassung des Themas und die Freiheit bei der Ausgestaltung, so dass es mir möglich war vielerlei Verschiedenes zusammenzubringen.

Dann möchte ich allen Danken die immer wieder unermüdlich prophezeiten, dass auch diese Arbeit irgendwann einmal fertig ist und dafür nicht nur Mitgefühl sondern eben auch die besten Ratschläge, Hilfeleistungen und „Kohlehydrat-Einheiten“ in fester und flüssiger Form für den Gleichgewichtszustand beisteuerten.

In diesem Stück mitgewirkt hat die Arbeitsgruppe Hühnerfuß: Stefan Weigel, Johannes Simon-Kutscher, Ninja Reineke, Nils Peters, Volker Neumann, Katrin Möller, Philipp Lange, Frank Hoffmann, Hagen Hintze, Robert Gatermann, Thomas Ellerichmann, Heike Dannhauer, Bianca Bethan, Kai Bester. Ferner durfte ich auf das historische Grundwissen, welches durch die ehemaligen Mitarbeiter zur Verfügung gestellt wurde, zurückgreifen. Daher auch mein Dank an alle ehemaligen Hühnerfüßler die ich nicht mehr „live“ erlebt habe.

Mein Dank geht an Heike Dannhauer, ohne deren Geduld möglicherweise die trivialsten Dinge ein erfolgreiches arbeiten verhindert hätten. Ohne Heikes redliche Verwaltungsstudien wäre nie ein Vertrag zustande gekommen.

Frank ist es zu verdanken, dass jedem Zeichen vorangegangener Texte ein Bit oder auch Byte zugeordnet wurde. Auch bin ich Ihm sehr verbunden für die Gnade der Recherche. Eine jede, fängt wohl mit einer Frage an und endete doch so oft mit (s)einer „Fachleistung“.....

Bianca und auch Stefan darf ich wiederholt danke sagen, da wir doch den größten Teil des Weges gemeinsam hinter uns gebracht haben und sie beide, wie man so schön sagt: Höhen und Tiefen teilen mussten.

Ninja und ihren unermüdlich leuchtenden Bakterien danke ich für die aktive Anteilnahme..., Anregungen, Diskussionsfreude und tatkräftige Hilfe. Es war viel schöner die immer wiederkehrenden Rätsel (Wieviel Leuchten denn noch ? Alle..?! Keiner mehr...?! und warum...?) „Chemisch“ gemeinsam zu bearbeiten.

Was wäre eine Arbeit ohne die Zusammenarbeit: An dieser Stelle möchte ich allen Kooperationspartnern ausdrücklich danken, die mich in der jeweiligen „Fremddisziplin“ begleitet haben! Markus Hecker und Marie-Perin Beck haben mich in den theoretischen als auch praktischen Dingen der biologischen Wissenschaft zum Glück tatkräftig unterstützt. Dank Hans-Heinrich Vahl hatte ich (und auch meine Proben) die Gelegenheit einige toxikologische Eindrücke zu gewinnen.

Mein Dank schicke ich auch nach Norwegen an die Arbeitsgruppe am NILU in Tromsø, denn ohne deren Unterstützung insbesondere von Roland Kallenborn (und auch dem MD 800), wäre vieles vielleicht doch nur noch Theorie geblieben. Ebenso durfte ich immer mit Unterstützung und vielerlei Zuversicht aus Neumünster rechnen. Ein „dickes“ Dankeschön an Gerhard Rimkus.

Robert sei an dieser Stelle noch einmal besonders gedankt, dass die Arbeit noch ein gutes Ende fand.

Puhhhhh, jetzt hoffe ich wirklich niemanden vergessen zu haben und auch das dies die endgültig letzte Seite ist..... wenn es die erste Seite ist die Ihr lest, dann noch viel Vergnügen bei den nächsten 230!