

# **Multimethode zur Bestimmung von endokrin wirksamen Substanzen in Wasser**

**Roman Holtey-Weber**

**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**

**Dissertation 2001**



# **Inaugural-Dissertation**

**zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg**

**vorgelegt von**

**Lebensmittelchemiker**

**Roman Holtey-Weber**

**aus Bonn**

**2001**

**Thema:**

**Multimethode zur Bestimmung von  
endokrin wirksamen Substanzen in Wasser**

Gutachter: Prof. Dr. Heinz Friedrich Schöler  
Prof. Dr. German Müller

Promotionsdatum:

Herrn Dr. Harald Färber danke ich für die stetige Diskussionsbereitschaft, die erfolgreiche Arbeit an gemeinsamen Ideen und die menschliche Betreuung.

Herrn Prof. Schöler danke ich für seine guten Anregungen, die Erstellung von fruchtbaren Kontakten, seine Geduld und ansteckende Lebensfreude.

Herrn Prof. Exner danke ich für die produktiven Rahmenbedingungen, die mir die praktischen Arbeiten für diese Dissertation ermöglichten.

Und vielen Dank an alle Mitglieder des Arbeitsgebietes, besonders Annette, die geduldig zuhören musste wenn das GC-MS mal wieder nicht lief.

Auch Herrn Dr. Henner Hollert danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit, insbesondere die Zusendung von Proben und die Einbettung der Ergebnisse in das Gesamtprojekt „Identifizierung und Bewertung (öko)toxikologisch belasteter Gewässer in Baden-Württemberg“.

*meinen Eltern gewidmet*

# Multimethode zur Bestimmung von endokrin wirksamen Substanzen in Wasser

1	Einleitung .....	3
1.1	Endokrin wirksame Substanzen .....	3
1.2	Zielsetzung .....	5
1.3	Zusammenfassung .....	6
1.4	Verzeichnis der benutzten Abkürzungen .....	7
2	Grundlagen der verwendeten Analytik .....	9
2.1	Festphasenextraktion .....	9
2.2	Derivatisierung .....	9
2.3	Kapillargaschromatographie .....	12
2.4	Massenspektrometrie .....	19
2.4.1	MS-Typen .....	19
2.4.2	MS-Arbeitsmodi .....	21
2.4.2.1	Full-Scan (Messung von großen Massenbereichen) .....	21
2.4.2.2	SIS und SIM (Messung von wenigen, ausgesuchten Massen) .....	22
2.4.2.3	MS/MS-Technik (Fragmentierung von Fragmenten) .....	22
3	Verwendete Materialien und apparative Ausstattung .....	23
3.1	Reagenzien- und Standardsubstanzen-Listen .....	23
3.2	GC/MS/MS-System Saturn 2000 .....	25
3.3	GC/MS-System ITD 800 .....	25
3.4	Ansatz der Standards .....	26
3.5	Arbeitsvorschrift für Analysengang .....	29
3.6	Detaillierte Arbeitsanweisung für die Festphasenextraktion .....	31
3.7	Probenahme .....	33
4	Methodenentwicklung, Überprüfung und Diskussion .....	34
4.1	Festphasenextraktion und Wiederfindung .....	34
4.1.1	Vergleich verschiedener Hersteller und selbstgepackte Kartuschen .....	34
4.1.2	Wiederfindung, verbessertes Verfahren .....	38
4.1.3	Trocknung der Kartuschen .....	41
4.2	Injektion / Derivatisierung / On-Line-Silylierung .....	43
4.2.1	Alkylierungsversuche .....	44
4.2.1.1	Diazomethan .....	44
4.2.1.2	TMSH, Trimethylsulfoniumhydroxid .....	45
4.2.1.3	TBSH, Tributylsulfoniumhydroxid .....	48
4.2.2	Acylierungsversuche .....	51
4.2.3	Weitere Derivatisierungsversuche .....	51
4.2.3.1	HFBSA, Heptafluorbuttersäureanhydrid .....	51
4.2.3.2	PFBB, Pentafluorobenzylbromid .....	52
4.2.4	Silylierungsversuche .....	53
4.2.5	On-Line-Silylierung .....	56
4.2.5.1	Zusätze .....	57
4.2.5.2	Konzentration .....	61
4.2.5.3	Reaction Time .....	62
4.2.5.4	Aufgabetemperatur .....	62
4.2.5.5	Endtemperatur .....	63
4.2.5.6	Trocknungszeit (Purge Time) .....	63
4.2.5.7	Injektor-Heizrate (Ramp) .....	65
4.2.5.8	Ausheizen .....	65
4.2.5.9	Matrix-Effekt .....	66
4.2.5.10	Haltbarkeit .....	69
4.2.5.11	Chemisches Rauschen .....	70
4.2.6	Weitere Reagenzien, Vergleich, Ausbeute .....	71
4.2.7	Übersicht über die getesteten Derivatisierungsreagenzien .....	73
4.3	Injektionsmethode für die nicht derivatisierte Stoffgruppe .....	74
4.3.1	Trocknungszeit (Purge Time) .....	75
4.3.2	Ausheiz-Zeit .....	76
4.4	Gaschromatographie .....	77

4.5	MS/MS-Methodik.....	78
4.5.1	Voltage.....	79
4.5.2	Scanrate - Peakform.....	82
4.5.3	Segment Time.....	82
4.5.4	Mass Range.....	83
4.5.5	Probleme.....	83
4.6	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.....	85
4.7	Vergleich mit anderen analytischen Prinzipien, Diskussion.....	89
5	Messungen von Realproben, Diskussion.....	91
5.1	Trinkwasser / Wasserversorgung.....	91
5.2	Oberflächenwasser.....	93
5.3	Neckar-Hochwasser.....	101
5.4	Sedimente von Oberflächenwasser und des Neckar-Hochwassers.....	105
5.5	Vergleich und Kombination mit einem Biotest der AG aquatische Toxikologie.....	111
6	Gesundheitlich-umwelthygienische Betrachtung, Diskussion.....	115
6.1	Mögliche Wirkungen des untersuchten Oberflächenwassers auf aquatische Organismen, Vergleich eigener Messdaten mit Literaturdaten.....	115
6.1.1	Bekannte Konzentrationen in Wasser (Westeuropa, USA, Kanada).....	115
6.1.2	Substanzen mit bekannter Wirkungsschwelle.....	118
6.1.3	Extrapolation von Wirkungsschwellen.....	120
6.1.4	Phytosterine in Oberflächenwasser.....	121
6.1.5	Zur Kombinationswirkung.....	121
6.1.6	Gezielte Anwendung von EWS.....	122
6.1.7	Schlussfolgerung, Gesamtbetrachtung mit Literaturwerten.....	123
6.2	Mögliche Wirkungen des untersuchten Trinkwassers auf den Menschen, Vergleich mit Literaturdaten und Lebensmitteln.....	124
6.2.1	Geringe Aufnahme an EWS über Trinkwasser, höhere Aufnahme über Lebensmittel.....	124
6.2.2	Bekannte Konzentrationen an EWS in Lebensmitteln im Vergleich zur endogenen Produktion an Estradiol und Estron.....	126
6.2.3	Die endogene Produktion überwiegt.....	127
6.2.4	Exkurs: Phytosterine in Lebensmitteln.....	127
6.2.5	Sonstige Quellen der Inkorporation von EWS.....	129
6.2.6	Toleranz des Menschen gegen EWS.....	129
6.2.7	Kritische Bemerkungen zur Beurteilung der hormonellen Wirksamkeit.....	130
6.2.8	Einfluss der allgemeinen Lebensfaktoren auf die Fertilität.....	132
6.2.9	Schlussfolgerung.....	133
6.3	Ausblick.....	134
7	Anhang.....	135
7.1	Stoffdaten und allgemeine Informationen zu den untersuchten Substanzen.....	135
7.2	Literaturliste.....	151
7.3	Massenspektren und Chromatogramme.....	190
7.4	Tabellen.....	213
7.5	Publikationen/Preis.....	214
7.5.1	Zeitschriftenbeiträge.....	214
7.5.2	Posterbeiträge.....	215
7.5.3	Vorträge.....	217
7.5.4	Preis.....	217
7.6	Erklärung.....	217
7.7	Lebenslauf.....	218

# 1 Einleitung

## 1.1 Endokrin wirksame Substanzen

Die Geschichte der Schadstoffe zeigt, dass zwischen der Emission, der Aufdeckung negativer Wirkungen für Mensch und Ökosystem und dem Verbot bestimmter Stoffe oft längere Zeiträume liegen. In der Vergangenheit mussten nach der Emission von Schadstoffen mehrfach erst Vergiftungsfälle (Itai-Itai-Krankheit: Cadmium; Minamata: Quecksilber; kontaminiertes Reisöl: PCB) auftreten oder Arten beeinträchtigt werden („silent spring“: DDT; Waldsterben: Stickoxide), bevor gesetzliche Regelungen erlassen oder z.T. erst die Schadwirkung einer Substanz überhaupt erkannt wurde [HIRAMATSU 1970 (Cd); EMMERSON 1970 (Cd); SUZUKI 1970 (Hg); TAKIZAWA 1970 (Hg); FUJIWARA 1975 (PCB); MASUDA 1974 (PCB); CARSON 1962 (DDT); SEIDEL 1998 (Allgemein)]. Im Bereich der anorganischen Schadstoffe sei weiterhin Blei aufgeführt, bei den organischen Kontaminanten sind Vinylchlorid und Pestizide von Bedeutung. Bisher wurden regelmäßig erst in der Nachfolge derartiger Schadwirkungen Verbesserungen durch gesetzliche Maßnahmen eingeleitet. Als Konsequenz ist vorausschauendes, präventives Handeln erforderlich.

Als Folge dieser Erfahrungen kann gesehen werden, dass in den 70er Jahren bereits eine wissenschaftliche Debatte über einen speziellen Bereich von Medikamentenrückständen in Wasser geführt wurde. Rückstände hormoneller Antikonzeptiva wurden im Trinkwasser vermutet. Das Ergebnis der Untersuchungen war die Verneinung einer Gefahr für die menschliche Reproduktionsfähigkeit durch Spuren von Ethinylestradiol und weiteren synthetischen Steroidhormonen in Trinkwasser, da die erwarteten und in Einzelfällen festgestellten Konzentrationen weit unterhalb einer therapeutisch wirksamen Dosis lagen und ein Abbau in Belebtschlamm festgestellt wurde [NORPORTH 1973; RATHNER 1979; TABAK 1970].

Anfang der 90er Jahre wurde das Thema in breiterem Rahmen erneut aufgegriffen und erweitert: es begann eine intensive Diskussion über die Effekte oder mögliche Effekte von endokrin wirksamen Stoffen (nicht nur steroidaler Struktur) in der Umwelt auf Mensch und Tier. Als „endokrin wirksame Substanzen“ (EWS) werden nach [FENT 2000] Substanzen bezeichnet, die störend auf das Hormonsystem eingreifen und dadurch negative Folgen bei Mensch und Tier oder deren Nachkommen bewirken können. Die englische Entsprechung lautet „endocrine disruptors“. Zu diesen gehören neben Steroidhormonen Alkylphenole, Phthalate, Stilbene, PCB, Bisphenol A, Phytoestrogene, einige Pestizide und weitere Substanzen (siehe [GÜLDEN 1997; SCHÄFER 1996]).

Den Anstoß für das erneute wissenschaftliche und öffentliche Interesse gab eine Untersuchung [COLBORN 1993], die in einem durch verschiedene Substanzen (Kepone, DDT und Abkömmlinge) kontaminierten See (Lake Apopka) in Florida bei männlichen Alligatoren verkümmerte Geschlechtsorgane sowie bei Fischen und Möwen mehr Weibchen als Männchen bei den



Nachkommen registrierten. Vergleichbare Effekte in der Natur sind seitdem weltweit (USA, Europa, Japan) bei verschiedenen Fischarten, Vögeln, Schnecken, Walen, Seehunden, Schildkröten, Wildkatzen und Amphibien dokumentiert worden [COLBORN 1991, 1993, 1996, 1997; WHITE 1994; SUMPTER 1995, 1996; SCHLUMPF 1996, 1997; POPP 1993; USDIN 1998; CREWS 1995; NIMROD 1996; HARRISON 1997; BERGERON 1994; PORTELLI 1999; PALMER 1999; GUILLETTE 1996; KAVLOCK 1996; VOS 2000].

Parallel dazu berichteten einige wissenschaftliche Studien über zurückgehende Spermienzahlen [CARLSEN 1992; AUGER 1995; THIERFELDER 1998], sinkendes Ejakulatvolumen sowie einen sinkenden Anteil an morphologisch normalen (gesunden) Spermien beim Mann. Diese Befunde sind nicht unumstritten [GREIM 1998; BIRKHÄUSER 1999; EUSTACHE 1999; PAULSEN 1996], weil der immer wieder zitierten großen Metaanalyse [CARLSEN 1992] Daten zugrunde liegen, die durch verschiedene Zähl- und Auswertungsmethoden ermittelt wurden. Dem gegenüber stehen sehr systematische, mit eindeutigen Randbedingungen versehene Studien von einzelnen Kliniken, die einen klaren Rückgang der Spermienqualität und der Spermienzahlen belegen. Bedenklich erscheint auch vor diesem Hintergrund die steigende Zahl ungewollt kinderloser Partnerschaften [ODENWALD 1995]. Weitere epidemiologische und klinische Daten [HARRISON 1997; TOPPARI 1996; CHILVERS 1984; BROWN 1987; GIWERCMAN 1993; MOLLER 1996; PHARRIS-CIUREJ 1999; JOHN RADCLIFFE HOSPITAL CRYPTORCHIDISM STUDY GROUP 1986; MANDAT 1992] belegen den Anstieg der Zahl von genitalen Missbildungen (Hypospadie und Kryptorchidismus) und Hodenkrebs, während der Anstieg der Brustkrebsrate kontrovers diskutiert wird. Dies erinnert an die Effekte durch die Verwendung von Diethylstilbestrol in den 60er Jahren [WILCOX 1995; JENSEN 1995; SHARPE 1998] und schlägt die Brücke zu den in der Fauna beobachteten Effekten.

Zahlreiche Publikationen belegen nun östrogene oder antiandrogene, androgene oder antiöstrogene Eigenschaften von einer großen Reihe von Substanzen [SOTO 1993; GÜLDEN 1997; SUMPTER 1996, BALLSCHMITTER, 1999]. Eine gewisse Dramatik kam in die Diskussion um EWS nach der ersten Publikation von [ARNOLD 1996], wonach durch Synergieeffekte verschiedene EWS in Kombination einen um  $10^3$  stärkeren Effekt als die Einzelsubstanzen alleine besitzen sollten. Doch diese Ergebnisse mussten später widerrufen werden [MC LACHLAN 1997].

Welche Substanzen sind in welcher Konzentration und in welcher Matrix relevant und welche Bedeutung haben diese Befunde für die Reproduktionsfähigkeit des Menschen? Zum jetzigen Zeitpunkt kann die Forschung noch nicht alle Wissenslücken schließen. Als Zwischenergebnis können hier doch schon einige grundlegende Aussagen festgehalten werden

## 1.2 Zielsetzung

Aufgrund der nicht ausreichenden Kenntnis über die Konzentrationen EWS in der Umwelt waren und sind noch Messungen erforderlich, um einen Überblick über den Zustand in unseren Gewässern als Lebensraum zahlreicher Tierarten sowie über unser wichtigstes Lebensmittel, das Trinkwasser zu bekommen.

In vielen Projekten der aktuellen Forschung zum Nachweis der EWS werden verschiedene Biotests eingesetzt, die eine Affinität zwischen den endokrinen Disruptoren (als Liganden) und speziell gezüchteten oder transfizierten Zellen mit Östrogenrezeptoren nutzen (siehe Kap. 4.7). Diese Tests erlauben eine summarische Aussage über das Vorhandensein von östrogenen Effekten. Eine Differenzierung zwischen einzelnen Substanzen oder Stoffgruppen sowie eine mengenmäßige Angabe sind nicht möglich.

Die instrumentelle chemische Analytik ermöglicht eine differenzierte Betrachtung nach Substanzen. Einzelne Konzentrationen in der Probenmatrix können ermittelt werden, ggf. können Einflüsse von Zeit, Ort und Materialien im Kontakt mit der Wasserphase deutlich werden. Da die gesuchten Substanzen chemisch sehr unterschiedlich sind, existierten bislang nur Einzelstoff-Analysenmethoden oder nach Gruppen (Steroidhormone, Alkylphenole, Organozinnverbindungen, Pestizide) orientierte Messverfahren, selten Analysenverfahren, die mehrere Stoffgruppen zusammenfassen [SCHLETT 1996; ARBEITSGRUPPE "ANABOLICA" NACH § 35 LMBG 1989; STUMPF 1996; HARTMANN 1997; BERTRAND 1990; SANTARIUS 1989; LISBOA 1987; STOESEL 1972; TIKKANEN 1972; GARZO 1971; SPENGLER 2000; TERNES 2000; DACHS 1999; FREY 2000; EIDEN 1998; PLÖGER 2000; BOLZ 2000; KROL 2000; NOSER 2000; ISOBE 1999; KUCH 1999; DE VOOGT 1999; SAWAL 1999; BELFROID 1999; VAN DER VELDE 1999; DING 1999; SERVOS 1999; AHEL 1999; ZELLER 1997; BLACKBURN 1995; HEBERER 1994; KALBFUS 1997; TERNES 1999; CASTILLO 1997; SUN 1997; RUDEL 1998; KÖRNER 1998; KEMPTER 1998; SPENGLER 1998; LARSSON 1999; VOLMER 1998; FÄRBER 1993].

Aus diesem Grunde ergab sich das Ziel, eine Multimethode zu entwickeln die möglichst viele Substanzen in einem einzigen Analysengang erfasst. Diese Multimethode soll empfindlich genug zur Bestimmung von Spurenkonzentrationen sein und Matrixeinflüsse so gut wie möglich ausblenden.

Um Arbeit und Zeit zu sparen, sollte sie einen besonders arbeitsaufwendigen und fehlerbehafteten Schritt (die Derivatisierung) automatisieren. Die Anwendung dieses Verfahrens zielte darauf ab, den Kenntnisstand über die Konzentrationen von endokrin wirksamen Substanzen in Wasser zu verbessern.

### 1.3 Zusammenfassung

Es wurde eine Multimethode zur Bestimmung von endokrin wirksamen Substanzen verschiedener Stoffgruppen in Wasser erarbeitet. Mit einem Analysengang können Steroidhormone, Alkylphenole, Bisphenol A, Diethylstilbestrol, Hexestrol, Phthalate, PCB und mehrere Pestizide zusammen bestimmt werden. Die verwendeten Techniken sind die Festphasenextraktion an selbst gepackten Kartuschen, die in dieser Arbeit entwickelte automatische On-Line-Derivatisierung, die Kapillar-Gaschromatographie und die Ion-Trap-Massenspektrometrie. Nachweisgrenzen im unteren bis mittleren ng/l-Bereich sowie gute bis zufriedenstellende Wiederfindungen wurden erreicht.

Verschiedene Fließgewässer in Südwestdeutschland, ein Hochwasserereignis sowie Wasser eines größeren Wasserversorgungsunternehmens wurden mittels der erarbeiteten Methode untersucht und deren Gehalte an endokrin wirksamen Substanzen quantifiziert. Der Vergleich mit einem Biotest zeigt eine Korrelation zwischen den analytisch festgestellten Gehalten an einigen EWS und den Messergebnissen des Biotests. Auch Sedimente wurden untersucht und einige der Kontaminanten dort mit entsprechend höheren Konzentrationen gefunden. Alle gewonnenen Daten wurden mit Literaturdaten verglichen. Sie sind plausibel und vergleichbar.

Nach dem derzeitigen Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse bergen die hier ermittelten sowie die der Literatur entnommenen Gehalte des Trinkwassers an EWS keine konkrete Gefahr für die menschliche Reproduktionsfähigkeit. Die im Rahmen dieser Arbeit und von anderen Autoren beschriebenen Konzentrationen an Estradiol, Ethinylestradiol, Nonylphenol, Phthalaten, Bisphenol A und DDT in den Oberflächengewässern sind jedoch stellenweise in der Lage, endokrine Effekte in Fischen und anderen aquatischen Organismen zu bewirken.

Zusätzlich wurden Literaturdaten von ungewollt aufgenommen, anthropogenen EWS der Nahrung studiert, den natürlichen Gehalten an EWS in Lebensmitteln (Pytoestrogenen) sowie der endogenen Produktion an Östrogenen gegenübergestellt und diskutiert. Demnach kann aus dem Gehalt der Nahrung an anthropogenen EWS als Kontaminanten weder eine Gefährdung der menschlichen Reproduktionsfähigkeit noch ein Zusammenhang mit dem Anstieg an genitalen Mißbildungen gefolgert werden. Eine gesunde, ausgeglichene Lebensweise ist die Voraussetzung für eine ungestörte Fortpflanzungsfähigkeit.

## 1.4 Verzeichnis der benutzten Abkürzungen

2-FE	2-Fluorestradiol
2-HE	2-Hydroxyestron
AGC	Automatic Gain Control
AND	Androsteron
AP	Alkylphenol(e)
APEO	Alkylphenoethoxylate
ARF	Anreicherungsfaktor
BADGE	Bisphenol-A-diglycidether
BBP	Benzylbutylphthalat
BCPS	Bischlorphenylsulfon
BG	Bestimmungsgrenze
BHA	Butylhydroxianisol
BPA	Bisphenol A
BSA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid
DBP	Dibutylphthalat
DDE	Dichlordiphenyldichlorethen
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DEHP	Diethyhexylphthalat
DEP	Diethylphthalat
DES	Diethylstilbestrol
DMP	Dimethylphthalat
DTE	Ditioerythrol
EDI	Estradiol
EED	Ethinylestradiol
EEQ	Estrogen-Äquivalente
EI	Elektronenstoß-Ionisation / electron impact
ES	Endosulfan(e)
EtAc	Ethylacetat
EWS	Endokrin wirksame Substanzen
FD	Filmdicke
GC	Gaschromatographie
GW	Grundwasser
HEX	Hexestrol
HFBSA	Heptafluorbuttersäureanhydrid
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HWR	Silylierungsreagenz n. Holtey-Weber (Kap. 4.2.5.1)
ID	Innendurchmesser
ISTD	Interner Standard
KLA	Kläranlagenauslauf
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
M	Molmasse
m/z	Masse dividiert durch Ladung (auch m/e)
M+	Molekülion
MES	Mestranol
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
NG	Nachweisgrenze
NP	Nonylphenol
OFW	Oberflächenwasser
OP	Octylphenol

PCB	Polychlorierte Biphenyle
PFBB	Pentafluorbenzylbromid
PP	Polar Plus
PTV	Programmed Temperature Vaporizer
RG	Reagenzglas
RHT	Rekombinante Hefezellen-Transkriptions-Test
SAK <sub>254</sub>	Spektraler Absorptionskoeffizient (bei 254 nm)
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SmHV	Schadstoff-Höchstmengen-Verordnung
t <sub>i</sub>	Ionisationszeit
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMIS	Trimethyliodsilan
TMS	Trimethylsilyl
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TMSIM	Trimethylsilylimidazol
TS	Trockensubstanz
u	Atomare Masseneinheit
TW	Trinkwasser
Vg	Vitellogenin
VgFHT	Vitellogenin-Forellenhepatocyten-Test
WF	Wiederfindung

Anmerkung: in dieser Arbeit wird in Anlehnung an die englische Schreibweise der Ausdruck „Xenoestrogen“ anstatt „Xenoöstrogen“ verwendet und die Steroidhormone als *Estradiol*, *Estron* etc. Bezeichnet. Als Adjektiv wird jedoch der Ausdruck „östrogen“ gebraucht. Weiterhin sind alle englischen Fachbegriffe groß geschrieben.

## 2 Grundlagen der verwendeten Analytik

### 2.1 Festphasenextraktion

**Zweck:** Mittels Festphasenextraktion werden die zu analysierenden Substanzen aufkonzentriert, von der Probe getrennt und von einem Großteil der unerwünschten Matrixbestandteile befreit.

**Prinzip:** Die in flüssiger Phase befindliche Probe (hier: Wasserprobe) wird nach entsprechender Vorbereitung (ggf. Filtration, pH-Einstellung) durch eine Kartusche gesaugt, die mit einem speziellen Phasenmaterial gefüllt ist. Aufgrund verschiedener Wechselwirkungen (Van-der-Waals-Kräfte, Dipol-Dipol-Wechselwirkung, hydrophobe Cluster, Wasserstoffbrückenbindung) werden Inhaltsstoffe der Probe (Analyten sowie Matrixbestandteile) an das Phasenmaterial adsorbiert. Die verschiedene Natur und Intensität der Wechselwirkungen begründet die große Auswahl an Phasenmaterialien und ihre verschiedene Spezifität für bestimmte Substanzklassen. Nach der Adsorption erfolgt das Auswaschen von Phase zur Entfernung der Matrixbestandteile, dann die Elution. Bei dieser werden die adsorbierten Substanzen durch ein Lösungsmittel vom Sorbens wieder herabgelöst [FRITZ 1999; THURMAN 1998; THIER, 1986; JUNK 1988; GEISLER 1994].

### 2.2 Derivatisierung

**Zweck:** In diesem Anwendungsbereich (Vorbereitung für die Gaschromatographie) ist das Ziel einer Derivatisierung die Erhöhung der Flüchtigkeit der zu bestimmenden Substanzen zur besseren GC-Gängigkeit. Zweitens verbessert die mit der Derivatisierung verbundene Erhöhung der molekularen Masse (Massenshift) das Signal-Rausch-Verhältnis im Massenspektrometer. Drittens erhöht sie die Spezifität der analytischen Methode, da eine spezielle Reaktion ein „Selektionskriterium“ unter den in der Probe vorhandenen Substanzen darstellt.

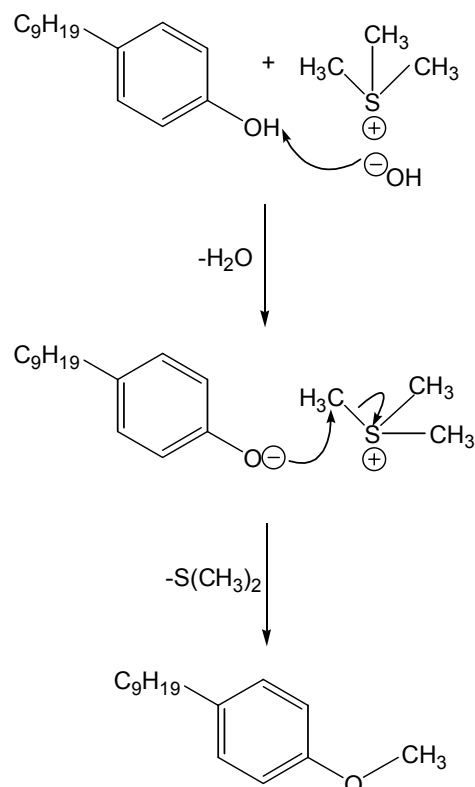
**Prinzip:** Gemeinsam ist den in der Gaschromatographie angewandten Techniken die Überführung polarer Funktionen (welche die Verdampfung und die chromatographische Trennung verhindern oder erschweren) zu weniger polaren Produkten. Die wichtigsten zu derivatisierenden Funktionen sind die Hydroxy-, Amino-, Carboxy- und Carbonylgruppen; eingeführt werden zumeist Trimethylsilyl-, Methyl- und Acetylgruppen. Die dabei verwendeten üblichsten Reagenzien sind MSTFA, TMCS, BSTFA, TMSIM, TMSH, TMAH, Diazomethan und Essigsäureanhydrid (siehe Verzeichnis der Abkürzungen). Die verwendeten Reaktionen sind meistens klassische Umsetzungen, die ein Vorgehen nach dem Schema von Einengen/Trocknung, Reagenzzugabe, Erhitzen, Abkühlen, Reagenz-Abblasen, Aufnehmen in Lösungsmittel und Volumenkorrektur umfassen. Ausnahmen sind die pyrolytische

Methylierung mit TMSH, die Methylierung mit Diazomethan und die in dieser Arbeit beschriebene On-Line-Silylierung. Literatur: [KNAPP 1979; BLAU 1981]

## Alkylierung

### TMSH

In Kapitel 4.1.1 werden Daten angeführt, die durch Methylierung mit TMSH und TBSH (Butyl-Analogen zu TMSH) gewonnen wurden. Die Reaktion basiert auf dem Ersatz von OH- oder NH-aciden Wasserstoff der Analyten durch eine Alkylgruppe mittels Überschuss von Reagenz in methanolischer Lösung. Dabei bildet sich ein Ionischer Komplex aus Substanz-Anion und Reagenz-Kation. Im Injektor des GC kommt es ab ca. 200°C zur pyrolytischen Zerstörung dieses Komplexes und zur Alkylgruppenübertragung. Die flüchtigen Dialkylsulfide als Reaktionsnebenprodukte und als Abbauprodukte von überschüssigem Reagenz stören die gaschromatographische Bestimmung nicht, jedoch das „chemische Rauschen“ der üblichen Verunreinigungen von Derivatisierungsreagenzien [FÄRBER 1993; GEISLER 1994; SCHULTE 1989; MATTER 1991; BUTTE 1983].



**Abbildung 1: Reaktionsschema am Beispiel einer phenolischen Hydroxigruppe (Nonylphenol)**

Weiterhin wurden Versuche mit dem Reagenz Diazomethan durchgeführt; dessen Reaktionsmechanismus verläuft über die Abstraktion eines aciden Protons (von Carbonsäuren oder Alkoholen) durch das freie Elektronenpaar der Carbengruppe im Diazomethan, welches ein starkes nucleophiles Zentrum darstellt [GEISSLER 1994; NIEDAHN 1998; WERRES 2000].

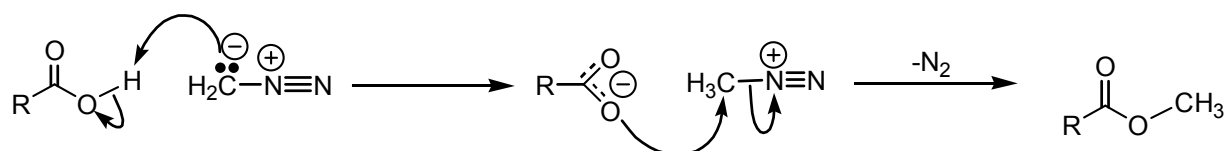


Abbildung 2: Schema der Reaktion von Diazomethan am Beispiel einer Carbonsäure

## Silylierung

Auch bei der Silylierung (genauer: Trimethylsilylierung, Details in Kap. 4.2) werden acide Protonen ersetzt, eine  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ -Gruppe wird eingeführt. Dies geschieht in Lösung, oft bildet das Reagenz selbst das Lösungsmittel, besonders wenn die Derivatisierung ein Eindampfen zur Trockne erfordert. Werden andere Lösungsmittel benutzt, ist auf Wasserfreiheit zu achten, da sonst die gebildeten Derivate schnell der Hydrolyse unterliegen. Pyridin ist als Lösungsmittel besonders geeignet, da es das Reaktionsgleichgewicht als Protonenakzeptor in Richtung der Produkte verschiebt [SUPELCO 1996].

Die Trimethylsilylierung läuft nach folgendem Schema über einen Übergangszustand mit einem pentakoordinierten Siliciumatom ab. Es handelt sich um eine bimolekulare nucleophile Substitution ( $\text{S}_{\text{N}}2$  Si-Reaktion). Der dargestellte Mechanismus gilt gleichermaßen für MSTFA, BSTFA und die in Sylon BTZ enthaltenen Komponenten. Bei der Verwendung von Katalysatoren fungieren diese als intermediäre Trimethylsilylgruppen- Übertrager, wobei die Amid- oder Amingruppen als Abgangsgruppen fungieren.

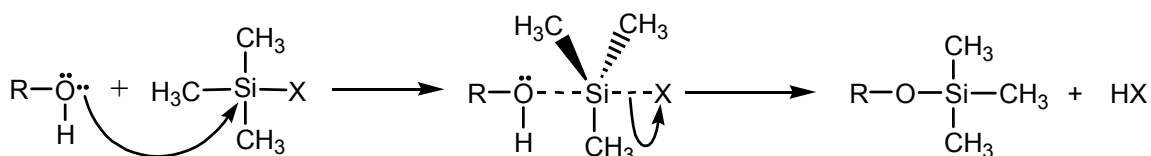


Abbildung 3: Schema der Trimethylsilylierung an einer Hydroxigruppe



„X“ steht für den Rest des Reagenzes, im Falle MSTFA ist  $X = F_3C-CO-NH-$ . So entsteht als Reaktionsnebenprodukt und als Abbauprodukt von überschüssigem Reagenz das flüchtige Trifluoracetamid, wodurch das reaktive MSTFA für die Silylierung in der GC besonders geeignet ist. „R“ steht für den Rest des Analyten, im Beispiel Nonylphenol ist  $R = C_9H_{19}-C_6H_4-$ .

## 2.3 Kapillargaschromatographie

**Zweck:** Durch die Gaschromatographie wird eine zeitaufgelöste Trennung der Analyten erreicht.

**Prinzip:** Es erfolgt eine Trennung der Komponenten voneinander gemäß der Stoffeigenschaften Polarität und Molmasse. Ein Trägergas (Helium, Wasserstoff oder Stickstoff) strömt mit den darin injizierten gasförmigen Substanzen durch eine dünne Kapillare mit einer auf der Innenseite aufgetragenen stationären Phase (Polysiloxan, je nach Material mit Methyl-, Phenyl- und anderen Gruppen modifiziert).

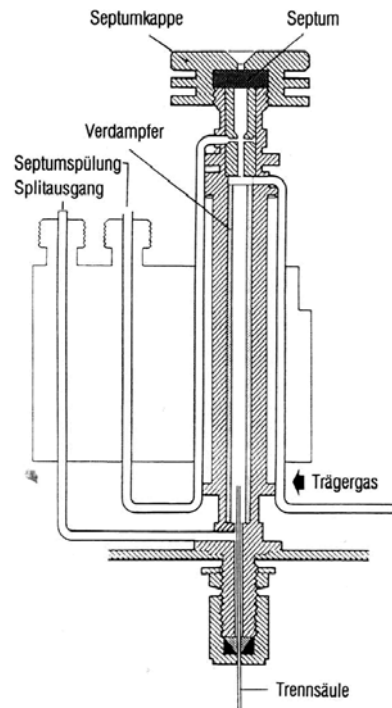
Die gasförmigen Substanzen treten mehr oder weniger stark in Wechselwirkung (vergl. oben: Festphasenextraktion, gleiche Mechanismen) mit dieser Phase und werden deswegen im sie transportierenden Trägergasstrom, während des Vorbeiströmens verschieden stark zurückgehalten.

Um die stark zurückgehaltenen Substanzen aus der Kapillarsäule herauszutreiben, wird der GC mit einem Temperaturprogramm gesteuert und während des GC-Laufes aufgeheizt. So verlassen die Substanzen alle nacheinander das Ende der Kapillarsäule.

Am Ende der Säule ist ein Detektor angeschlossen, um die Substanzen nachzuweisen. Von besonderer Bedeutung ist die Injektion. Als erster Schritt müssen die zu analysierenden Substanzen in die Gasphase gebracht werden. Hierzu bedient man sich verschiedener Techniken. Literatur: [GROB 1993; MUNARI 1995; HÜBSCHMANN 1996; GOTTWALD 1996]

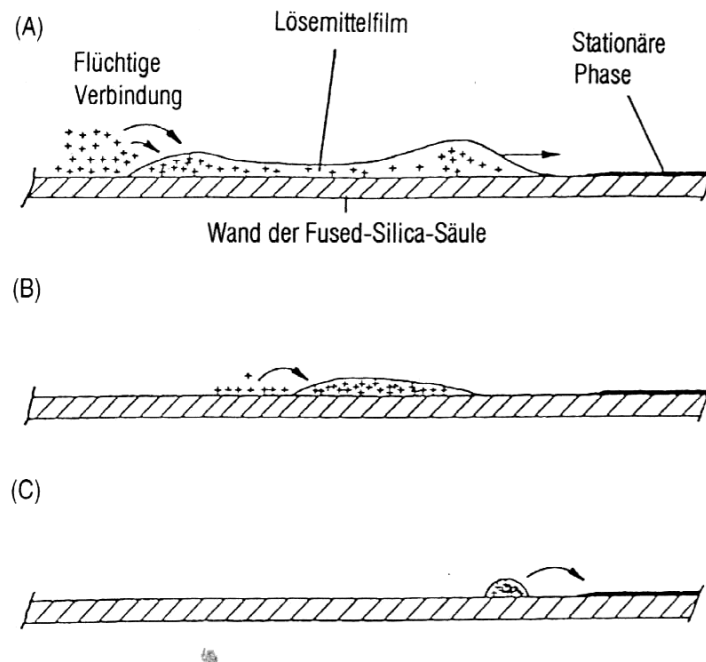
**Split-Injektion:** Ein kleines Volumen von 0,5-2  $\mu\text{l}$  wird in ein mit der Trennsäule verbundenes, beheiztes Glas- oder Quarzröhrchen (dies wird als Liner oder insert bezeichnet) mit geringem Innendurchmesser, eingespritzt. Die Temperatur beträgt 250-280°C, um ein schlagartiges Verdampfen aller, möglichst auch der schwerer flüchtigen Komponenten zu ermöglichen. Der Trägergasstrom ist jedoch aufgeteilt (gesplittet), meist im Verhältnis 1:10-1:100, und der größte Teil von Trägergas und Probe verlässt den Injektor über ein Auslassventil. Dafür ist der Probenauftrag sehr schnell und kurze, scharfe Peaks werden erhalten, was diese Methode für einige Anwendungen in der Rückstandsanalytik interessant macht, doch als Nachteile gelten die Diskriminierung von schwerer flüchtigen Verbindungen, die thermische Belastung, die bei empfindlichen Substanzen zur Zersetzung führen

kann und die geringe injizierte Menge (von der auch nur 1-10% auf die Säule gelangen). Deswegen wurde diese Methode nicht verwendet.



**Abbildung 4: Aufbau eines Split-/Splitless-Injektors**

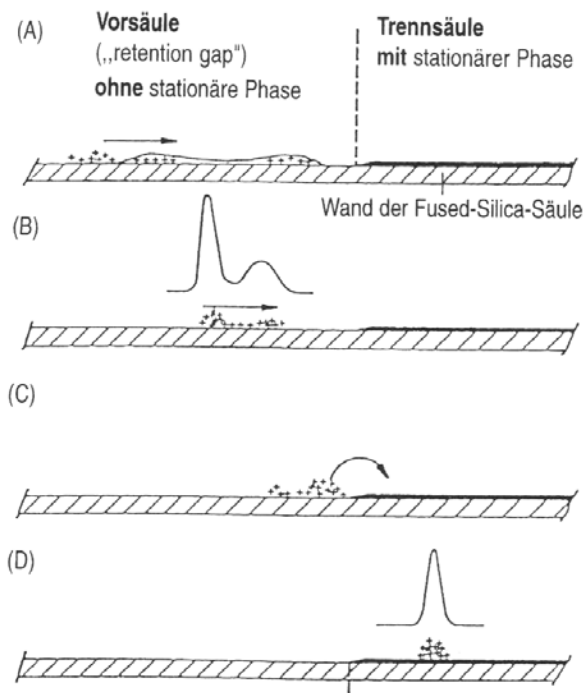
**Splitless-Injektion:** Es gelten die gleichen apparativen Bedingungen wie für die Split-Injektion, nur dass der Split geschlossen ist und die gesamte Messlösung analysiert wird, wofür ein Liner mit großem Innendurchmesser benötigt wird. Bis der gesamte Dampfraum mit allen Komponenten vom Trägergas auf die Säule gespült ist, vergehen bis zu 30 Sekunden, was unbrauchbar breite Peaks zur Folge hätte, würde man keine Vorsäule (Retention Gap) und den Lösungsmittelleffekt (Solvent Effect) nutzen (siehe Abb. 5). Auf dieser unbelegten Vorsäule rekondensiert das Lösungsmittel an den Wänden, da die GC-Anfangstemperatur unter dessen Siedepunkt liegt. Dadurch wirkt das Lösungsmittel wie eine stationäre Phase, welche die flüchtigen Komponenten stark festhält (reteniert), aber dabei von hinten nach vorne schrumpft, denn das vorbeiströmende Trägergas lässt das Lösungsmittel von den Wänden verdunsten und vorwärts wandern. Im letzten Moment des Verdampfens des Lösungsmittels werden die flüchtigen Analyten dann schlagartig freigesetzt, was zu den erwünschten scharfen Peaks führt.



**Abbildung 5: solvent effect für flüchtige Komponenten durch Refokussierung**

Die schwerflüchtigen Komponenten erhalten scharfe Peaks dadurch, dass sie zunächst auch auf der Vorsäule rekondensieren und dort verbleiben, auch nachdem das Lösungsmittel abgedampft ist siehe Abb. 6). Doch beim Ansteigen der Temperatur gemäß Temperaturprogramm setzen auch diese sich in Bewegung (in die Gasphase), dann werden sie am Übergang zur Trennsäule „ausgebremst“ (an der stationären Phase festgehalten) und bleiben im Anfangsbereich der Säule als schmale Bande stecken. Beim weiteren Erhöhen der Temperatur wandern sie erneut voran und werden als scharfe Peaks chromatographiert.

Dieser Effekt der Refokussierung schwerer flüchtiger Substanzen gilt ebenso für die Verwendung der Vorsäule in Kombination mit dem Kaltaufgabesystem (in dieser Arbeit wurden die beschriebenen Effekte auf diese Art ausgenutzt).



**Abbildung 6: Refokussierung schwerflüchtiger Analyten**

*Anmerkung:* Auch die Temperatur der Ion Trap (Ionenfalle) kann die Peakform beeinflussen; eine zu niedrige Temperatur kann eine schlechte Chromatographie oder inadäquate Probenaufgabe vortäuschen. Für die Analytik der Steroidhormone ist es erforderlich, die Ion Trap-Temperatur von 180°C auf 250°C hochzusetzen.

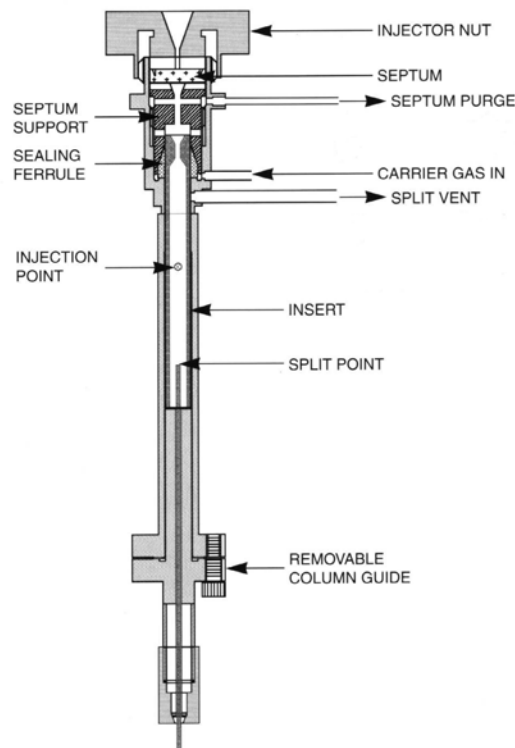
**On-Column-Injektion:** Bei dieser Methode kann ein relativ hohes Volumen (5-10 µl sind üblich) an Messlösung eingespritzt werden: Ohne einen Liner zu benutzen, wird die Spritze direkt in das Retention Gap eingeführt und dort entleert. Ohne eine vorherige Verdampfung (wie bei der Splitless-Injektion) setzt direkt der oben beschriebene Lösungsmittelleffekt (Refokussierung) ein. Um das hohe Volumen an Lösungsmittel effektiv abzdampfen, wird die Anfangstemperatur ca. 10°C (oder weniger) unterhalb des Siedepunktes (ggf. um den Druck korrigiert) gehalten. Die hohe Aufgabemenge ermöglicht erniedrigte Nachweisgrenzen und prädestiniert diese Methode für die Spurenanalytik. Allerdings ist sie bei einigen Komponenten sehr anfällig für Peakverbreiterung nach hinten (tailing ) durch polare Wechselwirkungen mit Matrix: Schon nach Injektion einer einzigen

relativ matrixhaltigen (verschmutzten) Probe können ausreichend viele polare (und somit unerwünschte) aktive Stellen in die Vorsäule Gap oder bis in die Trennsäule aufgetragen sein, daß bei bestimmten Analyten kaum mehr ein schmaler, symmetrisch geformter Peak erkannt werden kann. Auch das Ausheizen zur Reinigung des GC schafft hierbei keine Abhilfe, meistens nur eine neue Vorsäule. Für relativ saubere Proben ist die On-Column-Injektion jedoch eine gut geeignete Methode.

**Headspace-Injektion:** Flüchtige Analyten können durch Aufheizen eines Probengläschens in die Gasphase überführt werden und mit einer Spezial-Gasspritze in den GC injiziert werden. Eine Sonderform ist die dynamische Headspace-Technik (Purge & Trap), bei der mittels eines Gasstromes durch die (ggf. erwärmte) Probe die Analyten ausgetrieben und auf geeigneten Sorbentien in einer gekühlten Falle wieder zurückgehalten werden. Durch Aufheizen der Falle erfolgt Desorption und Transfer auf die GC-Säule.

**SPME (solid phase micro extraction)** Diese Methode vereint die Extraktion auf praktische Weise mit der Injektion. Eine dünne Faser aus speziellem Sorbensmaterial wird in ein Probengefäß geführt. Sowohl die flüssige als auch die gasphase können untersucht werden. Die Analyten diffundieren in das Material hinein, es stellt sich ein Gleichgewicht ein, was durch Rühren mit der Faser beschleunigt werden kann. Wenn diese Faser dann in den heißen Injektor des GC eingeführt wird, desorbieren die Substanzen wieder und gelangen in die Gasphase.

**Kaltaufgabe (PTV = Programmed Temperature Vaporizer, Solvent Split Purge Modus):** Der PTV besitzt einen Liner, der programmierbar exakt beheizt werden kann, sowie einen Splitausgang. Der Liner ist für Injektionen von höheren Probenvolumina (large volume injection) mit einer Glasfritte, Carbofritte oder mit einer Füllung aus desaktivierter Glaswolle versehen, um die eingespritzten Flüssigkeitsmengen aufzunehmen. Nach oder bereits während der Injektion wird der Split geöffnet und mit Trägergas wird das Lösungsmittel abgeblasen (bei sehr langsamer Injektion bei gleichzeitiger Trocknung können nahezu beliebig große Probenvolumina aufgegeben werden). Dann wird der Liner programmiert aufgeheizt (moderne Geräte bieten vielfältige Steuerungsmöglichkeiten) und die aufgebrauchten Analyten bei geschlossenem Split auf die Säule gebracht. Weitere firmeneigene Bezeichnungen für einen derartigen Injektor sind KAS (Gerstel) oder SPI (Varian).



**Abbildung 7: Schema eines Kaltaufgabesystems (Varian)**

Von der Temperaturbelastung her ist diese Methode sehr schonend für die Analyten. Mit aufgetragene Matrixbestandteile (zum größten Teil nicht flüchtig) verbleiben auf Fritte oder Glaswolle, verschmutzen nicht die Säule, stören folglich nicht die Chromatographie und können am Ende einer Probenreihe durch Ersatz von Glaswolle und Carbofritte oder durch Ausglühen des Liners mit der eingebauten Glasfritte entfernt werden. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit des Einbringens von Derivatisierungsmitteln, die in der definierbaren Aufheizphase mit den Analyten reagieren können (in dieser Arbeit angewendet). Durch die möglichen hohen Probeaufgabemengen können wie bei der On-Column-Technik geringe Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erreicht werden.

Im folgenden werden kurz die Arbeitsprinzipien der wichtigsten Detektoren in der GC skizziert:

**Massenspektrometer (MS):** siehe Kap. 2.4.

**Flammenionisationsdetektor (FID):** Durch Zufuhr von Wasserstoff wird das Eluat der GC-Säule an einer Düse entzündet. In der Flamme werden organische Stoffe zunächst zu Radikalen, dann durch Oxidation von in der Flamme befindlichen OH-Radikalen zu positiv geladenen Ionen, wobei sie Elektronen freisetzen. Diese werden von der Sammelelektrode aufgefangen und als Signalstrom registriert

Als sehr allgemeiner Detektor fehlt dem FID die Empfindlichkeit und die Spezifität bzw. die qualitative Aussage, die z.B. das Massenspektrometer als Detektor liefert, und dies wird bei der Interpretation der komplexen Chromatogramme der Umwelt- und Wasserproben benötigt.

**Elektroneneinfangdetektor (ECD):** Halogenorganische Verbindungen (oder Verbindungen mit anderen elektronenziehenden Substituenten z.B. Nitrogruppen) fangen langsame Elektronen ein, die von einem Beta-Strahler (Nickel-63) ausgesendet werden und verringern so den Strom zwischen zwei Elektroden. Der verringerte Stromfluß wird ausgeglichen und dieser Kompensationsstrom bildet das Signal für die Peakintensität.

Dieser sehr empfindliche Detektor eignet sich besonders zur spezifischen Spurenanalytik halogenierter Verbindungen, jedoch nicht als allgemeiner Detektor, wie er in dieser Arbeit benötigt wurde.

## 2.4 Massenspektrometrie

**Zweck:** Das Massenspektrometer dient zur empfindlichen Detektion der zu bestimmenden Komponenten und erlaubt (sozusagen als zweite Dimension des Analysenverfahrens) deren Identifikation.

**Prinzip:** Von den verschiedenen Techniken der Massenspektrometrie soll zunächst das Gemeinsame erläutert werden.

Die am häufigsten angewendete Ionisierungsmethode ist die Elektronenstoß-Ionisation (EI): Durch Elektronenbeschuss im Hochvakuum werden die in der Gasphase befindlichen Substanzen ionisiert und zerfallen in charakteristischen Fragmentierungsvorgängen in positiv und negativ geladene Bruchstücke.

Weitere Ionisationsmethoden sind die chemische Ionisation (CI, zunächst wird ein Reaktandgas ionisiert und dieses wiederum ionisiert die Moleküle der gasförmigen Substanzen), die negative chemische Ionisation (NCI, gleiches Prinzip), die Photoionisation (mittels Photonen), die Feld-Desorption (Ionisation der festen Probe an einer nadelförmigen Spitze in einem starken elektrischen Feld) und der Beschuss von festen Proben mit Schwermetall-Ionen (Particle Beam). Die CI wäre zur Durchführung dieser Arbeit optional möglich gewesen, wurde wegen der hohen Menge an in den Proben vorhandener Matrix jedoch nicht in Betracht gezogen.

Die elektrisch geladenen Fragmente werden entsprechend ihrer Masse (genauer: dem Masse/Ladungsverhältnis) vom angelegten elektromagnetischen Wechselfeld nacheinander in den Sekundär-Elektronen-Vervielfacher (SEV, Multiplier) geleitet, wo sie ein elektrisches Signal erzeugen. So wird von jeder Substanz ein Pattern von Bruchstücken und deren relativer Intensität zueinander erhalten; dieses Massenspektrum ist charakteristisch für jede Substanz und dient zur Identifizierung.

Von der technischen Ausführung her gibt es wiederum verschiedene Bauweisen von MS, die wichtigsten sollen hier eine kurze Erläuterung finden. Literatur: [HÜBSCHMANN 1996; RÜSSEL 1986; GOTTWALD 1996; RÜCKER 1988]

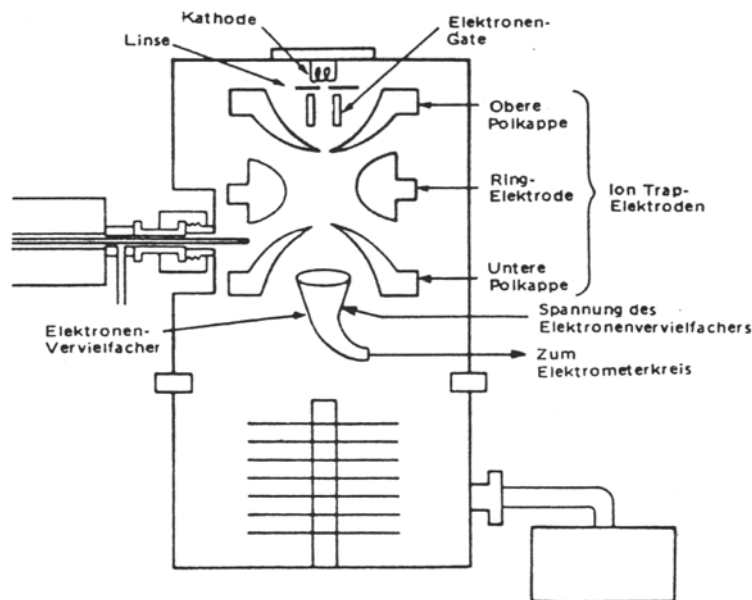
### 2.4.1 MS-Typen

#### **Ion-Trap-MS (in dieser Arbeit verwendet)**

Bei diesen Modellen werden die erzeugten positiven Ionen/Fragmente nach dem Prinzip der Ionenfalle (Ion Trap) durch das angelegte elektromagnetische Feld (an den End Caps = Polkappen) in einer fünfmarkstückgroßen Kammer aus Teflon/Edelstahl auf stabilen hantelförmigen Bahnen gehalten.



Durch Anlegen einer elektrischen Spannung an der Ringelektrode werden die Ionen in Abhängigkeit von Ihrem  $m/z$ -Verhältnis auf ihren Bahnen destabilisiert, vom SEV (negative Spannung von  $-1500$  bis  $-3000$  Volt) angezogen und dort detektiert.



**Abbildung 8: prinzipieller Aufbau einer Ion Trap**

**Quadrupol-MS:** Die erzeugten Ionen werden auf Ihrer Flugstrecke zwischen Ionisation und SEV von vier parallel zur Flugstrecke angebrachten Stäben, an denen ein elektromagnetisches Wechselfeld anliegt, unterschiedlich stark von einer geradlinigen Flugbahn abgelenkt und erreichen deswegen zu verschiedenen Zeiten den SEV.

**Sektorfeld-MS:** Nach Ionisierung und Fragmentierung werden die Teilchen durch ein System von elektrischen Linsen beschleunigt und erst durch ein elektrisches, dann ein magnetisches Feld geleitet. Durch Variation der Feldstärken werden nur ganz bestimmte Ionen eines genauen  $m/z$ - Verhältnisses hindurchgelassen. Die Genauigkeit dieser Sektorfeld-Geräte (sogenannte Hochauflösung, bis zur sechsten Nachkommastelle der Masse) ermöglicht eine exakte Bestimmung der Summenformel, diese Geräte sind allerdings sehr groß und teuer.

## 2.4.2 MS-Arbeitsmodi

### 2.4.2.1 Full-Scan (Messung von großen Massenbereichen)

Dies ist die Standard-Betriebsweise der Ion-Trap-Massenspektrometer, zugleich die aussagekräftigste für Proben, die unbekannte Komponenten enthalten. Sie können meist durch ihr Full-Scan-Massenspektrum identifiziert werden, sofern ein Referenzspektrum in einer MS-Bibliothek enthalten ist. Zur Aufnahme voller Massenspektren wird die Ion Trap so geschaltet, dass die Aufnahme in vier Segmenten und einer vorhergehenden Überprüfungsmessung (Pre-Scan) erfolgt.

Der Vor-Scan (Pre-Scan) dient zur Ermittlung der optimalen Füllung der Ion Trap mit Ionen, denn zu wenig gespeicherte Ionen bedeuten geringe Empfindlichkeit, zu viele Ionen bewirken aufgrund zu hoher Konzentration von positiver Ladung im begrenzten Raum der Ion Trap eine Abstoßung der Ionen voneinander sowie nicht ausreichende Auswurfzeit für die häufigsten Ionen, was einen falschen Auswurfszeitpunkt und somit falsche  $m/z$ -Berechnung und verzerrte Massenspektren bewirkt. Dieses Problem wird größtenteils durch die variable Ionisationszeit, die Automatic Gain Control (AGC) gelöst: Der Vor-Scan (auch Spion-Scan genannt) misst bei fester Ionisationszeit das Gesamt-Signal (Füllmenge der Ion Trap) im Schnelldurchlauf und berechnet daraus die Ionisationszeit ( $t_i$ ) zur optimalen Füllmenge: Bei Anwesenheit von sehr vielen Ionen sinkt die  $t_i$  im Haupt-Scan auf das Minimum von 73  $\mu\text{sec}$ , sodass nur ein geringer Bruchteil der ankommenden Substanzmenge ionisiert wird. Bei extrem geringer Substanzmenge kann die  $t_i$  auf 25000  $\mu\text{sec}$  (beim Saturn 2000-Gerät) ansteigen, um einen möglichst großen Anteil der ankommenden Materie als Ionen in die Ion Trap zu laden.

Die vier Segmente teilen die Aufnahme des Massenspektrums in die Bereiche 20-99u, 100-249u, 250-449u und 450-650u. Die zwei unteren umfassen kleinere Bereiche, da meist der Anteil und die Intensität der kleineren Ionen höher ist. Die oberen Grenzen der Speicherbereiche werden durch die jeweilige Radiofrequenz an den Polkappen (end Caps) festgelegt, die untere durch die Spannung an der Ringelektrode. 10V entsprechen 1u (genauer: 1  $m/z$ ) d.h. in 10 V-Schritten wandert die Ringelektroden-Spannung so schnell, dass in einer Sekunde mehrere Massenspektren von 20-650 u aufgenommen werden können.

Diese Betriebsweise wurde für die Messung der unterivatisierten Substanzen benutzt sowie (vor der Anschaffung des Varian Saturn 2000) bei allen Messungen mit dem Finnigan ITD 800, der nicht über eine MS/MS-Option verfügt.

#### 2.4.2.2 SIS und SIM (Messung von wenigen, ausgesuchten Massen)

Im Single Ion Storage (SIS)-Modus bei Ion-Trap-Geräten werden Ionen einer festgelegten Masse in bestimmten Zeitfenstern selektiv gespeichert, wodurch für diese Ionen ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis resultiert. Sie ist die der bei Quadrupol-MS oft angewendeten Single Ion Monitoring (SIM)-Technik vergleichbare Arbeitsweise. Bei der Anwendung der SIM-Technik werden allerdings keine festgelegten Ionen gespeichert, sondern alle übrigen Ionen durch das elektromagnetische Wechselfeld ausgeworfen und nicht vom SEV erfasst. Die MS/MS-Technik war allerdings im Rahmen dieser Arbeit der SIS-Technik in der praktischen Messung matrixhaltiger Proben überlegen.

#### 2.4.2.3 MS/MS-Technik (Fragmentierung von Fragmenten)

Die MS/MS-Betriebsweise erhöht die Spezifität der erhaltenen Ergebnisse, ermöglicht erniedrigte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und befreit die Detektion von einem Großteil an Störsignalen. Sie wurde zur Analytik der derivatisierten Substanzen angewendet

Der erste Schritt der Ausblendung von unerwünschten Signalen besteht in der Isolation und Speicherung der Parent Ions (der zu fragmentierenden Ionen). Diese stellen normalerweise das stärkste Ion im Full-Scan-Massenspektrum einer Substanz dar und werden als Quantifizierungs-Ion verwendet. Die Speicherung findet in einem festgelegten Zeitfenster statt, in welchem die Retentionszeit der betreffenden Substanz liegt. Eine jeweils definierte (von der Masse des Parent Ions abhängige) Radiofrequenz und Ringelektroden-Spannung wird während dieser Zeitspanne angelegt. So werden nur Ionen mit einer bestimmten Masse aus dem gesamten Spektrum herausgefiltert und im Vergleich zum Full Scan-Spektrum durch eine längere Ionisationszeit zusätzlich angereichert.

Es folgt die zweite Fragmentierung: Die in der Ion Trap gespeicherten Ionen werden von den End Caps her mit einem elektromagnetischen Feld einer bestimmten Frequenz angeregt. Die so aufgenommene Energie der Ionen führt beim Zusammenprall mit den Helium-Atomen des Trägergases zu einem erneuten Zerfall, der die Ionen des Tochtterspektrums (Product Ions) ergibt. Die Anregungsfrequenz entspricht dem  $m/z$ -Verhältnis der Ionen, die angelegte Anregungsenergie (die zu optimierende MS/MS-Voltage) ist von der Stabilität der Parent Ions abhängig. Diese Anregung kann im nonresonanten Modus (bei dem in einem kaskadenartigen Zerfall auch die erzeugten Tochterionen wiederum angeregt werden und ein Mehrfachzerfall mit starker Fragmentierung eintritt) oder resonant erfolgen, wobei nur das Parent Ion angeregt wird und ein weniger stark fragmentiertes Spektrum erhalten wird. Sollten Co-Elutionen eines Peaks mit Verunreinigungen gleicher Masse wie das Parent Ion des Analyten auftreten, so entstehen aus diesen falschen Parent Ions doch mit hoher Wahrscheinlichkeit andere Product Ions, sodass in der Regel die Quantifizierung der gewünschten Product Ions über ihre Ionenchromatogramme ungestört möglich ist (siehe aber auch Kap. 4.5.5).

### 3 Verwendete Materialien und apparative Ausstattung

#### 3.1 Reagenzien- und Standardsubstanzen-Listen

Tabelle 1: Reagenzien und Materialien:

Substanz	Bezugsquelle
MSTFA	Merck, Darmstadt
NaOH, 1n	Merck, Darmstadt
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1n	Merck, Darmstadt
Sylon BTZ	Supelco, Deisenhofen
DTE	Fluka, CH-Buchs
TMIS	Fluka, CH-Buchs
MTBSTFA	Fluka, CH-Buchs
BSTFA	Fluka, CH-Buchs
HFBSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diazomethan	Selbst hergestellt
TMSH	Fluka, CH-Buchs
TESH	Prof. H.F. Schöler, Inst. f. Umweltgeochemie, Heidelberg
TBSH	Prof. H.F. Schöler, Inst. f. Umweltgeochemie, Heidelberg
Pyridin	Merck, Darmstadt
RP-18 Polar Plus Sorbens	Baker, Giesheim
Glaskartuschen	Baker, Giesheim
Teflonfritten	Baker, Giesheim

**Tabelle 2: Standardsubstanzen, die derivatisierte Stoffgruppe:**

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Techn. Octylphenol</b>	Promochem, Wesel
<b>Techn. Nonylphenol</b>	Promochem, Wesel
<b>n-Nonylphenol</b>	Ehrenstorfer, Augsburg
<b>Bisphenol A</b>	Fluka, CH-Buchs
<b>Diethylstilbestrol</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<b>Hexestrol</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<b>Androsteron</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<b>Estron</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<b>17-β-Estradiol</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<b>Mestranol</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<b>17-α-Ethinylestradiol</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<b>2-Fluorestradiol</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<b><sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Ethinylestradiol</b>	Prof. L. Siekmann, Inst. f. klin. Biochemie, Bonn

**Tabelle 3: Standardsubstanzen, nicht derivatisierte Stoffgruppe**

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Atrazin</b>	Ehrenstorfer, Augsburg
<b>Atrazin-D5</b>	Ehrenstorfer, Augsburg
<b>α-Endosulfan</b>	Ehrenstorfer, Augsburg
<b>β-Endosulfan</b>	Ehrenstorfer, Augsburg
<b>Diethylhexylphthalat</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<b>Benzylbutylphthalat</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<b>Dibutylphthalat</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<b>Diethylphthalat</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<b>Bischlorphenylsulfon</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<b>PCB 28</b>	Ehrenstorfer, Augsburg
<b>PCB 52</b>	Ehrenstorfer, Augsburg
<b>PCB 101</b>	Ehrenstorfer, Augsburg
<b>PCB 138</b>	Ehrenstorfer, Augsburg
<b>PCB 153</b>	Ehrenstorfer, Augsburg
<b>PCB 180</b>	Ehrenstorfer, Augsburg
<b>PCB 194</b>	Ehrenstorfer, Augsburg
<b>o, p-DDT</b>	Ehrenstorfer, Augsburg
<b>p,p-DDT</b>	Ehrenstorfer, Augsburg
<b>o, p-DDE</b>	Ehrenstorfer, Augsburg

### 3.2 GC/MS/MS-System Saturn 2000

Tabelle 4: Ausstattung und Messbedingungen, falls bei bestimmten Versuchen nicht anders angegeben

<b>Autosampler</b>	Varian 8200CX
<b>Injektor</b>	Varian SPI 7800
<b>Injektor Liner</b>	Glas, fritted, l=55 mm, i.d.=3,4 mm
<b>Injektion</b>	Solvent Split Purge-Modus
<b>Injektionsvolumen</b>	10 µl, schnell eingespritzt
<b>Injektorprogramm</b>	0,2 min bei 60°C, 100°C/min Aufheizrate, Endtemperatur 350°C. 15 min
<b>Split</b>	offen bei 0,01 min, geschlossen bei 0,2 min, offen bei 3,1 min, Splitfluß 100 ml/min
<b>GC</b>	Varian Star 3400CX
<b>Säule</b>	30 m XTI-5 (Restek) 0.25 mm ID, 0.25 µm FD
<b>Ret. Gap</b>	3 m FS-Phenyl-Sil desact. (C&S) 0.32 mm ID
<b>Trägergas</b>	He, 15 psi Vorsäulendruck; 1,4 ml/min
<b>Temperaturprogramm</b>	58°C(1)-25-180°C(0)-5-240°C(0)-48-280°C(15)
<b>Kopplung mit MS</b>	Direkt, Transfer Line 280°C
<b>MS</b>	Varian Saturn 2000 (Ion Trap)
<b>Modus</b>	Full-Scan oder MS/MS resonant, mass range 75-520 u, EI 70eV.
<b>Software (Messung)</b>	Saturn 2000 Vers.1.3(Varian) / Saturn Workstation
<b>Software (Auswertung)</b>	Saturn 2000 Vers.1.3(Varian) / Saturn Workstation

### 3.3 GC/MS-System ITD 800

Tabelle 5: Ausstattung und Messbedingungen, falls bei bestimmten Versuchen nicht anders angegeben

<b>Autosampler</b>	Carlo Erba A 200 S
<b>Injektor</b>	Carlo Erba PTV MFA 515
<b>Injektor Liner</b>	100 mm Glas, ID 1 mm, gefüllt mit silanisierter
<b>Injektion</b>	Solvent Split Purge-Modus
<b>Injektionsvolumen</b>	8 µl, schnell eingespritzt
<b>Injektorprogramm</b>	100 sec bei 60°C, max. Heizrate bis 280°C, halten bis GC Temp.Prog. Ende
<b>Split</b>	Max. geöffnet, 0-100 s, 60 s geschlossen, dann geöffnet
<b>GC</b>	Carlo Erba HRGC 5160
<b>Säule</b>	30 m DB5MSITD (J&W, low bleed) 0.25 mm ID, 0.25
<b>Ret. Gap</b>	3 m FS-Phenyl-Sil desact. (C&S) 0.32 mm ID
<b>Trägergas</b>	He, 120 kPa Säulenvordruck
<b>Temperaturprogramm</b>	58°C(1)-25-180°C(0)-5-240°C(0)-48-280°C(15).
<b>Kopplung mit MS</b>	Direkt, Transfer Line 280°C
<b>MS</b>	ITD 800 (Finnigan Ion Trap)
<b>Modus</b>	Full-Scan, mass range 75-450 u, EI 70eV.
<b>Software (Messung)</b>	ITDS (Finnigan)
<b>Software (Auswertung)</b>	Saturn 2000 Vers.1.3(Varian)

### 3.4 Ansatz der Standards

Entsprechend der verschiedenen Konzentrationsbereiche, in denen die verschiedenen Stoffgruppen in Wasser auftraten, wurden die Standards mit drei parallel laufenden Levels angesetzt.

**Stammlösung der externen Standards, ohne ISTD's, im folgenden „EWS-EXT“ genannt**

Steroidhormone, PCB, Pestizide, BCPS:	0,1 mg/l
Bisphenol A, techn. Nonylphenol, techn. Octylphenol:	0,5 mg/l
Phthalate	5,0 mg/l

Substanz	Einzel-Stammlösung	Volumen
Diethylhexylphthalat	1000 mg/l	0,1 ml
Diethylphthalat	1000 mg/l	0,1 ml
Dibutylphthalat	1000 mg/l	0,1 ml
Benzylbutylphthalat	1000 mg/l	0,1 ml
Bisphenol A	10 mg/l	1,0 ml
techn. Nonylphenol	10 mg/l	1,0 ml
techn. Octylphenol	10 mg/l	1,0 ml
PCB-Mix	je 1 mg/l	2,0 ml
Atrazin	10 mg/l	0,2 ml
Lindan	10 mg/l	0,2 ml
$\alpha$ -Endosulfan	10 mg/l	0,2 ml
$\beta$ -Endosulfan	10 mg/l	0,2 ml
BCPS	10 mg/l	0,2 ml
Estradiol	10 mg/l	0,2 ml
Estron	10 mg/l	0,2 ml
Androsteron	10 mg/l	0,2 ml
Ethinylestradiol	10 mg/l	0,2 ml
Mestranol	10 mg/l	0,2 ml

Auffüllen mit Ethylacetat zu 20,0 ml  $\Rightarrow$  externe Standard-Stammlösung

### Stammlösung der internen Standards, im folgenden „EWS-INT“ genannt

2-Fluorestradiol für die Steroidhormone	1 mg/l
n-Nonylphenol für die Alkylphenole und Bisphenol A	1 mg/l
Atrazin-D <sub>5</sub> für die nicht derivatisierten Substanzen	1 mg/l

Substanz	Einzel-Stammlösung	Volumen
2-Fluorestradiol	10 mg/l	1 ml
Nonylphenol	10 mg/l	1 ml
Atrazin-D <sub>5</sub>	10 mg/l	1 ml

Auffüllen mit Ethylacetat zu 10,0 ml ⇒ interne Standard-Stammlösung

Diese Lösung wurde zum Dotieren der Wasserproben verwendet, sowie zum Ansatz der Kalibrierstandards (alle in Ethylacetat gelöst).

Die internen Standards (ISTD's) dürfen nicht originär in der Probenmatrix vorhanden sein und müssen in bezug auf das Analysenverfahren ähnliche Eigenschaften wie die zu analysierenden Substanzen aufweisen. Für die nicht derivatisierte Stoffgruppe wurde demnach Atrazin-D<sub>5</sub> als ISTD ausgewählt, für die Alkylphenole und Bisphenol A in der derivatisierten Stoffgruppe n-Nonylphenol, für die Steroidhormone zunächst <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Ethinylestradiol, wegen nicht erwarteten Interferenzen in der Analytik (siehe Kap. 4.5.5.) wurde dann zu 2-Fluorestradiol als ISTD gewechselt (ähnlich wie isotope markierte Hormone kommen die fluorierten Hormone nicht in der Natur vor; sie wurden in den 60er Jahren ohne klinischen Erfolg als mögliche Therapeutika beforscht [SCHLEBUSCH 1998]).

Anm.: Im generellen Sprachgebrauch wird der Begriff „interner Standard für“ für Surrogat-Standards verwendet. Interne Standards im engeren Sinne dienen zum Ausgleich von Ungenauigkeiten der Injektionsvolumina und Empfindlichkeitsschwankungen des Detektors. Sie werden ohne Probenvorbereitung der Messlösung vor der Injektion zugesetzt. Surrogat-Standards sollen die Schwankungen der Extraktionsmethode und Probenvorbereitung allgemein ausgleichen. Da die hier aufgeführten „internen Standards“ den Proben vor der Extraktion zudotiert wurden, handelt es sich genau genommen um Surrogat-Standards [HÜBSCHMANN 1996].



## Kalibrierstandards

Es wurden 10 Kalibrierpunkte gesetzt, um einen großen Arbeitsbereich zu erhalten.

Level No.	1	2	3	4	5
Volumen EWS-EXT ( $\mu\text{l}$ )	10	20	30	40	60
Volumen EWS-INT ( $\mu\text{l}$ )	50	50	50	50	50
Volumen Ethylacetat ( $\mu\text{l}$ )	940	930	920	910	890
<b>Entsprechende Konzentration in Probe (ng/l)</b>					
Steroidhorm., PCB, Pestizide	0,5	1	1,5	2	3
Alkylphenole, Bisphenol A	2,5	5	7,5	10	15
Phthalate	25	50	75	100	150

Level No.	6	7	8	9	10
Volumen EWS-EXT ( $\mu\text{l}$ )	100	200	300	400	800
Volumen EWS-INT ( $\mu\text{l}$ )	50	50	50	50	50
Volumen Ethylacetat ( $\mu\text{l}$ )	850	750	650	550	150
<b>entsprechende. Konzentration in Probe (ng/l)</b>					
Steroidhorm., PCB, Pestizide	5	10	15	20	40
Alkylphenole, Bisphenol A	25	50	75	100	200
Phthalate	250	500	750	1000	2000

## Dotierung

Wasserproben von 1 l wurden mit 25  $\mu\text{l}$  der internen-Standard-Lösung EWS-INT (s.o.) dotiert. Es erfolgte dabei eine mit Zwischenverdünnung in 50 ml Methanol als Lösungsvermittler, der auch zur dynamischen Solvatisierung der Extraktionskartuschen diente. Es ergaben sich somit Endkonzentrationen von 25  $\mu\text{g/l}$  an internen Standards in den Proben.

Wiederfindungen in 1 l Leitungswasser wurden (ebenfalls mit Zwischenverdünnung in Methanol) mit 100  $\mu\text{l}$  der externen Standard-Lösung EWS-EXT angesetzt. Daraus ergaben sich Konzentrationen von 500 ng/l für die Phthalate, 50 ng/l für Bisphenol A und die Alkylphenole und 10 ng/l für alle übrigen Substanzen.

### 3.5 Arbeitsvorschrift für Analysengang

#### Analysenschema

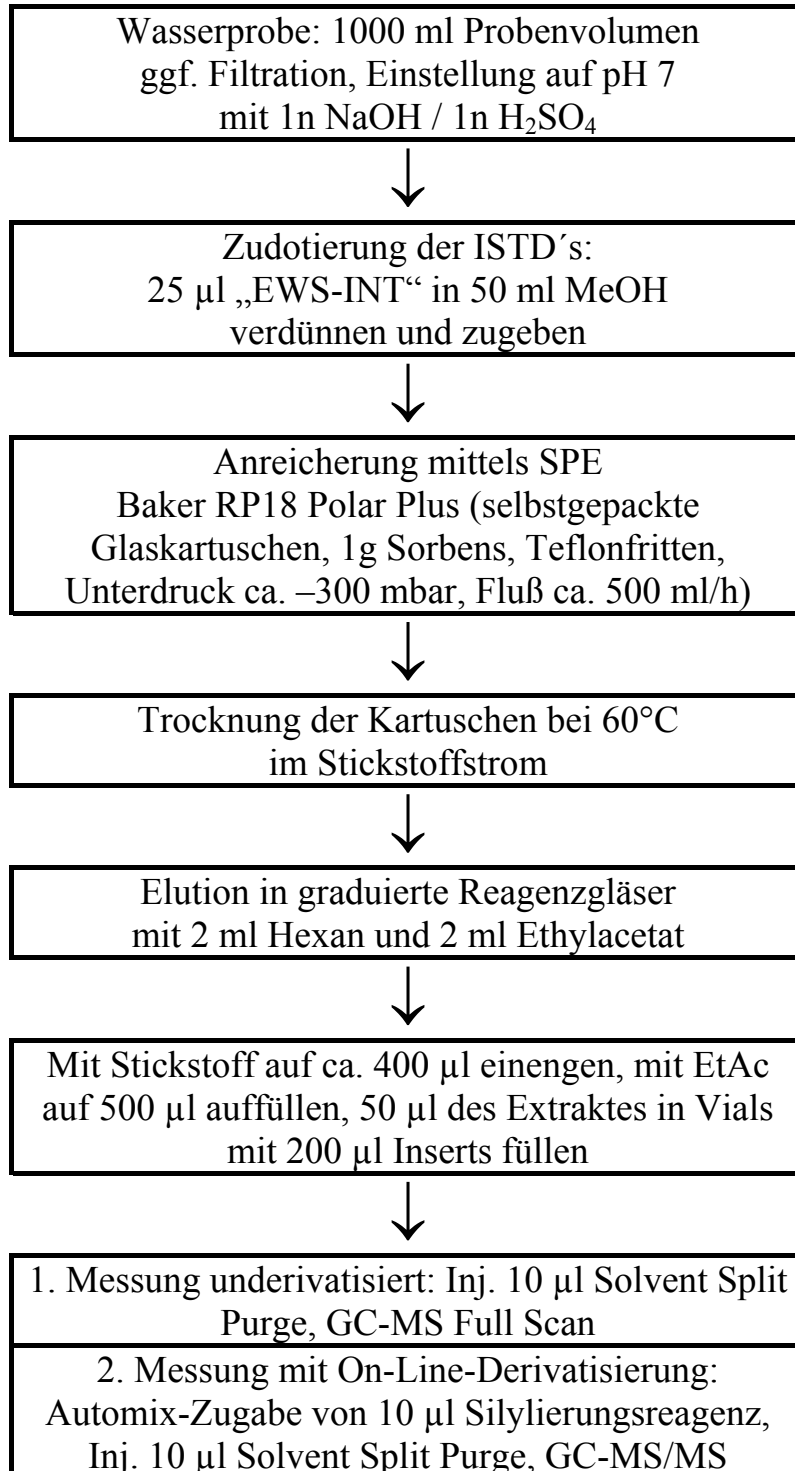


Abbildung 9: Analysenschema

Die Wasserproben von 1 l Volumen wurden bei Bedarf (trübe Proben) über Glasfaserfilter filtriert. Durch Zugabe von wenigen Tropfen 1-normaler Natronlauge oder 1-normaler Schwefelsäure wurde der pH von 7,0 eingestellt. Die internen Standards wurden durch Verdünnen ihrer Stammlösung in 50 ml Methanol hinzugegeben, durch Methanol wurde gleichzeitig die „dynamische Solvatisierung“ der Festphase ermöglicht. Es wurden selbstgefüllte Glaskartuschen mit Teflonfritten und einer Packung aus 1 g Sorbens RP-18 Polar Plus verwendet. Vor der Extraktion wurden die Kartuschen gewogen, um nachher die Trocknung kontrollieren zu können. Sie wurden mit 3 ml Hexan, 3 ml Ethylacetat, 15 ml Methanol und 3 ml bidestilliertem Wasser (Quarz-Destille) gereinigt und konditioniert. Die Extraktion erfolgte mit einem Fluss von 500 ml/h bei einem Unterdruck von -300 mbar (ggf. erhöht bei schlecht laufenden Proben). Nach der Extraktion wurden die Kartuschen für ca. 60 min bei 60°C im Stickstoffstrom getrocknet und das Gewicht kontrolliert. Die Elution wurde mit 2 ml Hexan, gefolgt von 2 ml Ethylacetat in graduierte Reagenzgläser hinein durchgeführt. Reste von Elutionsmittel wurden mittels einer Ballpumpe aus den Kartuschen herausgedrückt. Mit Stickstoff wurden die Eluate jeweils auf ca. 400 µl eingengt und mit Ethylacetat auf 500 µl ergänzt. (Detaillierte Durchführung der Festphasenextraktion: siehe unten) Ein Aliquot von 50 µl Eluat aus der Festphasenextraktion oder 50 µl Standards wurden in Vials mit 200 µl-insert gefüllt (1) und im Autosampler-Rack positioniert. Hinzu kam ein Vial mit einem Vorrat an MSTFA-Reagenzmischung (2). Je Probe oder Standard wurden zwei Messungen durchgeführt: Die erste Messung erfolgte ohne Zusatz von Reagenz für die Substanzen der nicht derivatisierten Stoffgruppe. Dazu wurden zunächst 10 µl aus dem betreffenden Vial mit Messlösung eingespritzt und chromatographiert. (In Abweichung zu den o.a. Messbedingungen wurde für diese Substanzen der Injektor mit 290°C/min aufgeheizt.) Die zweite Messung erfolgte mit On-Line-Derivatisierung: Laut Programmierung des Autosamplers in der SampleList mit "Automix"-Option für die entsprechenden Vials wurden jeweils 10 µl Reagenzmischung aus dem MSTFA-Vial zum Proben-Vial mit den verbliebenen 40 µl gegeben, durch Kolbenhub gemischt (3). und 30 min Reaktionszeit gehalten. (Mit der Softwareversion Saturn 2000 1.3 geschieht dies während des vorhergehenden GC-Laufes). Aus diesem Vial wurden 10 µl aufgezogen und in den temperaturprogrammierten Injektor eingespritzt (4).

Vergleichbare Analysenprinzipien (jedoch ohne On-Line-Derivatisierung) zur Bestimmung von Steroidhormonen, Alkylphenolen, Phthalaten oder Bisphenol A werden von verschiedenen Autoren beschrieben [STUMPF 1996; SCHLETT 1996; TERNES 1999; TYLER 1998; THIELE 1999; BOLZ 2000; SMITH 2000; THUREN 1986; KUCH 1999; DE VOOGT 1999; SAWAL 1999; VAN DER VELDE 1999; DING 1999; DEL OLMO 1997; SUN 1997; JAHR 1998; KELLY 1999; SMITH 2000; YOUNG 2000; FREY 2000].

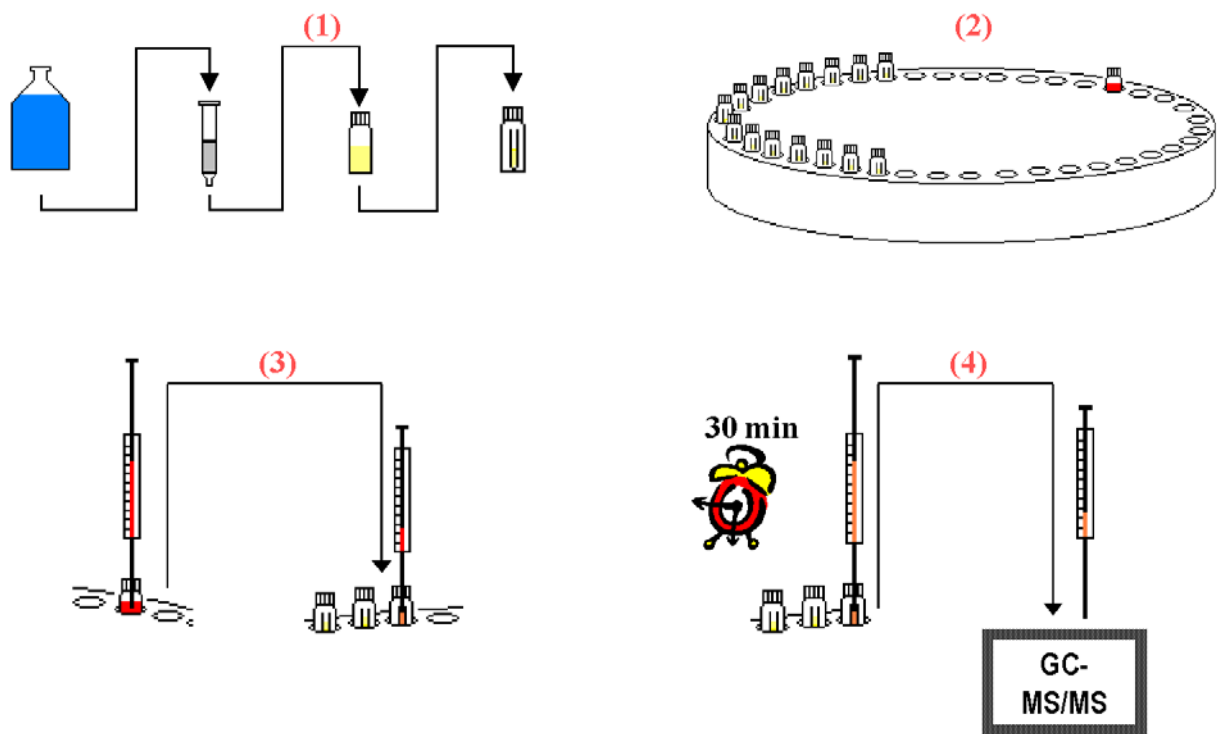


Abbildung 10: Ablauf der On-line-Derivatisierung

### 3.6 Detaillierte Arbeitsanweisung für die Festphasenextraktion

#### VORBEREITUNG:

*Kontaminationen durch Phthalate und Silikone ausschließen, ggf. reinigen: Flaschen - Reagenzien - Filter - Schlauch - Adapter - Kartusche - Trocknungsapparatur - Reagenzglas - Handpumpe - Spitzkolben - Vials – GC-Injektionssystem*

- Ggf. Filtration der Probe:  
 Glasfaserfilter sind nicht so empfindlich wie Membranfilter  
 Membranfilter für trübe Proben: 0,45 µm
- Ggf. Entgasung mit Ultraschallbad für Mineralwasser, Rohwasser mit CO<sub>2</sub>-Gehalt.
- pH-Einstellung 7,0 ± 0,2 mit NaOH 1n und H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2n, tropfenweise.
- Für die „dynamische Solvatisierung“ bei Xenooestrogenen bzw. Proben, wo dies gewünscht wird: 5% MeOH der Probe zugeben:  
 Bei Wiederfindungsversuchen: diese 50 ml MeOH auf 1 l Wasser als Lösungsvermittler zur Dotierung verwenden; Standard (in EtAc) darin vorverdünnen.
- Kartuschen wiegen, Gewicht aufschreiben. Entfällt für HPLC / bei Elution mit MeOH; falls Wasserspuren nicht relevant sind.

## KONDITIONIERUNG / VORSPÜLUNG:

*Alle Lösungsmittel: for organic residue analysis.*

*Einwirkzeit von 1 min beachten.*

*Kartuschen während der Konditionierung nicht trocken laufen lassen, sonst mit 3 ml MeOH spülen, dann wieder von vorne beginnen.*

- Hexan 3-4 ml (3-4faches Sorbens-Bettvolumen) langsam durchsaugen.
- Ethylacetat 3-4 ml ebenso.
- Methanol 15 ml ebenso, in mehreren Schritten. (5 x 3 ml)
- Quarz-bidest. Wasser 3-4 ml durchsaugen. Falls die Probelösung auf einen besonderen, von der Arbeitsvorschrift abweichenden pH eingestellt ist, auch dieses Spülwasser auf diesen pH einstellen.
- Kartusche wieder zur Hälfte mit Spülwasser füllen.

## ADSORPTION:

- Mittels leerer Kartuschen-Hülse die Wasserprobe bis in den Schlauch ansaugen, dann schnell den Adapter in die Kartusche einsetzen. Es darf keine Luft durchgesaugt werden.
- Langsam durchsaugen, Unterdruck: ca. -10 mm Hg entspr. -300 mbar. Die Extraktion dauert im Normalfall für 1 Liter Probe ca. 1 - 2 Stunden. Zwischendurch immer wieder den Unterdruck und den korrekten, dichten Sitz der Adapter prüfen.
- Nach beendeter Extraktion kann die Kartusche ruhig kurz trockenlaufen (max. 1 min).
- Nachspülen mit 3-4 ml Quarz-bidest. Wasser, besonders wichtig bei Extraktion mit saurem pH (Versuche zur Methodenerweiterung), da ansonsten bei der nachfolgenden Trocknung säurekatalysierte Zersetzung der Analyten auf der Kartusche erfolgen kann. Kurz Luft durchsaugen (10sec), zur Entfernung von Wasserresten.

## TROCKNUNG:

*(falls die Elution nicht mit MeOH erfolgt.)*

- Kartuschen fest, aber vorsichtig an Trocknungsapparatur stecken.
- N<sub>2</sub>-Strom mit Finger unter den Kartuschen prüfen.
- Trocknungstemperatur von 50-60°C einstellen.
- ca. 60 min (Wecker!), zwischendurch immer wieder prüfen, ob die Kartuschen nicht von den Stopfen abgesprungen sind.
- Kartuschen abnehmen, abkühlen lassen, wiegen. Das Endgewicht kann bei ict-Kombiphasen +/- 5 mg des Anfangsgewichtes betragen, bei Baker RP-18-Phasen -30 mg des Anfangsgewichtes. DVB / ENV / SDB-Phasen bekommt man u.U. nicht ganz trocken.

## ELUTION:

*a) ARF = 2000: Gestell mit graduierten Reagenzgläsern vorbereiten.*

*b) Falls Anreicherungsfaktor ARF = 10000 erreicht werden soll, Spitzkolben mit graduiertem 100 µl-Fortsatz in Gestell einhängen.*

- Kartuschen auf Reagenzgläser oder Spitzkolben setzen, ggf. mit starker Aluminiumfolie eine kleine Fixierung-Hülse formen.

- Hexan durchsaugen: 2 ml. Dann Ethylacetat in 2 Portionen durchsaugen: 1+1 ml. (Oder bei Applikationen, die eine Elution mit polareren LM erfordern: Methanol in drei Portionen durchsaugen: 2+1+1 ml.)
- Elutionsmittel-Reste mit Ballpumpe und Schliffadapter in die Reagenzgläser drücken.

## **EINENGEN:**

*a) ARF = 2000, graduierte Reagenzgläser:*

- N<sub>2</sub>-Ventil vorsichtig aufdrehen, ggf. leicht daran rütteln, um plötzliche Druckstöße zu vermeiden.
- Gefüllte Reagenzgläser mit Gestell in Trocknungsapparatur stellen.
- Temperatur auf 50-60°C einstellen, Gasstrom einstellen, so dass die Lösungsmitteloberfläche vom Gasstrom bewegt wird. Alle 10-15 Minuten Flüssigkeitsstand in den RG überprüfen.
- Auf ca. 0,4 ml einengen, fertige RG schon entnehmen, mit Ethylacetat auf 0,500 ml (bis zur Graduierung) auffüllen. Nur eigens graduierte RG verwenden. (Für bestimmte Derivatisierungen zur Methodenweiterentwicklung kann zur Trockne eingengt werden.)  
Mit Pasteurpipette in ein Vial füllen.

*b) Alternativ: ARF = 10.000, Spitzkolben:*

- Spitzkolben in Rotationsverdampfer einhängen, Vakuumpumpe einschalten, Wasserkühlung aufdrehen, Hähne in korrekte Position.
- Zunächst mit ca. 200 mbar abrotieren. Wenn der Lösungsmittelspiegel in den Fortsatz verschwindet, ca. 80 mbar. Ständig beaufsichtigen. Bis ca. 50 µl einengen.
- Auf genau 100 µl auffüllen, dazu eine Mikroliterspritze verwenden. Dabei eventuell an der Glaswand abgesetzte Reste wieder lösen. Mit Pasteurpipette in ein Vial mit 200 µl-Insert füllen.

## **3.7 Probenahme**

Bei der Probenahme muss auf Kontaminationsfreiheit, vor allem von Phthalaten und Alkylphenolen geachtet werden. Die Durchführung ist durch [HOLLERT 1999] für die Oberflächenwässer beschrieben. Es wurden neben einigen Trinkwasserproben eines großen Wasserversorgungsbetriebes in NRW verschieden stark mit Abwasser belastete Bäche und Flüsse in Baden-Württemberg untersucht, außerdem wurde ein Hochwasserereignis des Neckars im Oktober/November 1998 kontinuierlich beprobt. Hinzu kamen Sedimentproben der genannten Oberflächenwässer und des Hochwasserereignisses. Die Auswahl der Probestellen ist in Kap. 6 beschrieben.

## 4 Methodenentwicklung, Überprüfung und Diskussion

### 4.1 Festphasenextraktion und Wiederfindung

#### 4.1.1 Vergleich verschiedener Hersteller und selbstgepackte Kartuschen

Der Vergleich verschiedener Festphasen wurde mit der apparativen Ausrüstung lt. Kap. 3.3 durchgeführt. In Abweichung zu der in Kap. 4.2 beschriebenen Arbeitsweise wurde die nicht derivatisierte Stoffgruppe separat von der derivatisierten Stoffgruppe mit On-Column-Injektion gemessen. Die derivatisierten Substanzen wurden gemäß Kap. 4.1.6 methyliert oder butyliert, da zu diesem Zeitpunkt noch kein praktikables Silylierungsreagenz vorlag. Auch nicht alle Steroidhormone waren vorhanden, sodass zur Abschätzung der Wiederfindungen in dieser Substanzgruppe die Wiederfindung von Ethinylestradiol betrachtet wurde. Die Wiederfindung der PCB wurde wie die der anderen Steroidhormone zu einem späteren Zeitpunkt auf einem niedrigeren Level (10 ng/l) durchgeführt. Die Produktion von techn. Octylphenol (bestehend aus 2 Isomeren) wurde Mitte der 90er Jahre eingestellt [FREY 2000]. Somit war kein Standardmaterial im Handel, lediglich iso-Octylphenol, bestehend aus dem einen Isomer 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenol. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde vom Hygiene-Institut der Universität Bochum ein Standard von technischem Octylphenol zur Verfügung gestellt, bis dahin wurde ersatzweise iso-Octylphenol verwendet.

Da ein sehr großes Angebot an Festphaseextraktionskartuschen auf dem Markt angeboten wird und sich diese in punkto Eignung, Reinheit und Preis deutlich unterscheiden, musste eine Auswahl getroffen werden. Als angebracht erschienen C<sub>18</sub>-Reversed Phase- und die neuartigen Styrol/Divinylbenzol-Copolymer-Phasen (Handelsbezeichnung: SDB oder EN/ENV-Material), da die zu bestimmenden Substanzen unpolarer Natur sind.

Zunächst wurden die zur Routineanalytik von Pestiziden angewendeten, handelsüblichen Baker RP-18-endcapped Kartuschen getestet. Diese hatten einen entscheidenden Nachteil: Aus den Kartuschen gelangten große Mengen an technischem Nonylphenol und Phthalaten in die Extrakte und kontaminierten diese, wenn nur mit 3 ml Methanol vorgespült/konditioniert wurde (siehe Kap. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Auf der Suche nach Alternativen wurden in einem Screening-Test mehrere erhältliche Festphasenkartuschen nur mit reinem Lösungsmittel eluiert und auf die enthaltenen Verunreinigungen untersucht. Die mit den Produkten von Restek, Supelco und Macherey & Nagel erhaltenen Blindproben zeigten in den erhaltenen Chromatogrammen schon sehr hohe Basislinien und eine Menge von großen, breiten Peaks, sodass diese Handelsmarken nicht in Betracht gezogen wurden. Eine gesamte Marktübersicht kann an dieser Stelle allerdings nicht geboten werden, da von einigen Herstellern keine Festphasen vorlagen oder die Produkte nicht bekannt waren, z.B. von Varian. So blieben vier Festphasen übrig, die miteinander verglichen wurden:

- Baker RP-C18 endcapped, 1g Sorbens, 6 ml Polypropylen-Hülse, Polypropylen-Fritte
- Merck Lichrolut EN, 200 mg Sorbens, 3 ml Polypropylen-Hülse, Polypropylen-Fritte
- Baker RP-C18 Polar Plus, 1g Sorbens, 6 ml Polypropylen-Hülse, Polypropylen-Fritte
- ict Kombiphase: RP-C18 / ENV-plus, 500 mg und 200 mg, 3 ml Glas-Hülse, mit Teflon-Fritten

Es wurden 4 parallele Wiederfindungsversuche mit den aufgeführten Substanzen auf dem Konzentrationslevel von 100 ng/l durchgeführt, dotiert in Leitungswasser. Gleichzeitig lief je ein Reagenzienblindwert des Leitungswassers mit eingestelltem pH  $7,0 \pm 0,2$  dessen Ergebnisse subtrahiert wurden, sowie ein Kartuschen-Leerwert (Kartusche gemäß Arbeitsanweisung konditioniert und eluiert) mit. Die korrigierten Mittelwerte aus den jeweils 4 Messungen sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 unter „korr. MW“ angegeben; „VK“ ist der relative Variationskoeffizient in Prozenten.

**Tabelle 6: Vergleich der Wiederfindung von ausgewählten Xenoestrogenen auf SPE-Kartuschen verschiedener Hersteller mit verschiedenen Packungsmaterialien, Messung ohne Derivatisierung:**

Kartuschen	Baker RP18ec		Merck EN		Baker RP18P.P.		ict RP 18/ENV+	
	Korr. MW	rel. VK	korr. MW	rel. VK	korr. MW	rel. VK	korr. MW	rel. VK
1. p,p'-DDE	53	7	75	13	77	11	89	12
2. p,p'-DDT	69	9	54	8	82	11	72	6
3. o,p'-DDT	67	6	46	22	78	10	57	9
4. a-Endosulfan	13	41	90	17	95	11	101	7
5. b-Endosulfan	8	52	53	44	57	29	108	17
6. Lindan	66	35	16	58	94	9	32	19
7. Methoxychlor	75	9	85	7	96	4	104	9
8. Diethylhexylphthalat	60	22	73	25	202	8	98	14
9. Benzylbutylphthalat	88	7	87	4	100	13	107	12
10. Dibutylphthalat	72	22	77	37	133	14	95	85
11. Diethylphthalat	65	38	71	9	86	16	84	17

*alle Werte in % Wiederfindung von 100 ng/l*



**Tabelle 7: Vergleich der Wiederfindung von ausgewählten Xenoestrogenen auf SPE-Kartuschen verschiedener Hersteller mit verschiedenen Packungsmaterialien, Messung nach Derivatisierung mit TMSH oder TBSH:**

Kartuschen	Derivatisierung mit TMSH						Deriv. mit TBSH	
	Baker RP18ec		Merck EN		Baker RP18 P.P.		ict RP18/ENV	
Substanz	korr. MW	rel. VK	korr. MW	rel. VK	korr. MW	rel. VK	korr. MW	rel. VK
1. Ethinylestradiol	87	20	67	16	91	8	90	7
2. Diethylstilbestrol	60	11	50	15	46	9	2	117
3. Bisphenol A	93	1	82	8	85	19	7	31
4. techn. Nonylphenol	99	5	69	7	84	9	106	3
5. i-Octylphenol	83	1	77	7	80	6	110	4

*alle Werte in % Wiederfindung von 100 ng/l*

Die 4 getesteten handelsüblichen Kartuschen waren mit folgenden Einschränkungen zur Anreicherung der aufgeführten Substanzen geeignet:

- Diethylstilbestrol war nicht effektiv anzureichern oder wurde nicht quantitativ von den Kartuschen eluiert. DES zeigte mit 60% Wiederfindung den höchsten Wert bei Baker RP-C18ec; bei Merck Lichrolut EN, Baker RP-C18 Polar Plus und der ict Kombiphase RP-C18/ENV+ nur 2 bis 50% Wiederfindung.
- Lindan (16 und 32% WF) und z.T. die DDT-Derivate (um 50% WF) traten mit unzureichender Wiederfindung bei den Kartuschen mit SDB-Sorbentien: (Merck Lichrolut EN sowie ict-Kombiphase RP-C18/ENV+) auf; dies ist wahrscheinlich auf unzureichende Elution oder zu starke Retention auf diesem Phasenmaterial zurückzuführen.  
 $\alpha$ - und  $\beta$ -Endosulfan zeigten mit 13% und 8% geringe Wiederfindungen auf Baker RP-C18ec-Material.
- Bisphenol A wird wie Diethylstilbestrol auf der ict-Kombiphase kaum angereichert.
- Ethinylestradiol als Vertreter der Steroidhormone zeigte eine gute Wiederfindung um 90% auf allen Phasenmaterialien bis auf das Merck EN-Material, wo lediglich 67% WF erreicht wurden.

Durch die Subtraktion der Reagenzienblindwerte konnten die Wiederfindungen der Phthalate auf zumeist 70-100% korrigiert werden. Überhöhte Werte fanden sich dennoch bei DEHP und DBP im Baker RP-18 Polar Plus-Material. Der Fehler relativiert sich a) jedoch beim Arbeiten mit Oberflächenwasser, in welchem später höhere Konzentrationen gefunden wurden. Der Arbeitsbereich von 100 ng/l ist für Wiederfindungsversuche dieser Phthalate zu niedrig. Die Kalibrierstandards

wurden dem Vorkommen der Substanzen in Wasserproben entsprechend angepasst und für die Phthalate ein höherer Arbeitsbereich eingeführt. (siehe Kap. 4.1.2). Außerdem wurde hier b) in Abweichung zum unten beschriebenen, verbesserten Verfahren (Verwendung von selbstgepackten Kartuschen) noch mit handelsüblichen Polypropylenkartuschen und –Fritten gearbeitet. Bei Verwendung von Glaskartuschen und Teflonfritten wurden die Kontaminationen weiter verringert.

Die PCB besaßen eine schlechte Wiederfindung von wenigen Prozenten und sind deswegen nicht in der Tabelle aufgeführt. Sie verblieben auf dem Sorbensmaterial und wurden nicht von dem Elutionsmittel Ethylacetat, welches eine geringe Polarität besitzt, heruntergelöst. Die Elution, die in Abweichung zum unten beschriebenen Verfahren bis hierher mit 2 ml Ethylacetat durchgeführt worden war, wurde um einen Schritt mit 2 ml Hexan ergänzt (verbessertes Verfahren) und zeigte in der späteren Messreihe bessere Ergebnisse.

Insgesamt besaßen die Baker RP-C18 Polar Plus-Kartuschen mit generell 70-100% die höchsten Werte für die Wiederfindungen. Dieses Phasenmaterial wurde für die weitere Vorgehensweise ausgewählt. Dieses Material wurde in der Spurenanalytik zur Anreicherung verschiedener Stoffgruppen von [HEBERER 1994] bereits verwendet. Als Einschränkung gilt hier die schwache WF von 46% bei DES.

Eine ähnliche Eignung mit tendenziell etwas darunter liegenden Werten zeigten die Baker RP18ec-Kartuschen. Als Einschränkung ist die unzureichende WF von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Endosulfan und die knapp unter 70% liegende WF von Lindan und DES sowie von DEHP und DEP zu sehen.

Aufgrund der o.a. Gehalte von Phthalaten waren die Hülsen und Fritten der handelsüblichen Kartuschen mit Nachteilen behaftet. Durch Ausdehnung der bis hierher mit nur 3 ml Methanol durchgeführten Konditionierung zu einem Reinigungsschritt mit 15 ml Methanol konnte die Kontamination des Eluates auf ein akzeptables Maß heruntergesetzt werden. Durch die konsequente Mitführung eines Blindwertes (Konditionierung, Extraktion von undotiertem Leitungswasser, Elution) und eines Leerwertes (Kartuschen werden lediglich konditioniert und eluiert) in jeder Mess-Serie konnten die geringen restlichen Kontaminationen von technischem Nonylphenol (wenige ng/l) und Phthalaten (10-70 ng/l) subtrahiert werden.

Als weitere Punkte waren zu vermerken:

- Auf blindwertfreie Materialien (Glas, Stahl, Teflon) der Probeflaschen, Zuleitungsschläuche und Adapter ist zu achten.
- Handlingvorteil des SDB-Materials: Die Extraktion lief gleichmäßiger, schneller und leichter, bei einem geringeren Unterdruck zur Erzielung einer Flussrate von 10 ml/min. Der Grund war das grobkörnigere Packungsmaterial und das kleinere Sorbensbettvolumen.

- pH 7 hat sich in vorangegangenen Wiederfindungsversuchen in verschiedenen Matrices (Kläranlagenauslauf und bidestilliertes Wasser) als am günstigsten erwiesen (siehe Anhang, Kap. 7). Ein alkalischer pH kam nicht in Betracht, da eine Deprotonierung der phenolischen Hydroxigruppen zu erwarten war, bei pH 2 zeigten sich empirisch schlechtere Werte für die AP, für BPA, DES, BCPS und EED.

Für die Extraktion von endokrin wirksamen Substanzen in verschiedenen Wässern arbeiteten auch andere Autoren mit RP-18 Kartuschen [BRÜLL 2000; SPENGLER 1999, 2000; TERNES 1999; WEGENER 2000] meist bei pH 7, zum Teil bei pH 2 (bei Abwasser). Eine Kombi-Phase mit 10 mg Lichrolut EN und 250 mg RP-18 Material wurde von [STUMPF 1996] verwendet; er erreichte für Steroidhormone Wiederfindungen von 76-97 % bei einem ARF von 10.000 bei dotiertem Tiefstollenwasser. Ebenfalls Steroidhormone wurden an einer normalen RP-18-Phase von [SCHLETT 1996] mit Wiederfindungen von 64 bis 152 % angereichert.

#### ***4.1.2 Wiederfindung, verbessertes Verfahren***

Mit dem vorangehend beschriebenen Verfahren wurden unter Einführung mehrerer Modifikationen Wiederfindungen aus Trinkwasser ermittelt.

Die Konditionierung stellte außer der in Kap. 3 erläuterten Vorbereitung der Festphase einen wichtigen Reinigungsschritt dar. Die Verunreinigungen an Phthalaten und techn. Nonylphenol wurden mit einer vergleichsweise hohen Menge an Lösungsmittel ausgewaschen.

In Vorversuchen ergab sich eine zu hohe Restmenge an Verunreinigungen, wenn nur mit 3 oder 5 ml MeOH vorgespült wurde. Bereits vorhandene Extrakte aus der Pestizid-Routineanalytik wurden auf Xenoestrogene untersucht und außer hohen Blindwerten von NP, DEHP, BBP (und in geringerem Maße DEP) keiner der gesuchten Analyten gefunden. Die Baker RP-18ec-Kartuschen wurden zerlegt und deren Bauteile mit Ethylacetat einzeln eluiert: techn. Nonylphenol wurde aus dem Phasenmaterial ausgewaschen, jedoch nicht aus Hülse und Fritte (beide Polypropylen). In weiteren Versuchen zeigte sich jedoch, dass diese beiden Bauteile die Quelle für Kontaminationen an Phthalaten waren. Als erste Maßnahme wurde die Konditionierung der Kartuschen um einen Spülschritt mit 15 ml Methanol ergänzt, um einen Großteil der Kontamination zu entfernen. Mit 30 ml MeOH waren nur noch sehr kleine Verunreinigungs-Peaks in den entsprechend aufgenommenen Chromatogrammen zu sehen, 15 ml Methanol haben sich als guter Kompromiss zwischen Reinheitsanforderung und Lösungsmittelverbrauch an hochreinen Methanol herausgestellt. Das im verbesserten

Extraktionsverfahren verwendete Phasenmaterial Baker RP-18 Polar Plus zeigte (in geringem Maße) ebenfalls Kontaminationen an techn. NP, so wurde der 15 ml-Spülschritt beibehalten.

Als weitere Verbesserungen wurden die Verwendung von von Glaskartuschen, Teflon-Fritten, -Schläuchen und -Adaptern eingeführt.

Die Messungen wurden auf dem Saturn 2000 GC/MS durchgeführt. Dies brachte mit einem neu aufgebauten Liner eine weitere Veränderung hinzu: Anstatt auf silanisierte Glaswolle in einem dünnem Liner (altes Meßsystem) wurden die Messlösungen in einen breiteren Liner mit Glasfritte (aktive Silanol-Gruppen vorhanden) eingespritzt.

Weiterhin wurde der zur Aufstockung verwendete Standard im Vergleich zu den Kartuschenvergleichs-Versuchen (Kap. 4.1.1) um einige Substanzen (mehrere Steroidhormone) in der derivatisierten Stoffgruppe erweitert und drei verschiedenen hohe Konzentrationslevels entsprechend der jeweiligen erwarteten Konzentration der betreffenden Analyten in den Wasserproben eingeführt.

Es wurden für die wichtigsten Analyten meist zufriedenstellende Werte von 70-90% WF erreicht (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9).

**Tabelle 8: Wiederfindungen (nicht derivatisierte Substanzen) auf 2 Levels: Phthalate 500 ng/l, restliche Substanzen 10 ng/l, n=4**

Substanz	Korr.	rel.
	MW	VK%
Atrazin	72	12
a-Endosulfan	72	14
b-Endosulfan	90	12
Lindan	81	16
pp-DDE	64	14
Bischlorphenylsulfon	78	16
DEP	59	3
DBP	70	7
BBP	89	11
DEHP	82	24
PCB	44-66	11-22

Die WF der PCB sind zwar recht gut reproduzierbar, jedoch nicht hoch genug. Als Ursache könnte eine nicht quantitative Desorption, auch mit dem zweiten Elutionsschritt mit Hexan gelten. Eine Erhöhung des Lösungsmittelvolumens brachte keinen Erfolg. Es ist aber auch einzusehen, dass eine Multimethode nicht für alle Substanzen das Optimum erbringen kann, sondern einen Kompromiss

darstellt. Zum Vergleich: In der Routineanalytik von PCB in Wasser wird die flüssig/flüssig-Extraktion mit Hexan angewendet [WCG/DIN 2000].

Die im Vergleich zu den vorherigen WF-Versuchen niedrigere Wert für DEP ist zunächst nicht zu erklären, da das Konzentrationslevel in diesem zweiten Versuch um den Faktor 5 höher war und bessere Werte zu erwarten waren. Eine bekannte Fehlerquelle stellt allerdings der lediglich von Hand grob einstellbare Vordruck für das Trockenblasen der Kartuschen bei 60°C dar: ein zu hoch eingestellter Druck führt zu einem höheren Gasfluss durch das trocknende Packungsmaterial; sobald das Wasser abgetrocknet ist, kann es zur Verflüchtigung der extrahierten Substanzen kommen. Mit einem Siedepunkt von 298°C ist DEP mäßig flüchtig [RÖMPP 1995], doch die Wasserlöslichkeit von ca. 1 g/l [HEBERER 1994] begründet ebenfalls die im Vergleich zu den anderen Phthalaten schlechtere WF.

Methoxychlor und DDT konnten wegen Zersetzungsreaktionen im Injektor des neuen Saturn 2000 GC/MS-Systems nicht mehr bestimmt werden. Als Ursache wird eine andere Oberflächenbeschaffenheit im Injektor gesehen (s.o.).

**Tabelle 9: Wiederfindungen (derivatisierte Substanzen) auf 2 Levels: Alkylphenole und Bisphenol A 50 ng/l, restliche Substanzen 10 ng/l, n=4**

Substanz	Korr.	rel.
	MW	VK%
techn. Octylphenol	71	17
techn. Nonylphenol	70	19
Bisphenol A	73	17
Hexestrol	68	18
Diethylstilbestrol	14	x
Androsteron	65	12
Estron	71	15
Estradiol	76	16
Mestranol	75	16
Ethinylestradiol	70	27

Estriol wurde zusätzlich ebenfalls in den überarbeiteten Standard hineingenommen, zeigte jedoch gar keine Wiederfindung aufgrund zu starker Polarität durch die 3 Hydroxigruppen und konnte nicht bestimmt werden. Die Wiederfindung von Diethylstilbestrol war aufgrund des herabgesetzten Konzentrationslevels geringer als in den Wiederfindungsreihen mit verschiedenen Kartuschen (siehe Kap. 4.1.1) und DES kann deswegen nicht quantifiziert werden. Ein Fund von DES kann somit nur qualitativ bewertet werden. Androsteron lag mit 65% WF leicht unter dem gängigen Akzeptanzwert (70% WF), dies wurde aufgrund des geringen Variationskoeffizienten toleriert. Estradiol bereitete gelegentlich Probleme bei der Integration durch zweigipflige Peaks und Peaks mit schlechter Form. Ursache war das gemeinsame MS-Segment (siehe Kap. 4.5.3) mit dem ISTD 2-Fluorestradiol mit fast

identischer Retentionszeit. Dies bedingte ein dauerndes Wechselschalten zwischen den zu fragmentierenden Massen, was theoretisch angeblich gut funktionieren soll, in der Praxis doch nicht immer befriedigend gelöst war.

Es sei angemerkt, dass bei der Integration von Nonylphenol erhebliche Probleme auftreten, sofern man die Auswertung komplett zu automatisieren versuchte. Techn. Nonylphenol erschien als Peakgebirge mit 5 Haupt-Peaks bei der ausgewählten Quantifizierungsmasse  $m/z$  179 (MS/MS). Dieses bereitete insofern Probleme, als dass die Software bei automatischer Integration kaum den richtigen Anfangs- und Endpunkt zur Flächenberechnung setzte, wenn man als Vorgabe ein Zeitfenster für alle aufzuaddierenden Peaks vorgab. Die zweite Möglichkeit (alle Peaks einzeln zu integrieren und dann erst die Flächen- oder Analysenwerte zu addieren) war genauso fehlerbehaftet. Da alle Peaks der Nonylphenol-Isomeren sehr ähnliche Spektren besitzen und nah beieinander lagen, wurden meistens die zwei größten von ihnen von der Software fälschlicherweise den kleineren zugeordnet und somit mehrfach berechnet, oder andere Verwechslungen traten auf. Die dritte Möglichkeit wurde als die fehlerärmste ausgewählt, auch wenn sie zur Quantifizierung der Realproben nicht komplett zufrieden stellte: Nur ein Peak aus dem Peak-Gebirge wurde (als Stellvertreter) zur Quantifizierung ausgesucht, dies war auf der Massenspur 179 Peak Nr. 5, der etwas später als die 4 anderen Peaks im Chromatogramm erschien und deswegen nicht falsch zugeordnet wurde (siehe Anhang).

Die allgemein beste, jedoch auch arbeitsintensivste Quantifizierungsmethode war die manuelle Integration. Keine intelligente Software mit beliebig vielen Integrations- und Peakerkennungs-Parametern kann die Interpretation des Analytikers ersetzen. Leider wurde diese Option erst im letzten Update der Saturn Workstation-Software 5.40 im Februar 2000 ermöglicht. Die in Tabelle 3 und 4 angeführten Ergebnisse wurden mit der alten Software Saturn 1.3 und manueller Integration (DOS-Software mit gut funktionierender Arbeitsoberfläche) erhalten, die in Tabelle 5 und 6 mit der Software Saturn Workstation 5.21 (Windows-basierende Arbeitsoberfläche, nicht ausgereift).

### ***4.1.3 Trocknung der Kartuschen***

Eine ungenügende Trocknung der Kartuschen und Wasserspuren im Extrakt wirkten sich äußerst ungünstig auf die Derivatisierung aus. Insbesondere das in Vergleichsversuchen (Kap. 4.2.6) verwendete Sylon BTZ war sehr empfindlich gegen Wasserspuren. Das standardmäßig zur Analytik verwendete Reagenz, bestehend aus MSTFA und den in Kap. 4.2.5.1 erläuterten Katalysatoren verlor seine Reaktivität bei 2% an Wasser im Extrakt, was durch Zusatzversuche ermittelt wurde. Diese 2 % Wasser in einem Extraktvolumen von 500  $\mu$ l wiegen 10 mg, was im Schwankungsbereich der Auswaage der Kartuschen lag. Vor der Extraktion und nach der Trocknung wurden die Kartuschen gewogen; erfahrungsgemäß verloren sie 30 bis 60 mg an Gewicht, was durch Auswaschen von Kleinstpartikeln aus dem Sorbensmaterial resultierte. Dies bedeutet, diese 10 mg Restwasser in den

Kartuschen würden bei der Auswaage gar nicht auffallen, aufgrund einer geringen Löslichkeit von Wasser in Ethylacetat in den Extrakt gelangen und die Derivatisierung verhindern. Somit wurde auf empirische Werte zurückgegriffen. Eine Trocknungszeit von einer Stunde war wiederum ein Kompromiss, denn eine übergründliche Trocknung von 1,5 oder 2 Stunden resultierte in einem Verlust an Octyl- und Nonylphenol sowie Diethylphthalat, die bei der verwendeten Trocknungstemperatur von 60°C im Stickstoffstrom bereits eine gewisse Flüchtigkeit zeigten. Schon bei einer Stunde Trocknungszeit war der Verlust an dem niederen Homologen Pentyphenol so hoch, dass diese Substanz aufgrund zu hoher Flüchtigkeit aus dem Repertoire der analysierbaren Stoffe gestrichen werden musste. (Zusätzlich entstanden bei dieser Substanz während der MS/MS-Fragmentierung ungünstig kleine Fragmente im Tochtterspektrum und der Response war sehr gering)

Das in den Vergleichsversuchen verwendete Sorbensmaterial Merck Lichrolut EN ließ sich nicht komplett trocknen, es gingen auch keine Feinstpartikel verloren, sodass die Kartuschen regelmäßig eine Gewichtszunahme von ca. 30-60 mg zeigten. Die Wasserreste verbleiben nach Angabe des Herstellers aufgrund der speziellen Struktur des Materials in kleinsten Poren und Kanälen und gelangen nicht in den Extrakt [JUNKER-BUCHHEIT 1996]. Bei On-Column-Messungen der erhaltenen Extrakte und bei mit TMSH derivatisierten Messungen waren keine ersichtlichen Störungen durch Wasser zu erkennen.

## 4.2 Injektion / Derivatisierung / On-Line-Silylierung

### Die derivatisierte Stoffgruppe (siehe Tabelle 2)

Die zu bestimmenden Substanzen ließen sich ohne Derivatisierung gar nicht (Steroidhormone, DES, Hexestrol, Bisphenol A) oder nur sehr schlecht (Alkylphenole) mittels GC messen.

Es wurden Messungen On-Column und im PTV mit verschiedenen Temperaturprogrammen durchgeführt, lediglich mit dem Ergebnis, dass sich besonders EED zersetzte und die Alkylphenole mit beiden Injektionsmethoden messbar sind (allerdings mit starkem Tailing). Die Quantifizierungen der Alkylphenole lagen auch auf ungünstigen und niedrigen Massen ( $m/z$  107, 121, 135, hoher Untergrund, mangelnde Spezifität). Dabei verschwammen die Peaks der einzelnen Nonylphenol-Isomeren ineinander und konnten kaum integriert werden. Die Chromatographie musste verbessert werden.

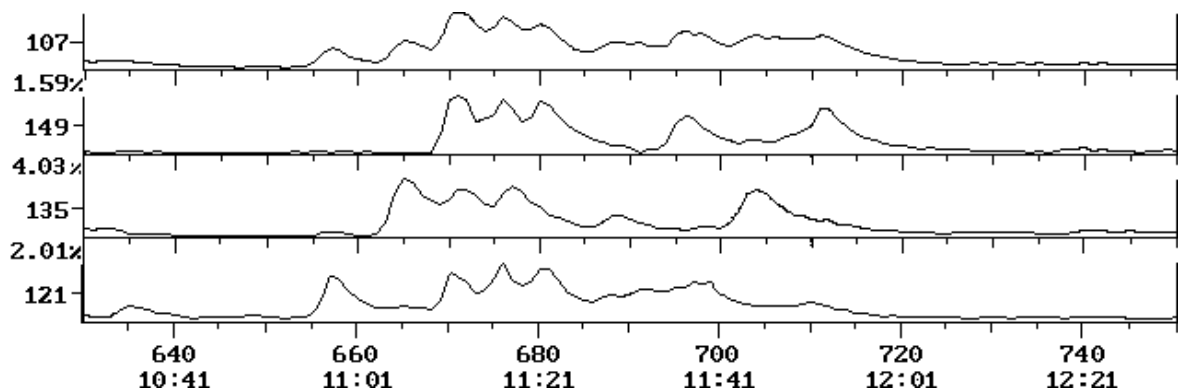


Abbildung 11: schlecht getrennte Peaks der Nonylphenol-Isomeren mit Tailing bei nicht derivatisierter Messung

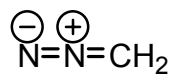
Dies änderte sich grundlegend durch die angewendeten Derivatisierungsmethoden (Methylierung, Butylierung, Trimethylsilylierung). Einen Überblick über eine Vielzahl von Derivatisierungsmethoden bieten [KNAPP 1979; BLAU UND KING 1981]. Es entstanden flüchtige, messbare Derivate der Steroidhormone und der anderen Substanzen. Die Derivate der Isomeren von Nonylphenol wurden besser getrennt und lagen auf günstigeren Massen (siehe Kap. 7.3).



### 4.2.1 Alkylierungsversuche

Da zur Alkylierung mehrere leicht zu handhabende Reagenzien vorlagen, wurde auf diese naheliegende Derivatisierungsmöglichkeit als erstes zurückgegriffen.

#### 4.2.1.1 Diazomethan



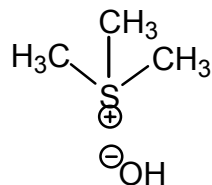
**Abbildung 12:**  
**Diazomethan**

Den Nachteilen der Cancerogenität und Explosivität dieses Reagenzes stehen die einfache und schonende Handhabung (Zugabe in das Vial, 1h stehen lassen, abblasen, fertig zur Injektion) und die sauberen Chromatogramme der erhaltenen derivatisierten Lösungen gegenüber. Eine Zersetzung der erhaltenen Derivate ist unwahrscheinlich, da keine Basen oder Säuren zur Katalyse der Reaktion notwendig sind. Diazomethan verursacht so gut wie kein „chemisches Rauschen“ durch Verunreinigungen des Reagenzes oder dessen Zersetzungsprodukte und der Überschuss an Reagenz lässt sich leicht aus der Probe abblasen [NIEDAN 1998].

An Ethinylestradiol, techn. Nonylphenol und Diethylstilbestrol wurde selbst hergestelltes Diazomethan getestet, ohne nennenswerten Erfolg. Die verwendete etherische Diazomethan-Lösung war deutlich gelb gefärbt, d.h. eine ausreichende Konzentration von Diazomethan in Diethylether war augenscheinlich vorhanden. Zusätzlich wurde diese Lösung mit 0,1 N NaOH gegen Phenolphthalein titriert und eine Konzentration von 0,032 mol/l an Diazomethan berechnet.

Da das verwendete Lösungsmittel einen Einfluss auf die Reaktion haben kann, wurden die Derivatisierungsversuche mit Ethylacetat, Methanol und Acetonitril angesetzt, es ergab sich kein Unterschied. Als Fazit wurde festgehalten, dass Diazomethan für diese Substanzen keine genügende Reaktivität besitzt bzw. die zu ersetzenden Protonen der Analyten nicht acide genug sind.

#### 4.2.1.2 TMSH, Trimethylsulfoniumhydroxid



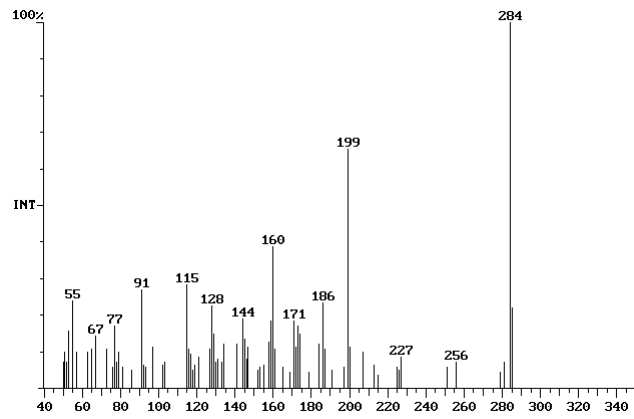
**Abbildung  
13: TMSH**

Der zweite Ansatz zur Analytik der Substanzen aus der zu derivatisierenden Stoffgruppe war mittels Methylierung mit dem Reagenz TMSH. Dieses Reagenz besitzt eine höhere Reaktivität als Diazomethan und hat überzeugende Handling-Vorteile, jedoch auch Nachteile, die seine spätere Verwendung ausschlossen.

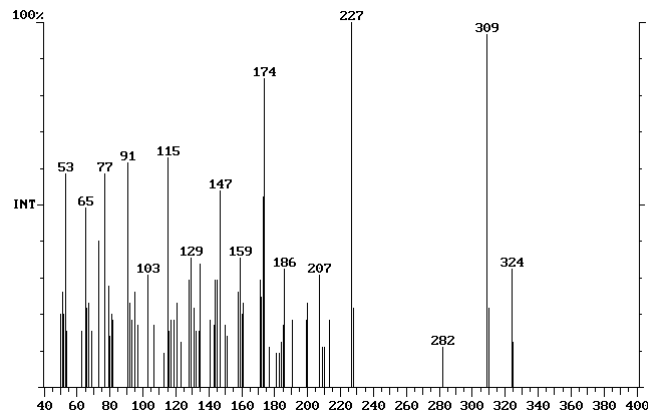
Als Vorteil ist zunächst die einfache Handhabung zu nennen. Das Reagenz wird beispielsweise im Mischungsverhältnis 100+5 (Probe+TMSH-Lösung in MeOH, 0,2%ig) zum Probenextrakt gegeben. Bei den meisten Bestimmungen wird keine Erhitzung, keine Reaktionszeit benötigt. Die Methylierung erfolgt (nach dem Schema aus Kap.2.2) pyrolytisch im Injektor bei erhöhter Temperatur [FÄRBER 1993; NIEDAN 1998]. Das Reagenz ist unempfindlich gegen Wasserspuren, haltbar und ungefährlich.

Nachteilhaft im Vergleich zu Silylierungsreagenzien ist der geringe Massenshift von nur 14 u pro ersetztes Proton zu nennen. Das entscheidende Hindernis für die Verwendung in der aufgeführten Substanzpalette ist jedoch die unkontrollierbare Nebenreaktion mit Ethinylestradiol, sodass immer mehrere Reaktionsprodukte entstanden. Als Hauptprodukt entstand immer das unerwünschte 3-O-Methylestron unter Verlust der Ethinylgruppe. Dieses würde das Vorhandensein von Estron in den Proben vortäuschen. Daneben wurde mit geringerer Ausbeute das gefragte Produkt 3,17-Dimethylethinylestradiol erhalten, dazu traten in geringerem Umfang weitere Reaktionsprodukte ungeklärter Struktur auf.

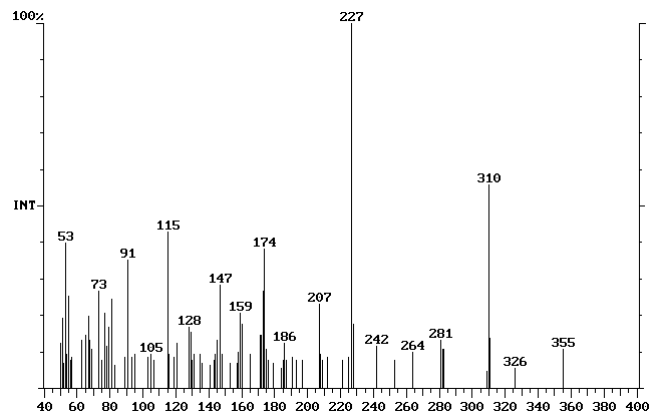
Für eine Analytik der Alkylphenole, Bisphenol A Diethylstilbestrol und Hexestrol (ohne Steroidhormone) wäre TMSH das geeignete Reagenz der Wahl gewesen.



**Abbildung 15: Reaktionsprodukt 1 von EED mit TMSH: 3-Methylestron**

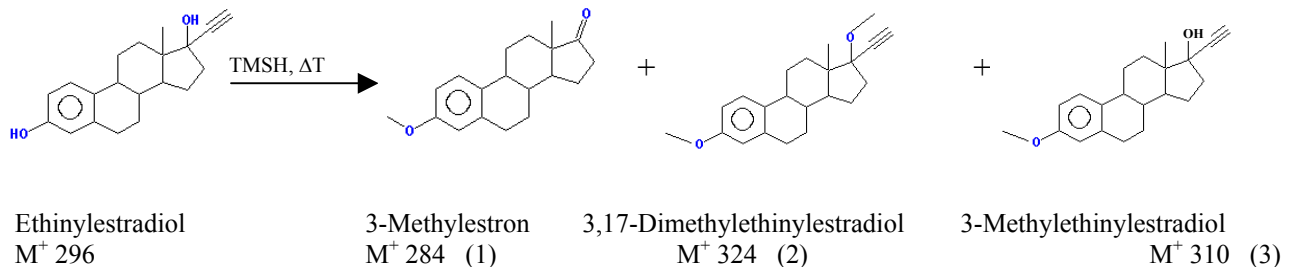


**Abbildung 16: Reaktionsprodukt 2 von EED mit TMSH: 3,17-Dimethylethinylestradiol**

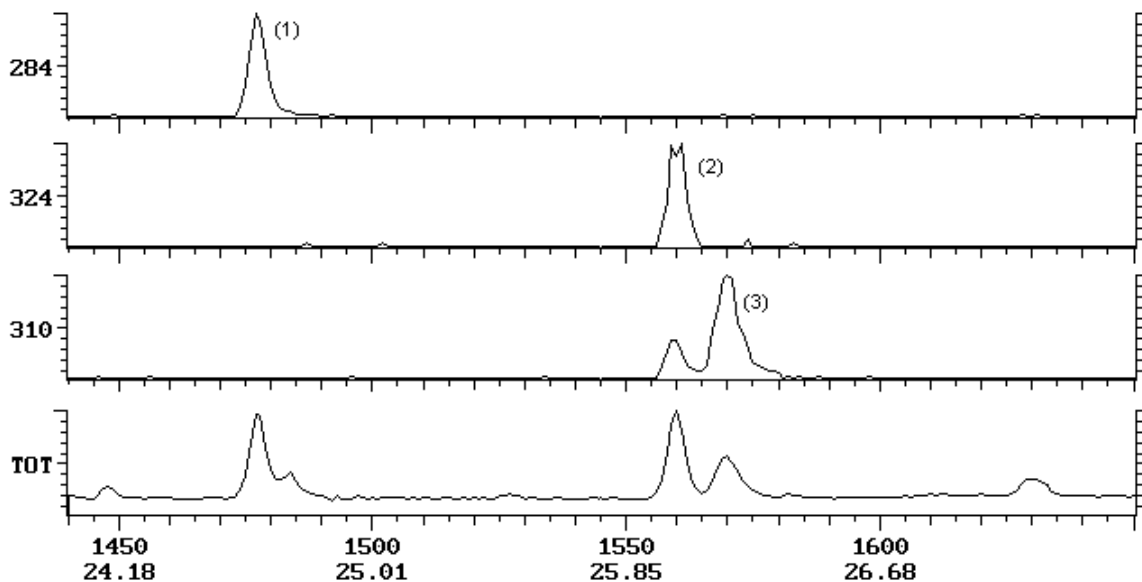


**Abbildung 14: Reaktionsprodukt 3 von EED mit TMSH: 3-Methylethinylestradiol**

Diese Reaktion konnte weder durch veränderte Temperatursteuerung des Injektors noch durch veränderte Konzentrationsverhältnisse beeinflusst werden, Katalysatoren waren nicht bekannt.



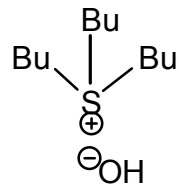
**Abbildung 17: Schlechte Methylierung von Ethinylestradiol zu drei Reaktionsprodukten**



**Abbildung 18: Chromatogramm-Ausschnitt eines derivatisierten EED-Standards mit Totalionenstrom und den charakteristischen Massen der 3 Reaktionsprodukte mit TMSH**

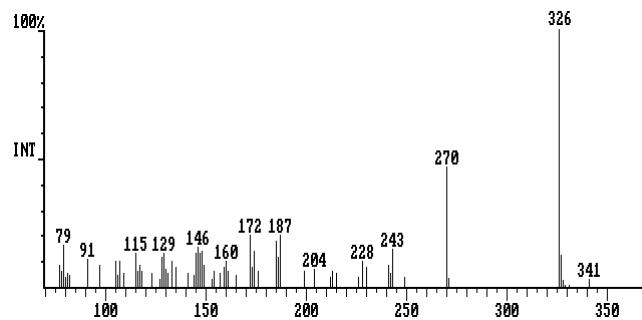
Für die Wiederfindungen (Kap. 4.1.1) konnte dieses Reagenz verwendet werden, da derzeit noch kein Estron bestimmt wurde und die Auswertung über 3-O-Methylestron quantifiziert werden konnte. Ein matrixeffekt wie bei TBSH (s.u.) wurde nicht beobachtet. Für die Messung von Proben wurde nach anderen Reagenzien mit einem eindeutigen Reaktionsprodukt gesucht. Einige Versuche mit TMAH (Trimethylaniliniumhydroxid) als Methylierungsreagenz schlugen fehl, da die Reaktivität von TMAH geringer als die von TMSH war. Der Anteil an erwünschtem Reaktionsprodukt 3,17-Dimethylethinylestradiol war noch geringer als durch Derivatisierung mit TMSH.

#### 4.2.1.3 TBSH, Tributylsulfoniumhydroxid

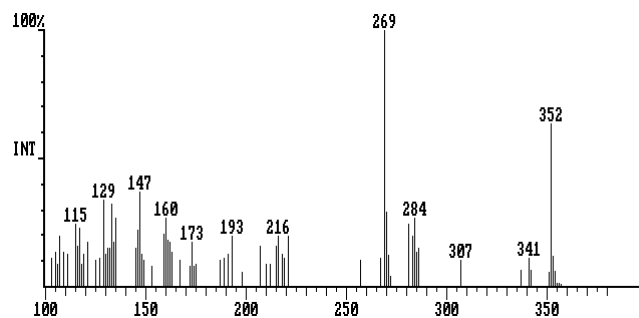


**Abbildung 19:**  
TBSH

Ähnliche Effekte ergaben sich mit TBSH, dem Butylanalogen zu TMSH. Handling, Vor- und Nachteile waren ähnlich wie bei TMSH, nur der Massenshift war bedeutend günstiger mit 56 u pro ausgetauschtes Proton. Das Reaktionsschema verläuft analog wie bei TMSH. Es wurden zwei Reaktionsprodukte erhalten.

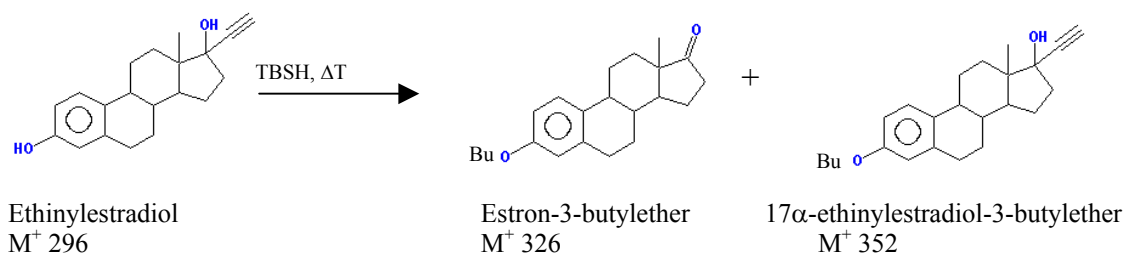


**Abbildung 20: Reaktionsprodukt 1 von EED mit TBSH: Estron-3-butylether**



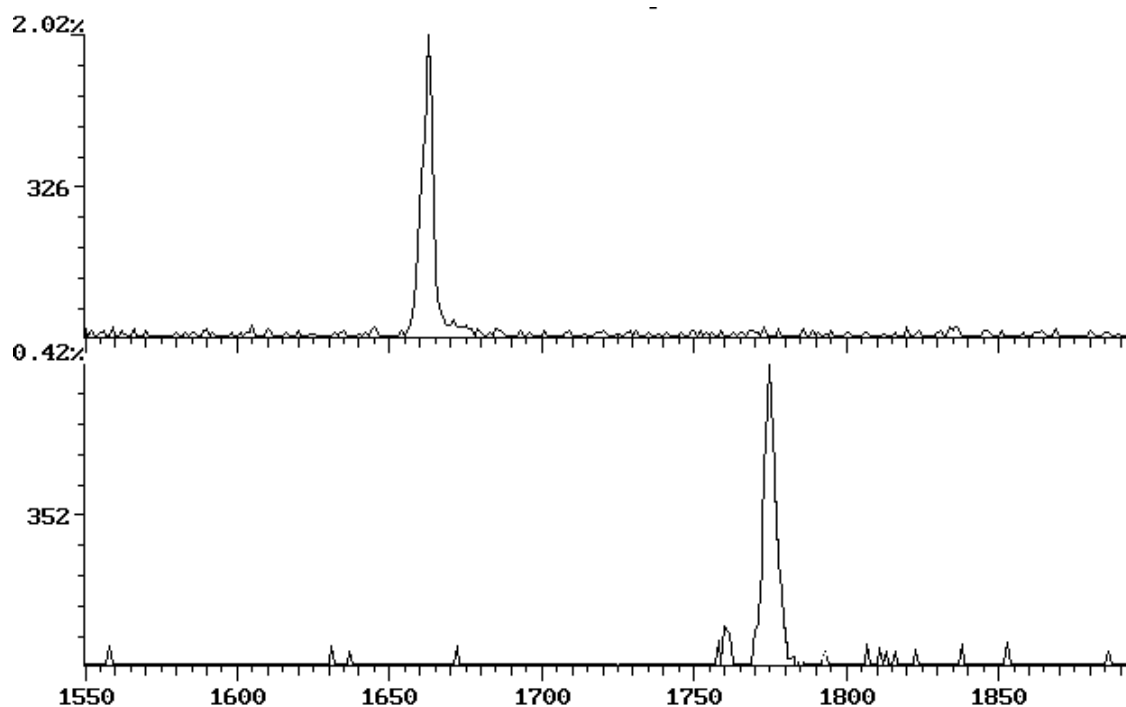
**Abbildung 21: Reaktionsprodukt 2 von EED mit TBSH: Ethinylestradiol-3-butylether**

Im Unterschied zum TMSH wird mit TBSH die OH-Gruppe in Position 17 nicht alkyliert. Offensichtlich ist sie gegen den Angriff des Reagenzes, bzw. die Ausbildung des Ionischen Zwischenproduktes durch die Nachbarschaft der Ethinyl- sowie der Methylgruppe (Position 17 und 13) sterisch gehindert. Das angreifende Reagenz TBSH ist im Vergleich zu TMSH sperriger und beansprucht mehr Raum.



**Abbildung 22 : Schlechte Butylierung von Ethynylestradiol zu zwei Reaktionsprodukten**

Die Intensität der erhaltenen Peaks war sehr schwach, was auf eine niedrige Reaktionsausbeute hinwies. Zudem war die Intensität und die Peakfläche des erwünschten Ions m/z 352 (17 $\alpha$ -ethynylestradiol-3-butylether) erheblich geringer gegenüber der des Ions m/z 326 (Estron-3-butylether) welches als unerwünschtes Nebenprodukt unter Eliminierung der Ethinylgruppe entstand.



**Abbildung 23: Chromatogramm-Ausschnitt mit den charakteristischen Massenspuren der 2 Reaktionsprodukte mit TBSH**

Auffällig war allerdings der Einfluss von Matrix auf die Derivatisierung: Die Reaktion wurde in Richtung des erwünschten Produktes 17 $\alpha$ -ethinylestradiol-3-butylether verschoben. Dass Matrixkomponenten dafür verantwortlich sind, wurde durch Zusatzversuche von konzentrierten Blindwert-Extrakten (matrixhaltig) zu Standardlösungen bewiesen. Hierzu wurden 10 l Leitungswasser mit Festphasen extrahiert und das Eluat auf 100  $\mu$ l eingengt. Von diesem Konzentrat wurden ansteigende Mengen zu 100  $\mu$ l Standards zugesetzt, die mit TBSH derivatisiert wurden.

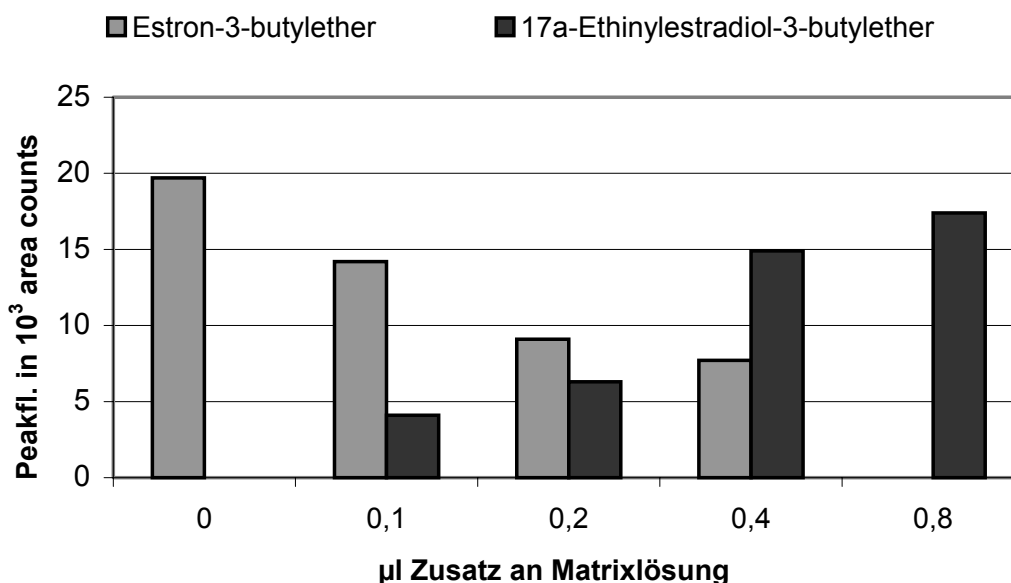


Abbildung 24: Matrixeffekt auf die Derivatisierung von Ethinylestradiol mit TBSH

Eine höhere Menge an Matrix bewirkte eine höhere Ausbeute an 17 $\alpha$ -ethinylestradiol-3-butylether und eine geringere Ausbeute an Estron-3-butylether. Es wurde vermutet, dass a) Huminsäuren als Matrixbestandteile oder b) Wasserspuren die TBSH-Derivatisierung in einer Art beeinflussen, dass die Ethinylgruppe nicht eliminiert wurde. Standards wurden Wasserspuren und Huminsäurelösungen verschiedenen Ursprungs in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt, jedoch der Matrixeffekt wie durch den konzentrierten Blindwert-Extrakt konnte nicht erzielt werden. Die Reaktion konnte nicht in die gewünschte Richtung verschoben werden. Die Reaktion mit den Alkylphenolen verlief allerdings in jedem Falle quantitativ.

Da durch diesen Matrixeffekt für die TBSH-Derivatisierung eine Kalibrierung über saubere Standards unmöglich erschien und durch verschiedene Matrixgehalte in den Proben unterschiedliche Verhältnisse an Reaktionsprodukten erzeugt würden, musste eine andere Derivatisierungsmethode gefunden werden

## 4.2.2 Acylierungsversuche

## 4.2.3 Weitere Derivatisierungsversuche

### 4.2.3.1 HFBSA, Heptafluorbuttersäureanhydrid

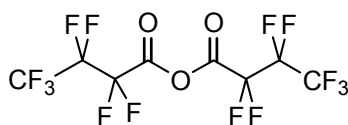


Abbildung 25: Strukturformel HFBSA

HFBSA ist ein Acylierungsreagenz, welches vornehmlich OH-Gruppen mit einem Heptafluorbuttersäurerest verestert. Es hat den weitaus größten Massenshift der getesteten Reagenzien: die Molmasse erhöht sich um 196 u pro ersetztetes Proton.

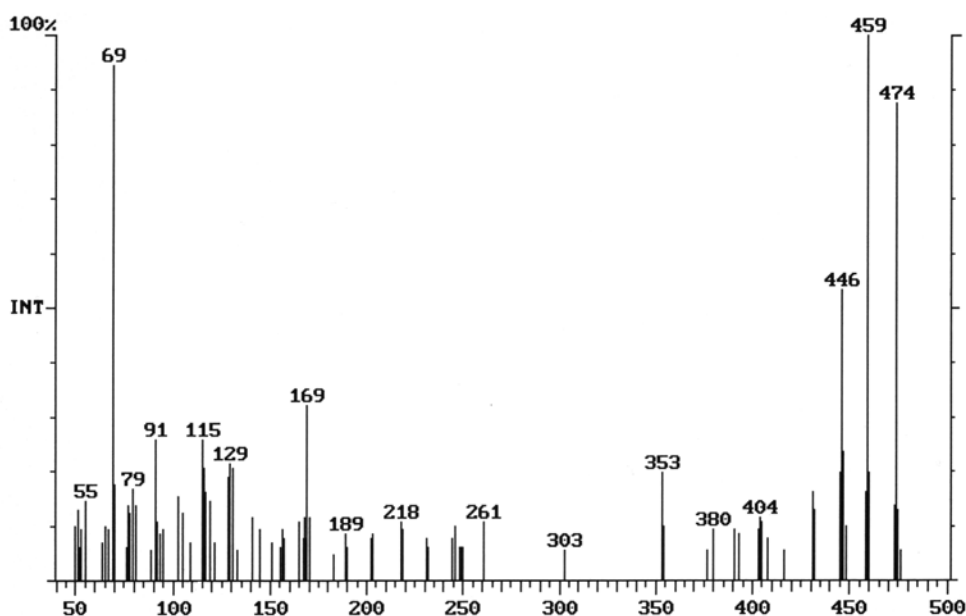


Abbildung 26: Massenspektrum des Reaktionsprodukts von EED mit HFBSA



Die Derivatisierungsversuche wurden nach klassischer Manier off-Line mit Erhitzen im Vial, Abkühlen, Abblasen und Wiederaufnahme in Lösungsmittel durchgeführt. Für Ethinylestradiol wurde das von [SIEKMANN 1980] beschriebene Produkt auch mit gutem Response gefunden; allerdings waren die fertig derivatisierten Lösungen extrem instabil. Schon am nächsten Tag konnte kein Peak des Produktes mehr gefunden werden.

Für Diethylstilbestrol, welches bei gleicher Vorgehensweise den gleichen Derivatisierungserfolg zeigen sollte, wurde das entsprechende Reaktionsprodukt nicht gefunden, für Nonylphenol ebenfalls nicht. Deswegen konnte auch diese Derivatisierung für die angezielte Multimethode nicht verwendet werden.

#### 4.2.3.2 PFBB, Pentafluorobenzylbromid

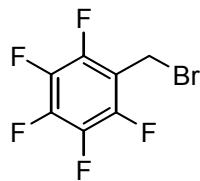


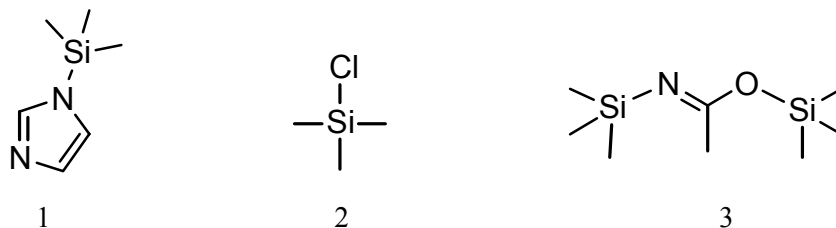
Abbildung 27: Strukturformel PFBB

Dieses in Publikationen gewürdigte und z.B. für Clofibrinsäure angewendete Reagenz mit einem ebenfalls hohen Massenshift von 181 u wurde gemäß der Vorschrift von [HEBERER 1996] angewendet. Auf Sauberkeit, ausschließliche Verwendung von Glaspipetten zum Dosieren und ausreichende Reaktionszeit wurde genauestens geachtet (Voraussetzung für diese Derivatisierungsmethode). Doch in mehreren Versuchen zeigte sich weder bei EED, DES noch OP eine gelungene Derivatisierung. Lediglich bei OP war ein sehr kleiner Peak mit der erwarteten Masse des Reaktionsproduktes im Chromatogramm zu finden. Auch diese Derivatisierungsmethode war nicht verwendbar.

#### 4.2.4 Silylierungsversuche

Auf der Suche nach Alternativen wurde ein weiteres Reagenz getestet.

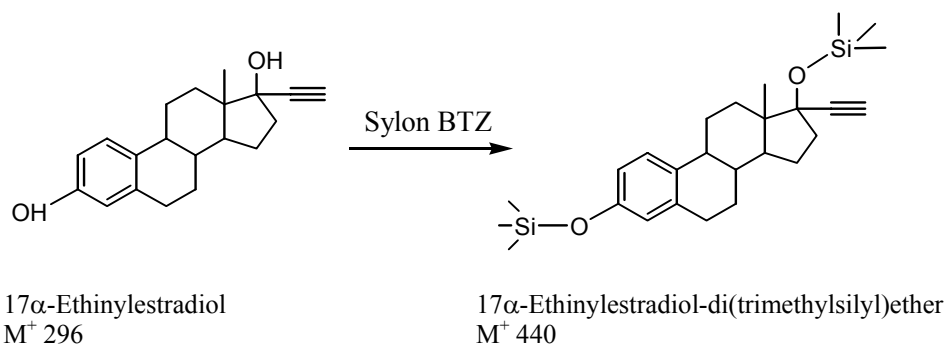
##### Sylon BTZ



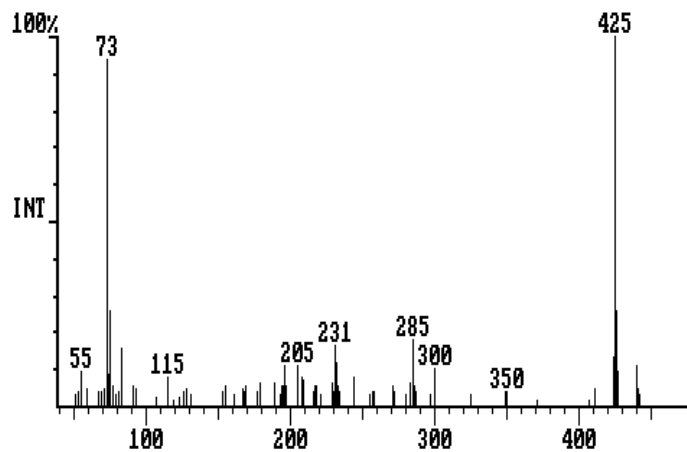
**Abbildung 28: Strukturformeln der in Sylon BTZ enthaltenen Substanzen TMSIM (1), TMCS (2), BSA (3)**

Eine Reagenzienmischung mit sehr hoher Reaktivität stellt Sylon BTZ dar [SUPELCO 1996]. Es besteht aus N-Trimethylsilylimidazol (TMSIM) / Trimethylchlorosilan (TMCS) / N, O-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA), (3/2/3). Seine Verwendung ist von [STUMPF 1996] zur Derivatisierung von Steroidhormonen in den Extrakten von Kläranlagenausläufen beschrieben. Es derivatisiert OH-Gruppen zu Trimethylsilylethern.

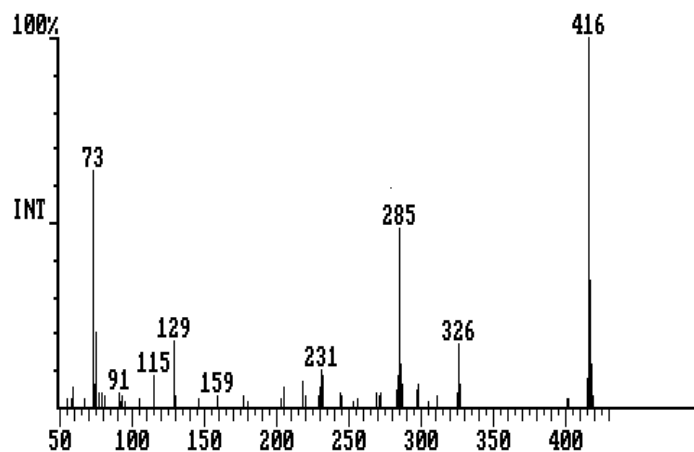
Diese ebenfalls in üblicher Weise durchgeführte Derivatisierung (Trockensubstanz oder zur Trockne einrotierte Lösungen mit Überschuß an Reagenz versetzen, 1h bei 60°C erhitzen, Zugabe von Hexan als Lösungsmittel) brachte für die Steroidhormone Ethinylestradiol und Estradiol die in der Literatur beschriebenen Reaktionsprodukte mit hervorragendem Response. Die OH-Gruppen in Position 3 und 17 bei Estradiol und bei Ethinylestradiol wurden ohne Nebenprodukte unter Erhalt der Ethinylgruppe silyliert.



**Abbildung 29 : Silylierung von Ethinylestradiol an den beiden Hydroxigruppen mit Sylon BTZ**



**Abbildung 30: Massenspektrum von 17 $\alpha$ -ethinylestradiol-di(trimethylsilyl)ether aus EED und Sylon BTZ**



**Abbildung 31: Massenspektrum von 17 $\beta$ -estradiol-di(trimethylsilyl)ether aus EDI und Sylon BTZ**

Für die Steroidhormone erschien dieses Reagenz als sehr gut geeignet, allerdings musste Sylon BTZ zu trockenen Standardsubstanzen oder trockengeblasenen Extrakten (Handling-Nachteil) zugegeben werden, die Derivatisierungserfolge mit den übrigen Substanzen (Alkylphenole, Diethylstilbestrol etc.) blieben aus. Ein weiterer Nachteil war die Kontamination der Messlösungen mit einer Substanz, die zur gleichen Retentionszeit wie Ethinylestradiol ein intensives Signal auf der gleichen Quantifizierungsmasse ( $m/z$  425u) besaß. Diese Fehlerquelle wurde von [TERNES 1999] nachträglich zu [STUMPF 1996] publiziert. Diese Substanz stammt aus dem Reagenz Sylon BTZ, konnte aber nicht weiter identifiziert werden.

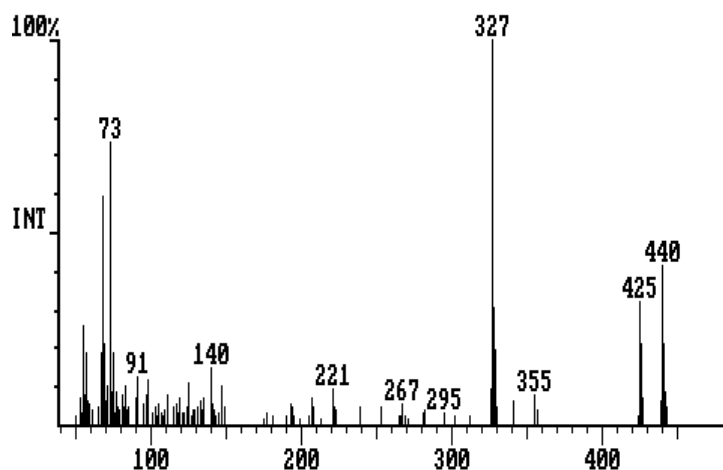


Abbildung 32: Kontaminante aus Sylon BTZ

Die MS-Bibliothekssuche ergab mehrere Vorschläge, deren Übereinstimmung mit dem vorliegenden Spektrum nicht sehr hoch war. Weiterhin war der Injektor nach mehreren Injektionen mit einem grauschwarzen Belag ausgekleidet, der durch Ausheizen und Ausglühen nicht zu entfernen war. Der Liner musste ersetzt werden. Aufgrund dieser Nachteile und Fehlerquellen wurde auch diese Derivatisierungsmethode nicht weiter verfolgt.

Es wurde dann ein neuer Gedanke verfolgt: Ermutigt durch die einfache Handhabung der Reagenzien TMSH und TBSH, die näherungsweise als On-Line-Derivatisierungen (weil fast ohne manuelle Arbeitsschritte) beschrieben werden können, sollte eine Analogie bei der Silylierung gefunden werden. Dies würde eine Arbeitseinsparung und Eliminierung von Fehlerquellen durch die manuellen Arbeitsschritte bedeuten.

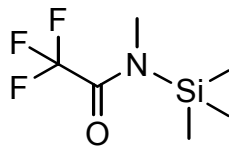
Natürlich wurden die gelungenen Derivatisierungen von Ethinylestradiol mit HFBSA und Sylon BTZ zum Anlaß genommen, diese Reagenzien als On-Line-Versuche mit Standards direkt in den Injektor einzuspritzen. Doch der Erfolg blieb, auch mit verschiedenen Injektor-Temperaturführungen, aus.

Das Ziel war, ein Reagenz zu finden, welches 1.) möglichst alle im Standard enthaltenen Substanzen derivatisiert (und Ethinylestradiol natürlich unter Erhaltung der Ethinylgruppe derivatisiert) und 2.) einfach nur zur Messlösung hinzugegeben werden muss und im Injektor die erwünschten Reaktionsprodukte erzeugt.

Als Nebenmerkmal sollte der Injektor auch nach häufigen Injektionen sauber bleiben und die erhaltenen Chromatogramme sollen keine oder vertretbar wenige Störpeaks von dem Reagenz und dessen Abbauprodukten aufweisen.

Das Verfahren sollte automatisierbar und reproduzierbar sein.

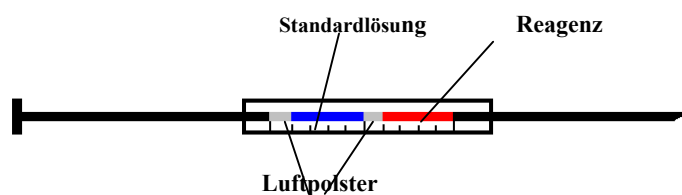
#### 4.2.5 On-Line-Silylierung



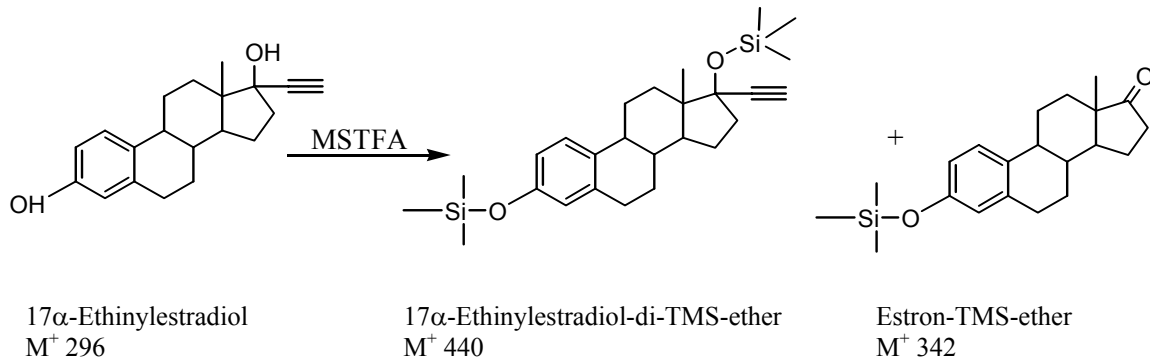
**Abbildung 33:**  
**Strukturformel MSTFA**

Die Verwendung von MSTFA spart den manuellen Schritt des Reagenz-Überschuss-Abblasens ein und verlängert die Nutzungsdauer von Injektor-insert und Kapillarsäule im Vergleich zu vielen anderen Reagenzien, denn MSTFA selbst und seine Nebenprodukte sind flüchtig, eluieren früh von der Säule und hinterlassen keine Rückstände im Injektor [DONIKE 1969]. Zur Analytik von Steroidhormonen wurde es daher auch im Trinkwasserbereich eingesetzt [SCHLETT 1996].

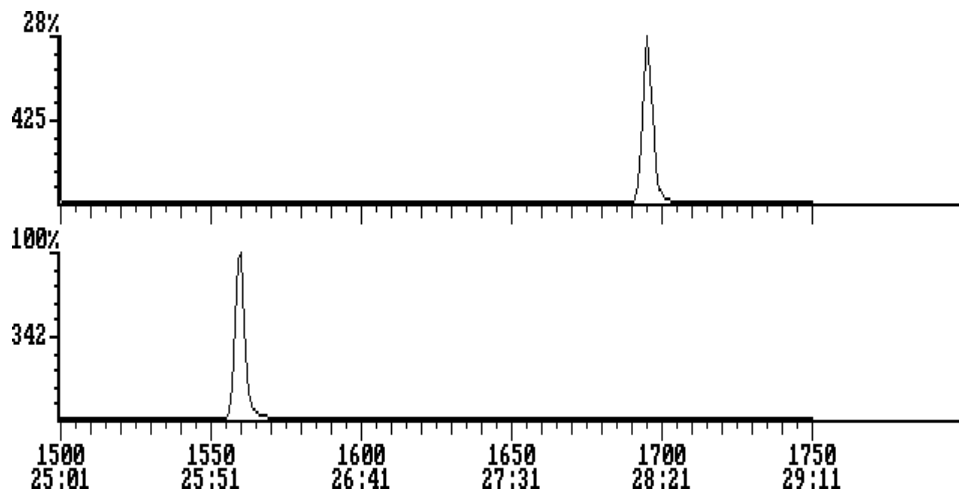
In der Reihe der getesteten Reagenzien war MSTFA das erste, welches im Injektor eine passable Reaktivität zeigte: 4 µl eines Standards von Ethinylestradiol und 4 µl MSTFA wurden, durch ein Luftpolster von 1 µl getrennt, nacheinander in eine Spritze aufgezogen (s.u.) und mit einem Stoß in den Injektor gespritzt. (Injektor-Temperaturprogramm: siehe Kap. ). Ein großer Peak von 17α-Ethinylestradiol-di(trimethylsilyl)ether erschien reproduzierbar im Chromatogramm. Er wurde jedoch durch einen noch größeren Peak von Estron-3-trimethylsilylether begleitet. Wieder stellte die Eliminierung der Ethinylgruppe das Problem bei der Derivatisierung dar. Aber diese erste On-Line-Derivatisierung im Injektor mit einem Silylierungsreagenz ohne vorherige Erhitzung (off-Line) zeigte aufbaufähige Ergebnisse. Durch das mit „Sandwich-Technik“ getrennte Aufziehen der Lösungen in die Spritze wurde eine Reaktion im Vorfeld ausgeschlossen und ausschließlich im Injektor durchgeführt. Die Reaktion kann teilweise auch vorher stattfinden, siehe dazu Kap. 4.2.5.3.



**Abbildung 34:** „Sandwich“-Technik zur Füllung der Spritze um die Reaktion im Injektor nachzuweisen



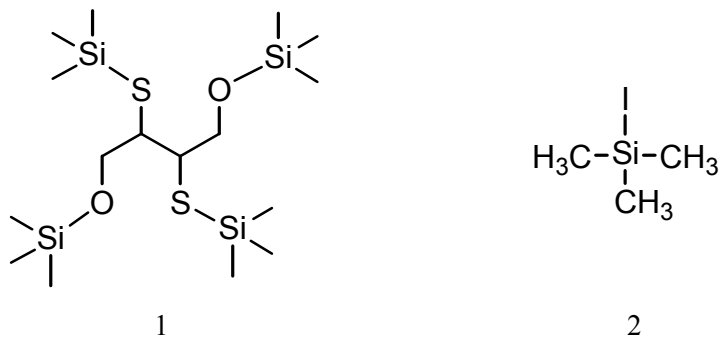
**Abbildung 35: Silylierung von Ethinylestradiol mit MSTFA zu zwei Produkten**



**Abbildung 36: Massenspektren der zwei Reaktionsprodukte von Ethinylestradiol mit MSTFA: 17α-Ethinylestradiol-di(trimethylsilyl)ether (m/z 425 durch Methylobspaltung aus m/z 440) und Estron-3-trimethylsilylether (m/z 342)**

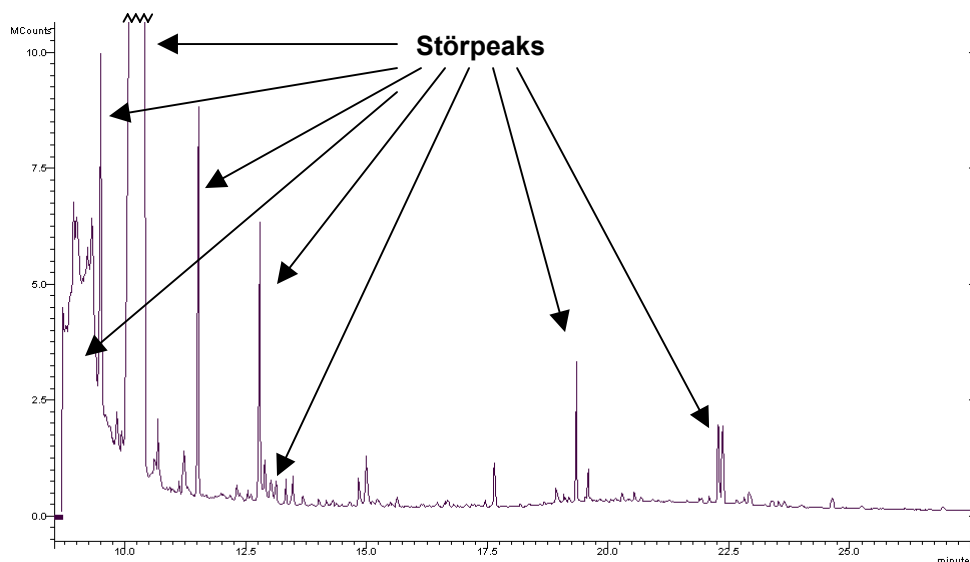
#### 4.2.5.1 Zusätze

Es wurde postuliert, dass eine hohe Temperatureinwirkung die Ethinylgruppen-Abspaltung von Ethinylestradiol zu Estron bewirkt, wenn EED sich nicht in der Gasphase befindet und auf unerwünscht katalytisch wirkendem Material im Injektor (z.B. Silanol-Gruppen der Glaswolle oder Matrix) abgelagert ist. EED-Standards ergaben bei Injektion ohne Derivatisierungsmittel in den PTV (neben anderen Zersetzungsprodukten) stets einen Haupt-Peak von Estron. So wurde ein Katalysator gesucht, der die Reaktivität von MSTFA soweit erhöht, dass die beiden OH-Gruppen schnell silyliert werden und das gebildete flüchtige Produkt sofort den Injektor Richtung Säule verlässt, um keiner weiteren Temperaturbelastung ausgesetzt zu sein.



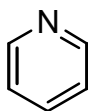
**Abbildung 37: Strukturformeln DTE (1) und TMIS (2)**

Der Literatur [SCHLETT 1996; SCHÄNZER 1996] wurde das Katalysatorgemisch Dithioerythrit (DTE) / Trimethylsilyl iodide (TMIS) entnommen, sie dienen als kräftige Trimethylsilylgruppen-Spender. Bei Derivatisierungsversuchen mit diesen Zusätzen ergaben sich große Störpeaks an Katalysator-Abbauprodukten. Diese störten die Chromatographie, besonders stark waren sie im Anfangsbereich der Chromatogramme vorhanden, wo sie durch beträchtliche Senkung der Ionisationszeit die Empfindlichkeit für die Bestimmung der Alkylphenole beeinträchtigten. Diese Katalysatoren wurden somit nicht für die Analytik verwendet.



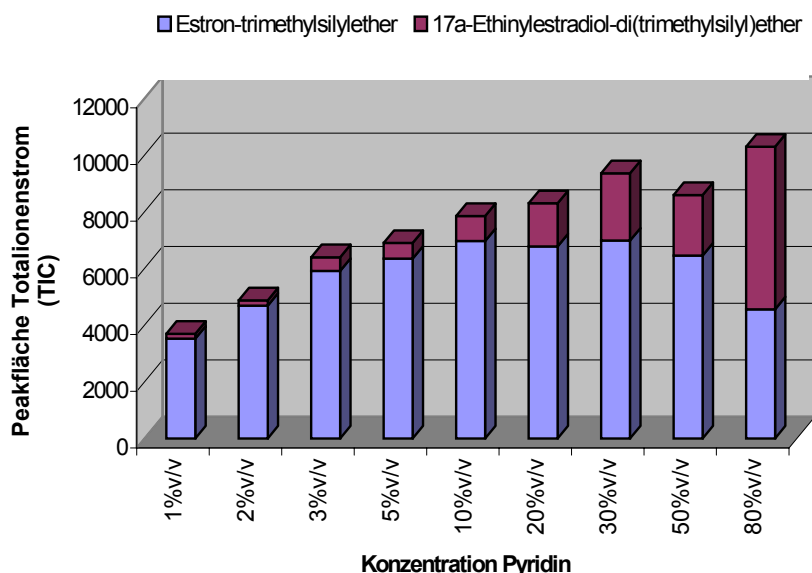
**Abbildung 38: Standardchromatogramm (Y-Achse gestreckt) mit Störpeaks durch DTE und TMIS**

Auf einem anderen Prinzip beruht die Katalyse durch Pyridin:



**Abbildung 39:**  
**Strukturformel Pyridin**

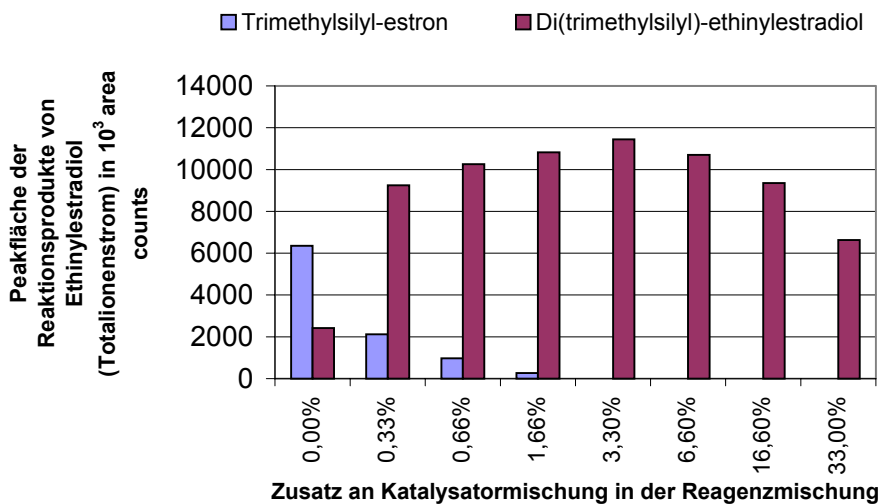
Pyridin kann durch seine Basizität für die benötigte Protonen-Abstraktion katalytisch wirken. Ein schrittweiser Ersatz des Lösungsmittels Ethylacetat durch Pyridin bewirkte eine Erhöhung der Ausbeute an 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol-di(trimethylsilyl)ether und Reduktion der Ausbeute an Estron-3-trimethylsilylether. Versuchsweise wurde dem an sich schon relativ starken Reagenz MSTFA die sehr starke Reagenzmischung Sylon BTZ in steigenden Konzentrationen zugegeben, denn silylierende Reagenzien katalysieren sich oft gegenseitig. Trotzdem wurde eine geringe Menge von 2% Pyridin beibehalten, um eventuell störende Protonen aus Verunreinigungen oder Wasserspuren abzufangen, um einer Hydrolyse vorzubeugen und zur Stabilität fertiger Lösungen zur eventuellen Nachmessung beizutragen.



**Abbildung 40: Reaktionsausbeuten in Abh. von Pyridinkonzentration**

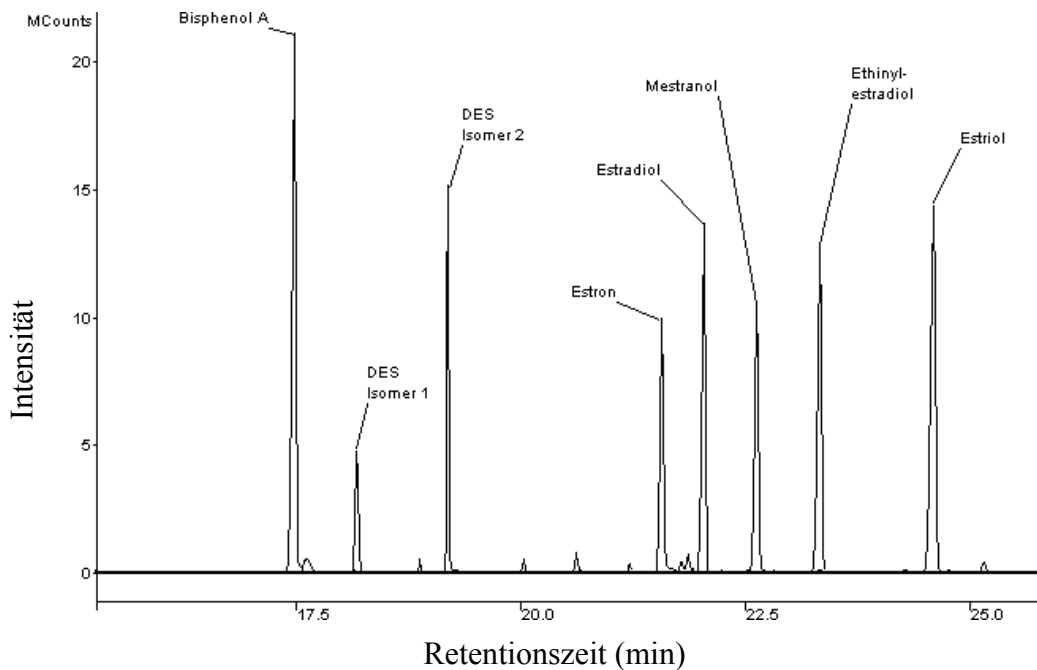
Der erreichte Effekt an Ausbeuteerhöhung ist (siehe Abb.) ersichtlich nicht zufriedenstellend. Pyridin wird in der Literatur oft zur Katalyse empfohlen [KNAPP 1979; BLAU 1981].





**Abbildung 41: Reaktionsausbeuten in Abhängigkeit von der Katalysatorkonzentration (3 Komponenten aus Sylon BTZ)**

Bei einer Konzentration von 3,3% an Sylon BTZ in MSTFA ist die Nebenreaktion zu Estron-3-trimethylsilylether komplett unterdrückt, gleichzeitig die höchste Ausbeute am erwünschten Produkt 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol-di(trimethylsilyl)ether zu verzeichnen. In der Abbildung ist zu erkennen, dass aus jedem Analyten nur ein definiertes silyliertes Reaktionsprodukt entsteht.

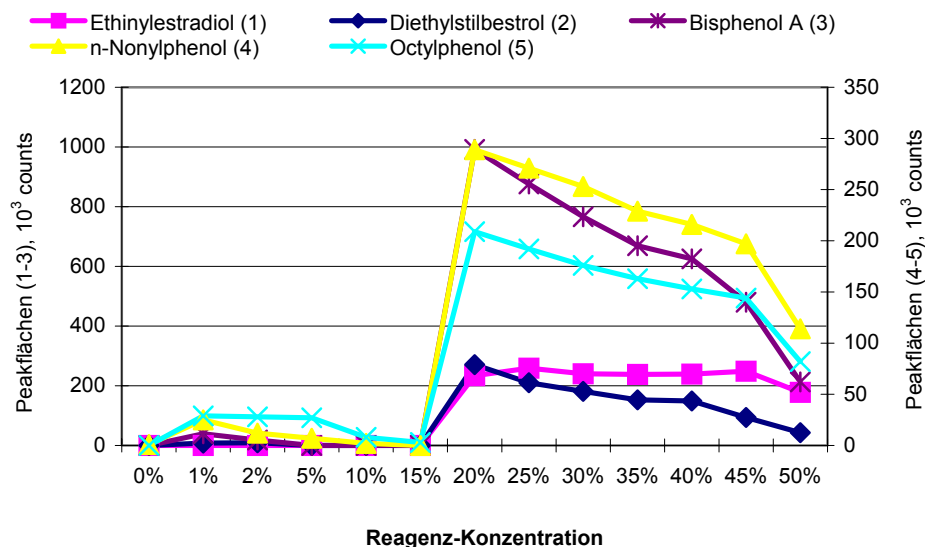


**Abbildung 42: jeweils einzelne definierte Reaktionsprodukte auf ihren Massenspuren (übereinandergelegte Chromatogramme)**

Im Folgenden wurde diese Reagenzmischung in dem ermittelten Verhältnis eingesetzt und mit dem Kürzel „HWR“ benannt. Sie enthält demnach in Volumenanteilen 94,7 % MSTFA, 2% Pyridin und 3,3% Sylon BTZ, welches wiederum TMSIM, TMCS und BSA im Verhältnis 3/2/3 (siehe 4.2.4) enthält.

#### 4.2.5.2 Konzentration

Es stellte sich die Frage, in welchem Verhältnis Messlösung und Reagenz miteinander gemischt werden sollen. Eine möglichst große Menge an Probe sollte zur Erzielung einer guten Empfindlichkeit der Methode in das Meßsystem eingeführt werden, die Menge an Reagenz sollte sich in Maßen halten. Es wurden daher verschiedene Mengenverhältnisse von Standards und Reagenz hergestellt und mit der gleichen Endkonzentration an Analyten gemessen.

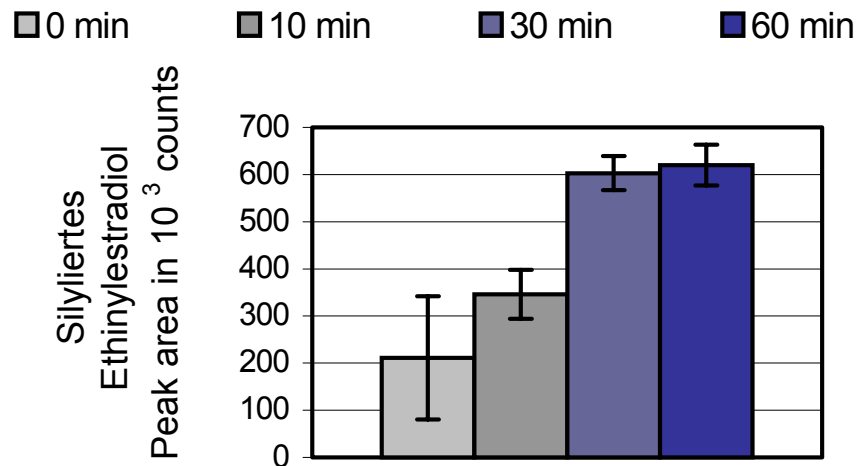


**Abbildung 43: Ausbeute an Reaktionsprodukten in Abhängigkeit von der Menge an Reagenz**

Das Maximum sowie die höchste einsetzbare Menge an Messlösung liegen im Verhältnis 80 zu 20 von Probe zu Reagenzmischung. Das bedeutet, bei der Automix-Methode wurde eine automatische Zugabe von 10 µl Reagenzmischung zu vorgelegten 40 µl Probe einprogrammiert.

#### 4.2.5.3 Reaction Time

Es wurde festgestellt, dass nach einer gewissen Standzeit nach Zugabe der Reagenzmischung die Peakflächen für derivatisiertes Ethinylestradiol anstiegen. Deshalb wurde eine Vor-Reaktion bei Raumtemperatur im Vial zusätzlich zu der im Injektor postuliert.



**Abbildung 44: Peakfläche in Abhängigkeit von der Standzeit im Vial**

Die programmierbare Reaktionszeit zwischen Reagenz-Zugabe und Injektion wurde von 0-60 min variiert. Nach 30 Minuten war ein Plateau im Reaktionsverlauf erreicht. Diese Zeit wurde in der Software als Reaction Time einprogrammiert. Der so gesteuerte Autosampler dosierte nun 10  $\mu$ l Reagenzmischung aus einem Vorrats-Vial zu den eingefüllten 40  $\mu$ l zu messender Lösung, mischte durch Kolbenhub, wartete 30 Minuten und injizierte dann.

#### 4.2.5.4 Aufgabetemperatur

Die Temperatur bei der Injektion wurde bei 60°C belassen, da dieser Wert 17°C unter dem Siedepunkt des Lösungsmittels Ethylacetat liegt, was einen für die Kaltaufgabe sicheren Abstand vom Siedepunkt und eine für andere Anwendungen (Pestizidanalytik) bewährte Aufgabetemperatur darstellt.

#### 4.2.5.5 Endtemperatur

Es wurde geprüft, ob eine Ausbeuteerhöhung durch Variation der Injektor-Endtemperatur eintritt. In Temperaturintervallen von 10°C wurde der Bereich von 280°C bis 350°C untersucht, jedoch keine Abhängigkeit festgestellt. Die einzelnen Werte unterschieden sich nur durch statistische Schwankungen.

#### 4.2.5.6 Trocknungszeit (Purge Time)

Es stellten sich die Fragen, wie weit die aufgegebenen Proben im Injektor getrocknet werden, ob eventuell Reagenz beim Abblasen verloren geht und bei welchem Wert die größten Peakflächen erhalten werden. Empirisch wurde durch Variation der Trocknungszeit (Purge time) ein guter Kompromiss gefunden.

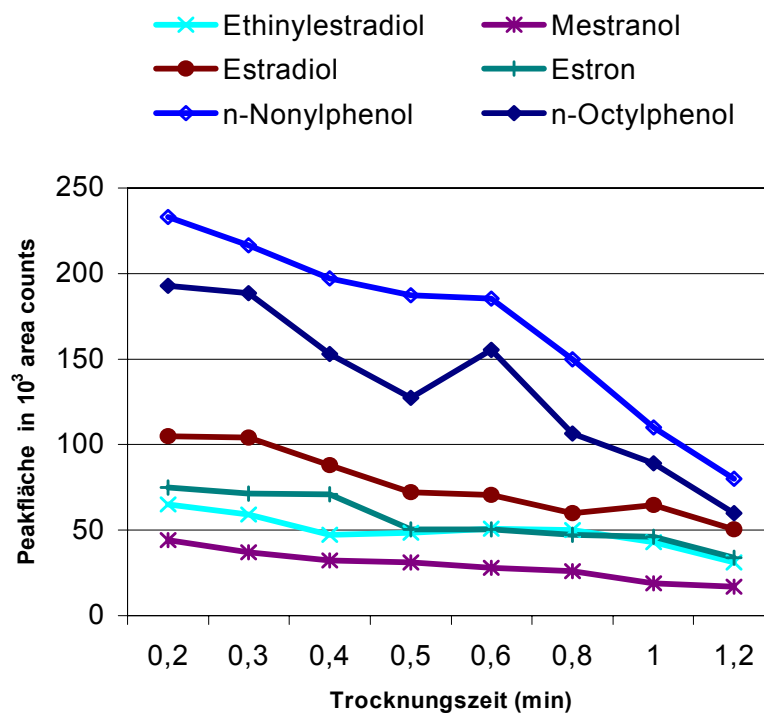
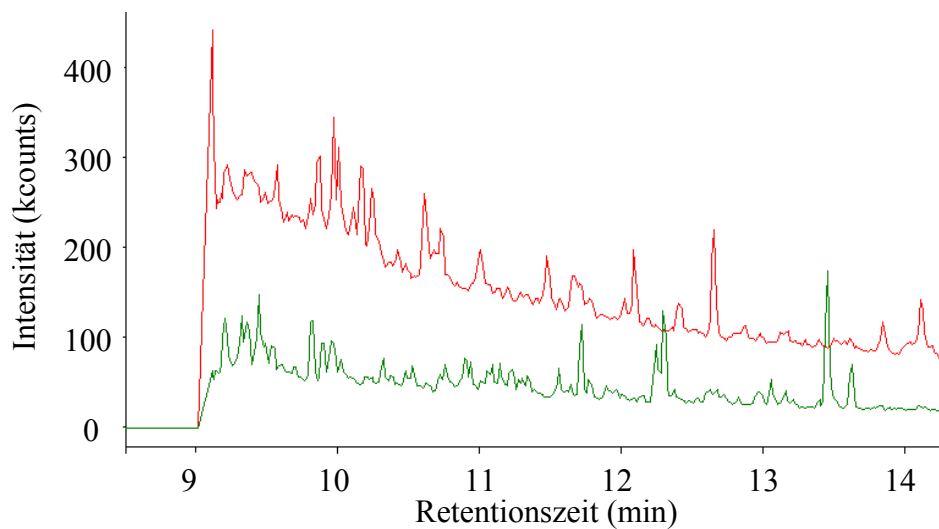


Abbildung 45: Peakfläche der TMS-Derivate in Abhängigkeit von der Abblase-Dauer

Erkennbar liegt der höchste Response für alle Substanzen bei einer Purge Time von 0,2 Minuten, also 12 Sekunden, eine weitere Steigerung zu kürzeren Zeiten ist zu erwarten.

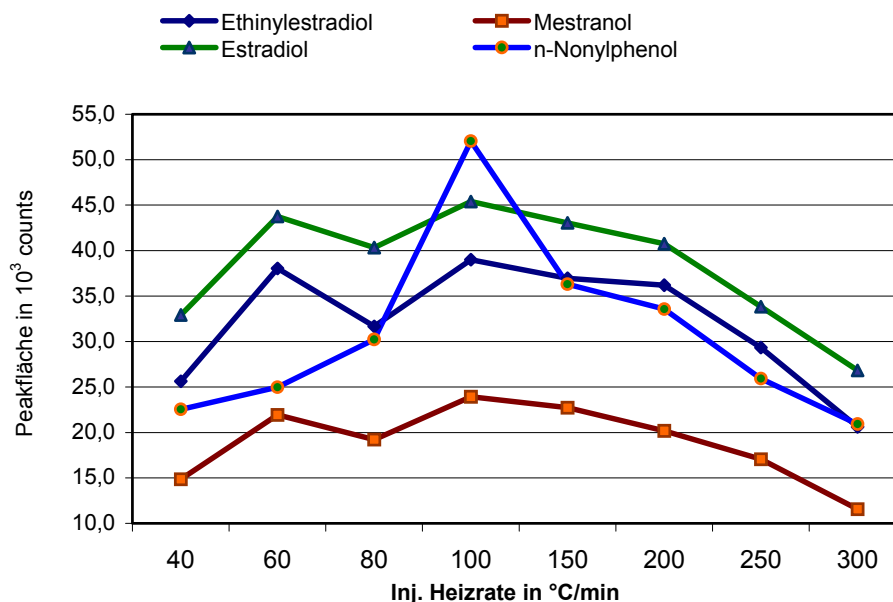


**Abbildung 46 Untergrund (Full Scan) m/z 75-145 bei verschiedenen Abblaszeiten, oberes Chromatogramm 0,2 min; unteres Chromatogramm 1,2 min**

Da jedoch das chemische Rauschen, (der Untergrund) mit verringerter Abblaszeit stark zunimmt, wurde auf eine weitere Verkürzung der Trocknungszeit verzichtet und 0,2 min als Mittelweg gewählt. Es ist zu erwarten, dass nach 12 sec nicht das gesamte Lösungsmittelvolumen von 10 µl abgeblasen ist (siehe auch Kap. 4.3.1). Praktisch ließ sich dies nicht direkt prüfen, weil das Aufschauben des Injektors im Betrieb zur Betrachtung des Liners zur Überprüfung der Trocknung bereits ca. 12 sec dauerte. So wurde als Behelf mittels einer Gasleitung und einer Pipettenspitze ein Gasstrom von 100 ml/min aus den Split-Ausgang durch einen ausgebauten Liner mit 10 µl Ethylacetat geleitet und das Trocknungsverhalten beobachtet. Nach 45 sec waren diese 10 µl Ethylacetat komplett abgeblasen, wobei als Randbedingungen die Raumtemperatur und der Atmosphärendruck galten. Im Injektor herrschte zwar eine höhere Temperatur (60°C) doch durch den Druck von 120 kPa erhöhte sich der Siedepunkt um ca. 10-15°C, zusätzlich bedeutete der physikochemische Term  $p dV$  eine höhere Volumenarbeit beim Verdampfen des Lösungsmittels (und dadurch eine längere Verdampfungszeit). Somit konnte abgeschätzt werden, dass ein größerer Teil des Lösungsmittels auf der Fritte im Liner verblieb, bis der Split geschlossen wurde und das Lösungsmittel in den ersten Minuten des Chromatogramms (ohne Datenaufnahme, Filament/Multiplier Delay) nach Rekondensation und Lösungsmittel-Effekt (Solvent Effect, siehe Kap. 2.3) über die Säule abgeblasen wurde.

#### 4.2.5.7 Injektor-Heizrate (Ramp)

Die Aufheizgeschwindigkeit des Injektors beeinflusst ebenfalls die Derivatisierung, jedoch nicht so gravierend wie die o.g. Parameter



**Abbildung 47: Peakfläche der TMS-Derivate in Abhängigkeit von der Injektor-Heizrate**

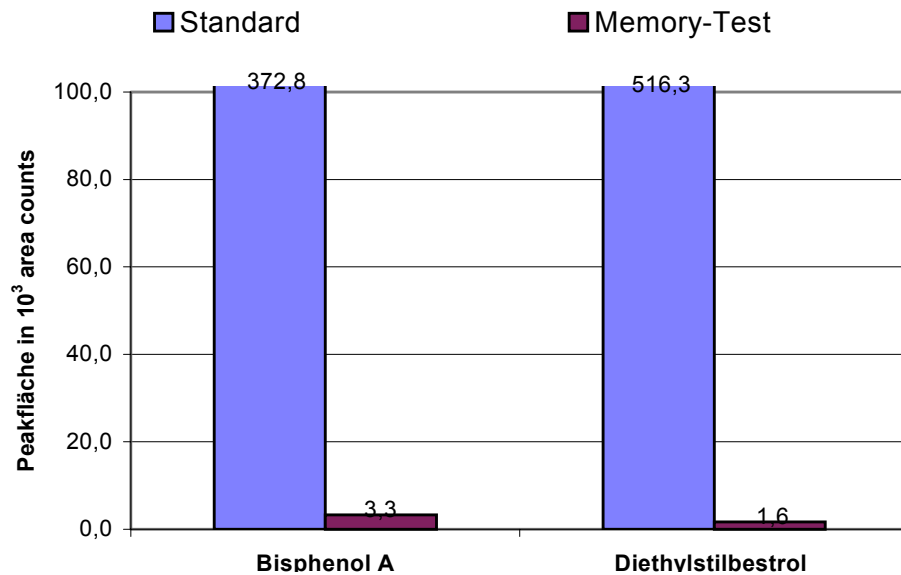
Obwohl die Messreihe für dieses Experiment keinen idealen, regelmäßigen Verlauf zeigte, wurde doch die Abhängigkeit der Peakflächen von der Ramp deutlich: Bei einem zu langsamen Aufheizen des Injektors wurde schon vor Erreichen des für die Reaktion optimalen Temperaturbereiches zuviel vom Reagenz abgeblasen (über die Säule, da der Split nach Ablauf der Purge Time von 0,2 min geschlossen war); bei zu schnellem Aufheizen ist es vorstellbar, dass die gebildeten Reaktionsprodukte eine gewisse Thermolabilität zeigten und sich zersetzten.

Als optimaler Wert für die Heizrate wurde ein Wert von 100°C/min entnommen und für die Injektor-Programmierung verwendet .

#### 4.2.5.8 Ausheizen

Geringe Reste von zwei Substanzen (Bisphenol A und Diethylstilbestrol) verblieben nach einer Messung im Injektor. Um falsch-positive Ergebnisse durch Memory-Effekte zu vermeiden, musste der Injektor durch ein gründliches Ausheizen gereinigt werden. Das Temperaturprogramm für dem Injektor sieht daher nach der Aufheizphase (die den Reaktions- und Transferschritt der Probe von Injektor auf die Säule darstellt) ein erneutes Öffnen des Split und ein Ausheizen bei 350°C für 15 Minuten vor. Es verblieben nach diesem Schritt lediglich kleine, unvermeidbare Spuren von BPA und

DES im Injektor, die in einer Leerwert-Messung nur im MS/MS-Betrieb sichtbar sind (Memory-Test) und umgerechnet nur irrelevant geringen Konzentrationen von 0,5 (BPA) und 0,1 ng/l (DES) in einer Probe entsprechen würden. Diese Spuren gingen als Blindwerte in die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze ein (Kap. 4.6).



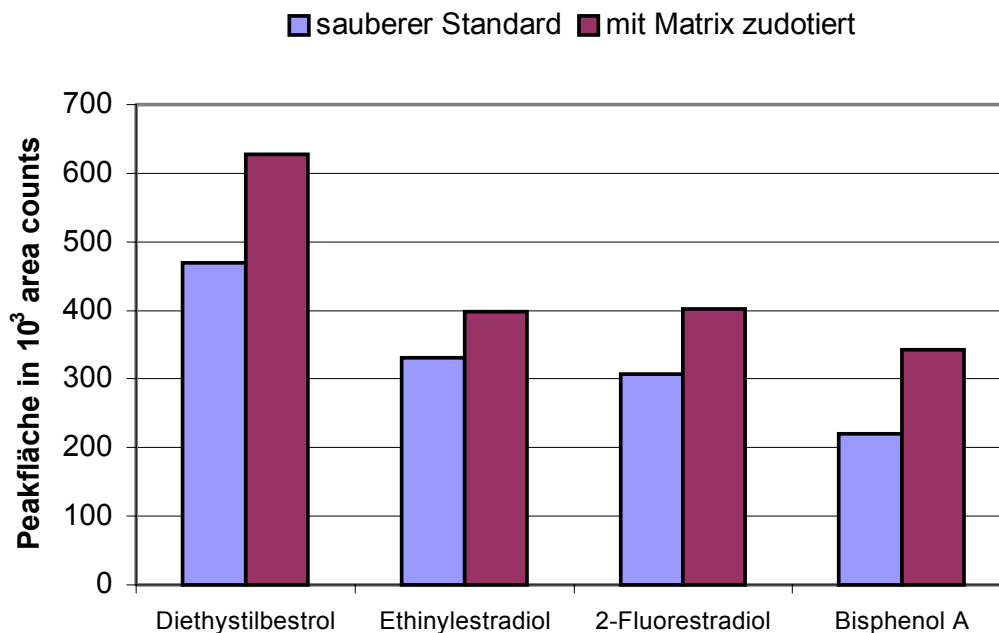
**Abbildung 48: geringe Rückstände von Bisphenol A und Diethylstilbestrol im Injektor; Peakflächen des Standards entsprechen 50 ng/l**

Nach jeder Messreihe wurde zusätzlich eine routinemäßige Desaktivierung des ausgebauten Liners angeschlossen: Dieser wurde ca. 2 min in der oxidierenden Flamme eines Bunsenbrenners geblüht, wobei eine Verformung aufgrund Aufweichung des Quarzglas zu vermeiden ist.

#### 4.2.5.9 Matrix-Effekt

Matrixbestandteile aus der Probe beeinflussen die Chromatographie und die Injektion. Bei On-Column-Messungen belegen polare, nichtflüchtige Substanzen Bereiche des Retention Gaps und bewirken eine Peakflächenverringering sowie Tailing der Peaks von Analyten mit polaren Gruppen. Bei PTV-Systemen kann ein analoger oder (so wie hier) gegenteiliger Effekt im Injektor eintreten. Polare SiOH-Gruppen eines nicht hundertprozentig desaktivierten oder durch Wasserspuren in Proben wieder aktivierten Liners werden durch polare Matrixbestandteile abgesättigt und somit die Chromatographie/Injektion von Analyten mit polaren Gruppen verbessert [GROB 1993].

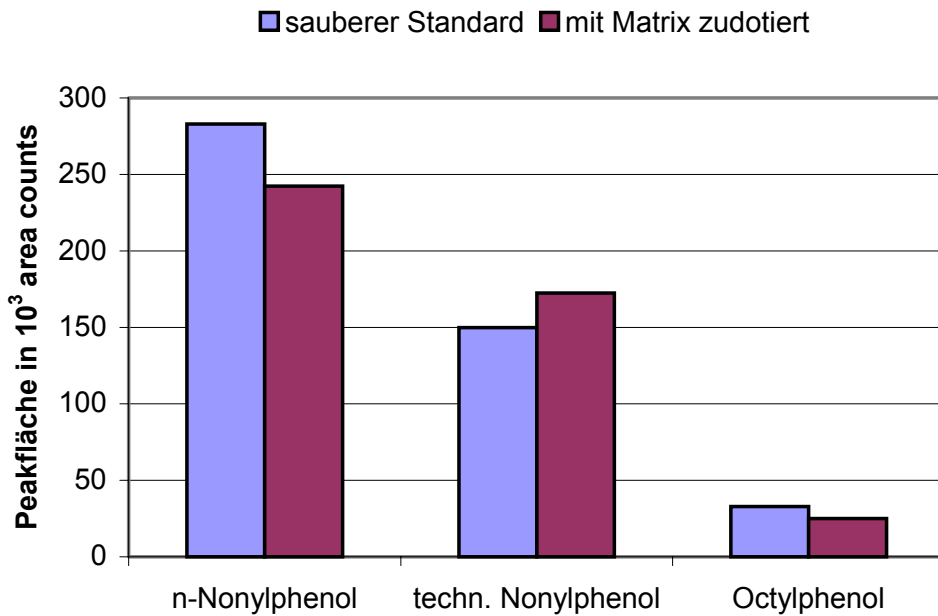
Dieser Effekt wurde bei der angewendeten Analytik festgestellt und dessen Einfluss auf die Derivatisierung studiert. Es zeigte sich bei den Steroidhormonen, DES und BPA ein Anstieg der Peakflächen durch einen Matrixzusatz in Form einer Mischung von Oberflächenwasser-Extrakten. (Abb. Diese Extrakte enthielten keine nachweisbaren Mengen an diesen o.g. Substanzen, bei denen ein Peakflächenzuwachs verzeichnet wurde.



**Abbildung 49: Matrixeffekt bei Diethylstilbestrol, Ethinylestradiol, Bisphenol A**

Bei den Alkylphenolen zeigte sich dagegen ein Rückgang der Peakflächen durch den Matrixzusatz, gewonnen aus Oberflächenwasser-Extrakten. Die Derivatisierung wurde durch das Vorhandensein von Matrix behindert, außer anscheinend bei techn. Nonylphenol; die höheren Peakflächen sind jedoch als Zuwachs durch einen „echten“ Gehalt aus dem Matrixzusatz zu interpretieren. Es ist zudem kein Grund ersichtlich, warum sich techn. Nonylphenol anders verhalten sollte als Octylphenol und n-Nonylphenol.





**Abbildung 50: Matrixeffekt bei den Alkylphenolen**

Die Peakflächen der o.a. derivatisierten Produkte erhöhten sich generell um ca. 20 bis 35%. Dieser unvermeidbare Effekt könnte zu Fehlern bei der Quantifizierung führen, doch durch die Verwendung der internen Standards (jeweils einerseits für die Alkylphenole und die übrigen Substanzen auf der anderen Seite) wurde dieser Effekt egalisiert und annäherungsweise wieder kompensiert.

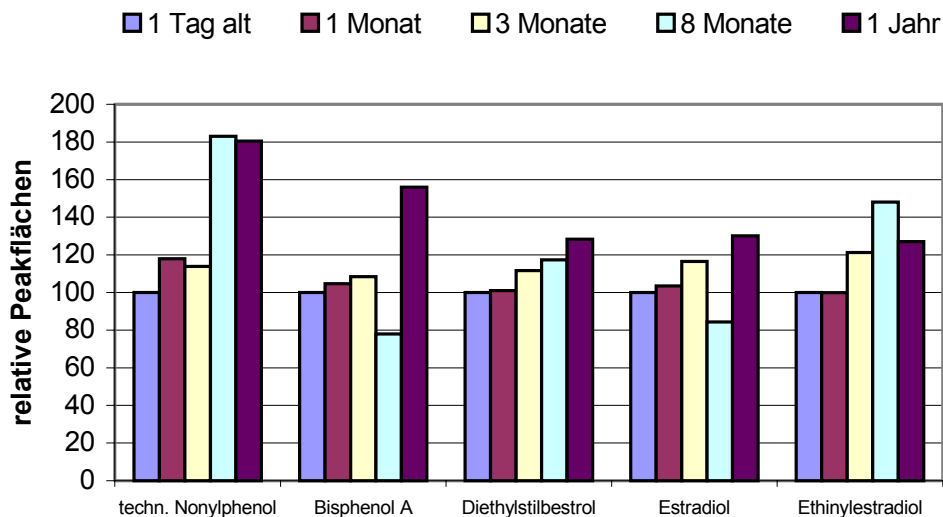
**Tabelle 10: Quantifizierung des Matrixeffektes in Prozent**

Octylphenol (Peak. 1)	<b>-15</b>
Octylphenol (Peak. 2)	<b>-24</b>
techn. Nonylphenol	<b>15</b>
n-Nonylphenol	<b>-14</b>
Diethylstilbestrol	<b>34</b>
Bisphenol A	<b>56</b>
Hexestrol	<b>29</b>
Androsteron	<b>34</b>
Estron	<b>35</b>
Estradiol	<b>39</b>
Mestranol	<b>35</b>
Ethinylestradiol	<b>20</b>
Estriol	<b>35</b>
2-Fluorestradiol	<b>31</b>

Der abweichende, höhere Wert von Bisphenol A beruht auf (wie der des techn. Nonylphenol) auf den Gehalten der Oberflächenwasser-Extrakte, die zur künstlichen Matrix-Kontamination der Standards verwendet wurden

#### 4.2.5.10 Haltbarkeit

Die Reagenzmischung HWR besitzt eine hohe Stabilität. Mehrfach geöffnet und benutzt, zeigten im Kühlschrank bei 4°C in handelsüblichen 1,4 ml-Vials mit Schraubdeckeln aufbewahrte Rückstellmuster im Alter von bis zu einem Jahr keine verringerte Reaktivität.



**Abbildung 51: relative Peakflächen derivatisierter Standards mit verschiedenen alten Rückstellproben von HWR im Vergleich (1Tag alt = 100%)**

Wider Erwarten waren die Peakflächen der mit älterem Reagenz erhaltenen Derivate sogar höher als die mit frischem HWR. Der Anstieg ist zumindest zum Teil dadurch erklärbar, dass Ion-Trap MS-Systeme eine Empfindlichkeitsdrift zeigen sodass aus identischen Messlösungen im Verlaufe eines Tages oder einer Messreihe anstatt konstanten bzw. zumindest statistisch normalverteilten Werten ansteigende Peakflächen gemessen wurden. Ein Anstieg von 20-30% wäre somit erklärbar. Darüber hinaus ließ sich postulieren, dass möglicherweise durch Übertragung von Trimethylsilylgruppen untereinander die Komponenten von HWR in einem langsamen Prozess reaktive Zwischenprodukte gebildet hätten, die dann eine höhere Reaktivität insgesamt erbracht haben könnten.

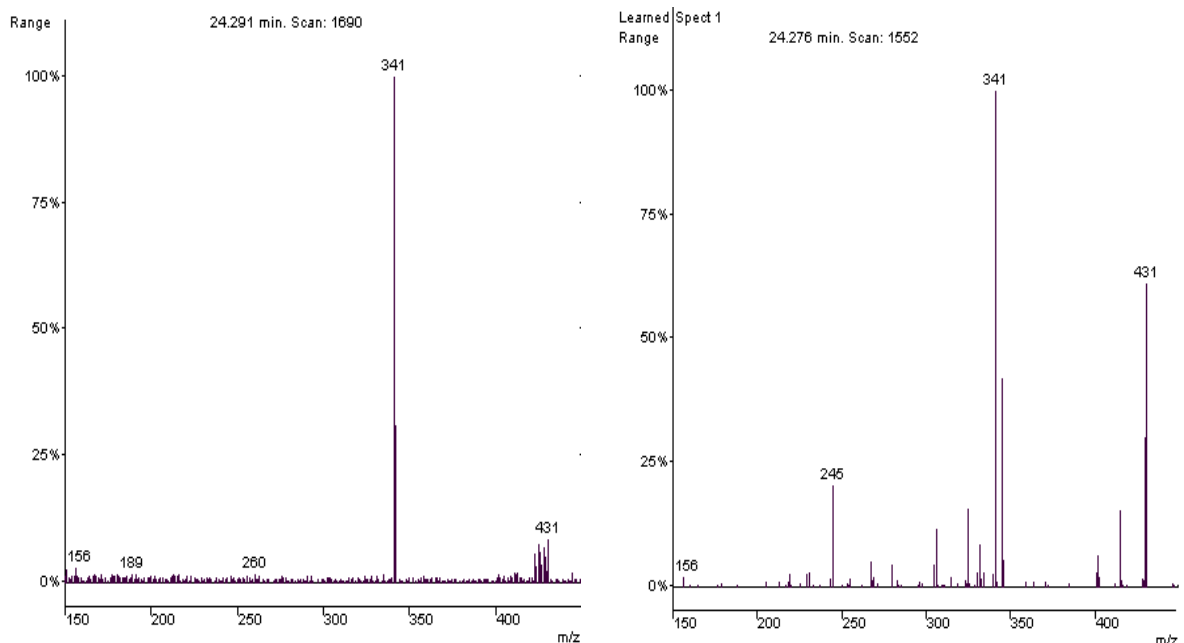
Mit Reagenz gemischte Lösungen konnten zum Zweck von Wiederholmessungen mindestens (soweit untersucht) zwei Wochen mit intakten Septen im Schraubdeckel der Vials aufbewahrt und gemessen werden, ohne dass Hydrolyse oder Zersetzung auftrat. Dies war mit off-Line derivatisierten Lösungen mit anderen Reagenzien nicht möglich.

#### 4.2.5.11 Chemisches Rauschen

Als Nachteil dieser Derivatisierung (allgemein von Derivatisierungen, außer mit frischem Diazomethan) ist das erhöhte chemische Rauschen zu nennen, es resultierte aus Verunreinigungen der Reagenzmischung, zum Teil auch aus unerwünschter Derivatisierung von Matrixkomponenten, die zusammen mit den Analyten in eine flüchtige Form gebracht wurden. Dieses Problem hielt sich allerdings sehr in Grenzen, da die MS/MS Technik verwendet wurde und dadurch die Höhe des Untergrundes von minderer Bedeutung war. Solange keine großen coeluiierenden Peaks und keine identischen Massen auftraten, stellte der Untergrund bei MS/MS kein Problem dar.

Ein extremer Zufall trat bei 2-Hydroxyestron auf, der allerdings nichts mit der Derivatisierung im speziellen, sondern mit allgemeinen Kontaminationen in der GC-Analytik zu tun hat, mit Silikonverunreinigungen aus Septen.

Es wurde festgestellt, dass die verwendeten Silikon-haltigen Septen zu Kontaminationen der Messlösungen führten. Unglücklicherweise coeluierte 2-Hydroxyestron bis auf maximal zwei bis drei Sekunden Differenz mit einem Peak der Silikon-Kontaminationen (Dodecamethylcyclohexasiloxan). Durch Variation des GC-Temperaturprogramms war keine verbesserte Trennung der Komponenten zu erreichen.



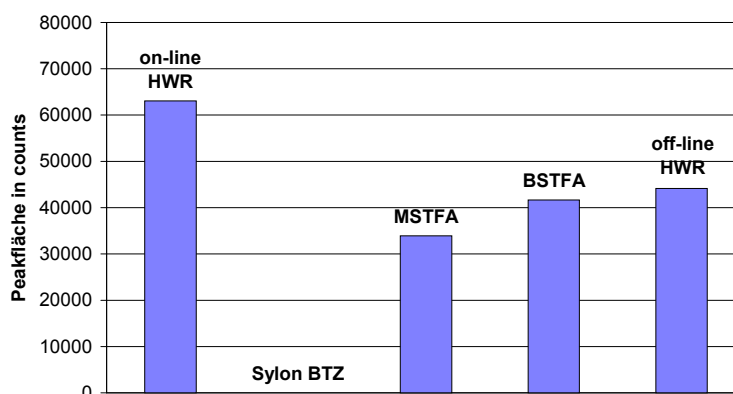
**Abbildung 52: MS/MS-Spektren von Dodecamethylcycloheptasiloxan (links) und 2-Hydroxyestron (rechts)**

2-Hydroxyestron und dieses Silikon besaßen das gleiche Signal für die Molekülonen im Full-Scan-Modus (m/z 430). Dieses Problem wurde durch MS/MS (Fragmentierung von m/z 430 als Parent Ion) leider nicht gelöst: Es trat der seltene Sonderfall ein, dass auch das Produkt-Ion identisch ist: (m/z 341). Erst bei viel höheren Konzentrationen als bei den anderen Steroidhormonen war ein Peak des Produkt-Ions zu erkennen, d.h. erst bei ausreichender Größe des Peaks war er von der Flanke des Peaks des Silikon-Tochterions einigermaßen losgelöst und integrierbar.

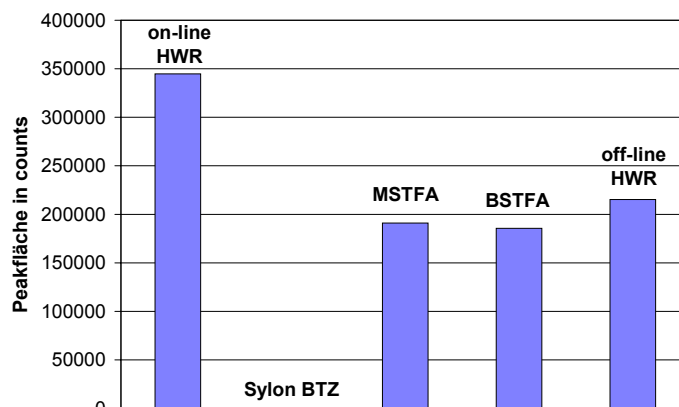
Aus diesen Gründen wurde die Nachweisgrenze für 2-Hydroxyestron erheblich heraufgesetzt, sodass der Arbeitsbereich weit über der abgeschätzten relevanten Umweltkonzentration lag. Folglich wurde diese Substanz aus der Liste der analysierbaren Substanzen gestrichen.

#### 4.2.6 Weitere Reagenzien, Vergleich, Ausbeute

Die selbst entwickelte Reagenzmischung HWR musste natürlich einem Vergleich mit konventionell verwendeten Reagenzien standhalten. Der Vergleich wurde sowohl On-Line als auch off-Line durchgeführt. Zur Simulation realitätsnaher Bedingungen wurden einer matrixhaltigen Oberflächenwasserextrakt-Mischung, die wahrscheinlich auch Spuren von Wasser enthielt, die Analyten der derivatisierten Stoffgruppe zudotiert und somit simulierte Probenextrakte mit positiven Befunden erzeugt. Vier Experimente mit verschiedenen Reagenzien wurden in konventioneller Verfahrensweise manuell, d.h. off-Line derivatisiert. Es kamen Sylon BTZ, MSTFA mit den zumeist in der Literatur publizierten Katalysatoren DTE und TMIS (1000:2:2), BSTFA sowie HWR, experimentellerweise off-Line angewendet, zum Einsatz. Die fertig derivatisierten Lösungen wurden 24h im Kühlschrank aufbewahrt. Das fünfte Experiment wurde On-Line in der beschriebenen Weise derivatisiert und zusammen in einer Messreihe mit den anderen Versuchen gemessen. Für die Statistik wurde jedes Experiment fünffach angesetzt (Konzentration der Standards: 0,1 mg/l).



**Abbildung 53: Peakflächen für derivatisiertes Ethinylestradiol in Vergleich verschiedener Reagenzien und Derivatisierungsverfahren**



**Abbildung 54: Peakflächen für derivatisiertes n-Nonylphenol in Vergleich verschiedener Reagenzien und Derivatisierungsverfahren**

Sylon BTZ, das aggressivste Reagenz, ergab in keinem der Versuchsansätze die erwünschten Reaktionsprodukte, offensichtlich war schon Hydrolyse der empfindlichen Lösungen eingetreten. BSTFA ergab etwas bessere Ergebnisse als MSTFA, mit 10 bis 30 Prozent höheren Peakflächen. Als Nachteil von BSTFA lagen die Variationskoeffizienten mit 30 bis 45 Prozent relativ hoch, verglichen mit denen von 15 bis 30 Prozent von MSTFA.

Die On-Line-Derivatisierung mit HWR ergab in allen Fällen die höchsten Peakflächen für alle Analyten, sie waren 30 bis 60 Prozent höher als die mit BSTFA erzeugten, in die Variationskoeffizienten lagen vergleichsweise niedrig und stabil zwischen 19 und 25 Prozent. Als Nebenergebnis war zu erkennen, dass das entwickelte Reagenz HWR auch für off-Line Derivatisierungen geeignet war und sogar bessere Ergebnisse brachte als BSTFA und MSTFA mit den üblichen Katalysatoren.

Die On-Line-Derivatisierung wird auch von [MÖDER 2000] systematisch untersucht und genutzt; zeitnah soll eine Publikation darüber erscheinen.

## 4.2.7 Übersicht über die getesteten Derivatisierungsreagenzien

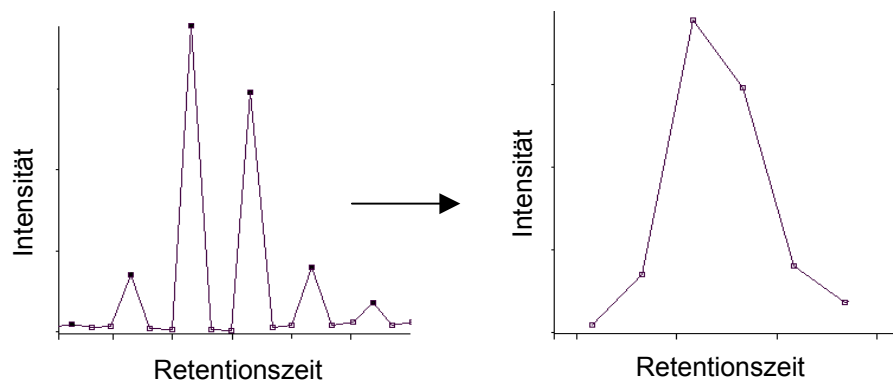
Tabelle 11: getestete Derivatisierungsreagenzien

Reagenz	Substituent	Ergebnis
Diazomethan	-CH <sub>3</sub>	Keine genügende Reaktivität bzw. Protonen der Analyten nicht genügend acide
TMSH	-CH <sub>3</sub>	Unkontrollierbare Nebenreaktionen mit EED, mehrere Reaktionsprodukte
TBSH	-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	Zwei Reaktionsprodukte mit EED, Matrixeffekt bestimmt das Hauptprodukt, Matrixeffekt nicht reproduzierbar
HFBSA	-COC <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	Keine Reaktion mit NP und DES, sehr instabile Reaktionslösungen
PFBB	-Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Keine genügende Reaktivität
Sylon Btz	-Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Handling-Nachteile, keine reaktion mit NP, OP, DES, Kontamination auf m/z 425 bei gkeicher tR wie EED, sehr instabile Reaktionslösungen
MSTFA (ohne Zusätze)	-Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Zwei Reaktionsprodukte mit EED
MSTFA (+DTE +TMIS)	-Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Vielzahl von Störpeaks
HWR (MSTFA+Sylon BTZ+Pyridin)	-Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Geeignet. Eindeutige Reaktionprodukte, große Peakflächen bei geringer Variation in der On-Line-Derivatisierung
BSTFA	-Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Ebenfall geeignet (off-Line), geringere Peakflächen bei höherer Variation

### 4.3 Injektionsmethode für die nicht derivatisierte Stoffgruppe

Die Messmethodik bei den nicht derivatisierten Substanzen war eine andere: es wurde im Full-Scan-Modus gemessen. Theoretisch wäre auch die MS/MS-Technik anwendbar gewesen, doch die Retentionszeiten der zu analysierenden Substanzen lagen so nah beieinander, so dass bei einer separaten Fragmentierung in kurzen, aufeinanderfolgenden Segmenten (erste Möglichkeit) die Umschalt-Zeiten für das Massenspektrometer nicht ausreichten. Zum Umschalten der elektromagnetischen Felder zur Erzeugung der Tochtterspektren wurde erfahrungsgemäß jeweils 10-15 Sekunden benötigt; in dieser Zeit kann nicht gemessen werden, die Retentionszeiten lagen jedoch z.T. nur 5-10 Sekunden auseinander. Hinzu kam die Unsicherheit, dass ein Peak bei diesen eng bemessenen Zeitfenstern durch die normale Variation der Retentionszeit aus seinem Fenster zumindest teilweise herausrutscht. Durch eine neue Software-Version wurde die Umschalt-Zeit zwar verkürzt, dadurch jedoch nicht diese Problem gelöst.

Alternativ dazu hätten die kurz nacheinander eluierenden Substanzen in einem gemeinsamen MS/MS-Segment erfasst werden können (zweite Möglichkeit). Davon wurde ebenfalls abgesehen: Die MS/MS-Messdaten wurden zwar in zeitlich guter Auflösung erfasst (ca. 0,3-0,5 sec minimaler Abstand der Einzel-Scans), diese teilten sich dann aber auf die einzelnen Substanzen in einem MS/MS-Segment auf, d.h. die Anzahl von Datenpunkten für einen Peak wurde geringer, was zu Lasten der Empfindlichkeit und Genauigkeit ging. So betragen die relativen Variationskoeffizienten für Full-Scan-Messungen 7,5-16%, für MS/MS-Messungen mit nur einer Substanz im Segment waren sie mit 11-20% geringfügig höher (solange die Peaks nicht, wie oben erläutert, aus dem Segment fielen), mit mehreren Substanzen in einem Segment waren sie mit 17-33% erheblich höher.



**Abbildung 55: schematische Darstellung der nachteilhaften Messung mit mehreren Substanzen in einem MS/MS-Segment, z.B. kann bei drei Substanzen nur jeder dritte Datenpunkt für jede Substanz verwendet werden (links); daraus wird ein ungenauer Peak berechnet (rechts).**

Aus diesen Gründen wurde die Messung der underivatisierten Substanzen immer im Full-Scan-Modus durchgeführt. Eine gemeinsame Erfassung mit den derivatisierten Substanzen in einem Chromatogramm wurde auch getestet, doch es kam a) zu erheblichen Verlusten an underivatisierten Analyten in Anwesenheit von Reagenz und b) wären bei der Vielzahl der Analyten die oben diskutierten Probleme nur noch größer geworden.

Im hier verwendeten Solvent Split Purge-Modus mit Kaltaufgabe von 10 µl wurden wie bei den derivatisierten Substanzen gute Resultate erzielt, insbesondere die Empfindlichkeit für die PCB war dank der prägnanten Massenspektren und hohen Quantifizierungsmassen als gut zu beurteilen.

Es ergab sich dadurch eine begrüßenswerte Arbeitersparnis, da das Injektionssystem nicht für einen Wechsel zwischen mit und ohne Derivatisierung umgebaut werden musste.

### 4.3.1 Trocknungszeit (Purge Time)

Die Standardbedingung „100 sec abblasen bei 60°C“, die zunächst vom PTV-System der ITD 800 GC/MS-Ausrüstung zum SPI-Injektor des Saturn 2000-Gerätes übernommen worden war, konnte zu kürzeren Zeiten variiert werden, da aufgrund des weiteren Durchmessers des Liners (3,4 mm anstatt 1,0 mm) eine schnellere Trocknung der eingespritzten Lösungen angenommen werden konnte (siehe auch Kap. 4.2.5.6).

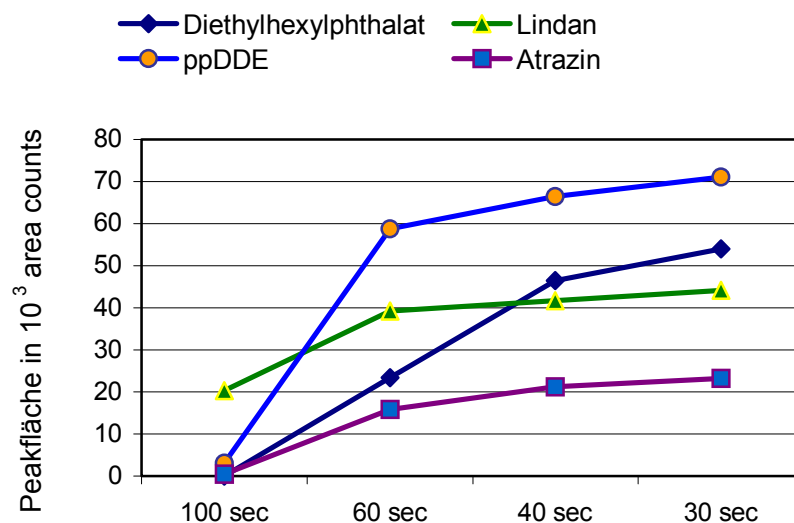


Abbildung 56: ansteigende Peakflächen bei kürzerer purge Time bis zu 30 Sekunden



Bei zu langen Purge-Zeiten wurden die Analyten anscheinend von der trockenen Fritte durch den Split mit abgeblasen, die Analytik funktioniert erst richtig bei erheblich kürzerer Abblaszeit. Unterhalb von 30 sec wurde keine weitere Steigerung des Response erwartet und dieses Ergebnis durch einen empirischen Versuch bestätigt.

Eine alternative Probenaufgabe mit Abblasen des Lösungsmittels über die Säule (mit geschlossenem Split und deutlich tieferer Injektortemperatur) wurde wegen der erheblich längeren Analysenzeit (hinzu käme noch die Abkühlzeit der Injektors) nicht befürwortet. Eine mögliche Erfüllung dieser Anforderung hätte apparativ durch Einsatz einer CO<sub>2</sub>-Kühlung erreicht werden können, wurde aber wegen des bereits betriebenen apparativen Aufwandes nicht durchgeführt

### ***4.3.2 Ausheiz-Zeit***

Es wurde geprüft, ob Reste im Injektor nach einer Injektion verblieben. Ein Ausheizen von 30 min bei geöffnetem Split war ausreichend, um alle evtl. auch an Matrixresten im Injektor adsorbierten Substanzen auszutreiben. Um die Gefahr von Memory-Effekten zu kontrollieren, wurden nach mehreren Injektionen von synthetischen Proben (Matrixextrakte plus Standard gemischt) mehrere Lösungsmittel-Blindwerte gemessen und festgestellt, dass keinerlei nachweisbare Reste von den gesuchten Substanzen im Injektor verbleiben.

## 4.4 Gaschromatographie

Das Temperaturprogramm für den GC-Säulenofen wurde bei relativ einfachen Standardbedingungen belassen, so wie sie z.B. für die GC von Pestiziden verwendet wurden. Es galt sowohl für die derivatisierte als auch die nicht derivatisierte Stoffgruppe.

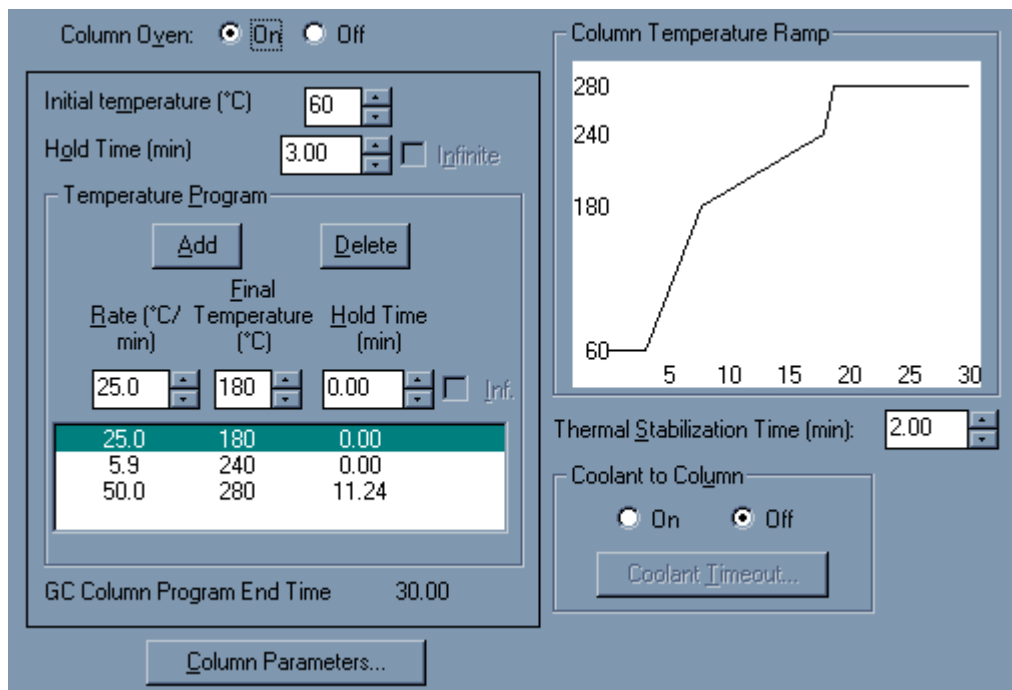
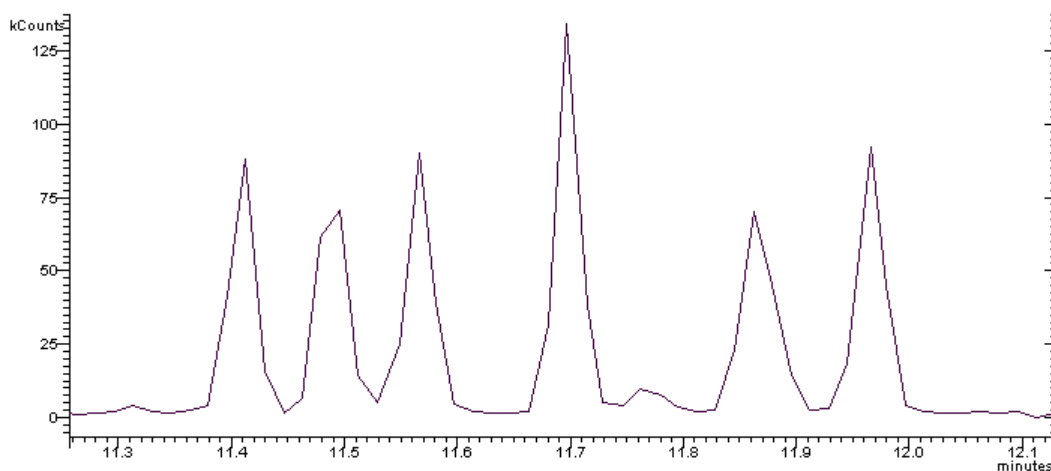


Abbildung 57: Bedingungen des GC-Ofens

(Siehe auch Kap. 3) Einem Anfangsplateau bei 60°C folgte eine Aufheizphase mit 25°C/min während der z.B. die Nonylphenol-Isomeren oder bei den underivatisierten Substanzen die Pestizide und Phthalate aufgetrennt werden. Einer langsamere Temperatursteigerung in dem Bereich von 180-240°C diente zur Trennung der Steroidhormone. Zur Verkürzung der Retentionszeit der spät eluierenden Komponenten wurde am Ende mit 50°C/min hochgeheizt. Die Säule wurde zum Schluss jeder Messung 30 min bei 280°C ausgeheizt.

## 4.5 MS/MS-Methodik

In Vorversuchen hatte sich die MS/MS Technik der SIS-Technik (Selected Ion Storage) und der Full-Scan-Messung in punkto Nachweisempfindlichkeit als überlegen erwiesen; Chromatogramme mit sehr geringen Konzentrationen gaben bei MS/MS noch ein gut erkennbares Signal, wobei die Peaks bei SIS und Full Scan im Rauschen verschwanden. (Zur Arbeitsweise siehe auch Kapitel 2.4 und 3.2)

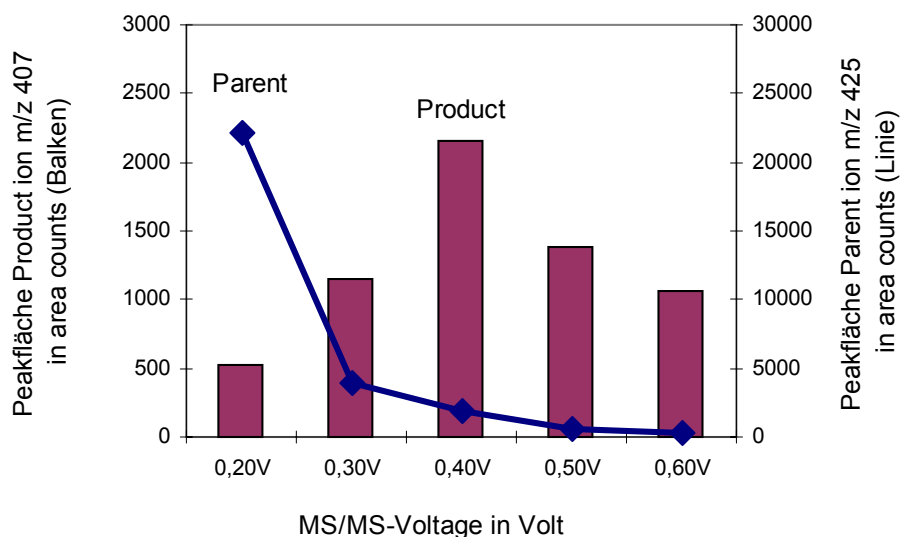


**Abbildung 58: Oberflächenwasserprobe mit nur 14 ng/l Nonylphenol, saubere Peaks auf der Tochterionenmasse 179 erkennbar**

Auch die sogenannte  $\mu$ SIS-Technik, die nach Firmenangaben besser sei, welche die genauere Ionenspeicherfunktion des MS/MS-Modus benutzt und ggf. eine ganz geringe MS-MS-Voltage anlegt, um Anteile des Untergrundes zu fragmentieren und somit zu entfernen (wobei das isolierte Ion des Analyten aufgrund höherer Stabilität erhalten bleiben soll), brachte keine signifikanten Vorteile.

### 4.5.1 Voltage

Die wichtigste zu optimierende Größe für Messungen im MS/MS-Modus ist die Amplitude (in Volt) der an der Ionenfalle angelegten Wellenformen, welche die zu fragmentierenden Ionen anregen. Nach Variation dieser MS/MS-Voltage von 0,2 bis 0,6 Volt (siehe unten am Beispiel Ethinylestradiol) wurden die in den Maxima der erzeugten Produkt-Ion-Peakflächen liegenden Werte ermittelt. Die resonante Arbeitsweise wurde bevorzugt, da einige Ionen bei non-resonanter Anregung keine ausreichende Fragmentierung zeigten. Der Response der Produkt-Ionen in Abhängigkeit von der MS/MS-Voltage kann verschieden ausfallen, je nachdem ob  $M^+$  oder ein Fragment des Originalspektrums als Parent Ion eingesetzt wurde und wie stabil das entsprechende Ion ist. Es wurden bei Messungen im MS/MS-Modus in Segmente aufgeteilte Chromatogramme erhalten.



**Abbildung 59: Effektivität der Fragmentierung in Abhängigkeit von der MS/MS-Voltage**

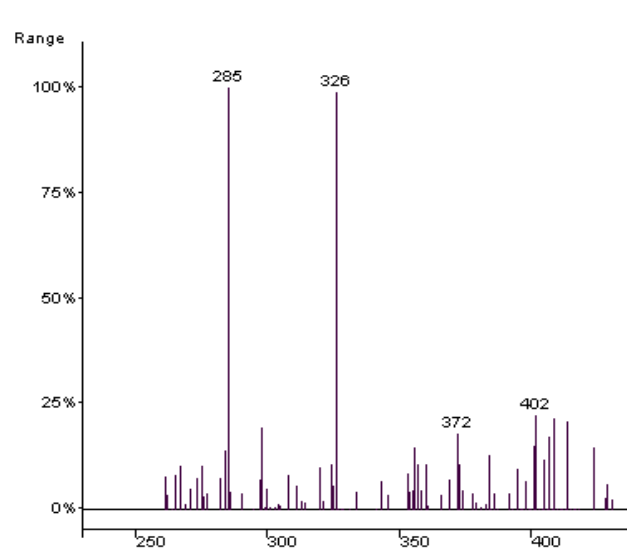
Es war eine klare Abhängigkeit der Ausbeute von Produkt-Ionen von der angelegten Voltage zu erkennen. Diese Voltage musste allerdings bei jedem Tuning des Massenspektrometers überprüft und ggf. neu optimiert werden, da sie sich um ca. 10-20% ändern kann.

Es ergaben sich folgende Werte:

**Tabelle 12: MS/MS-Daten der einzelnen Analyten**

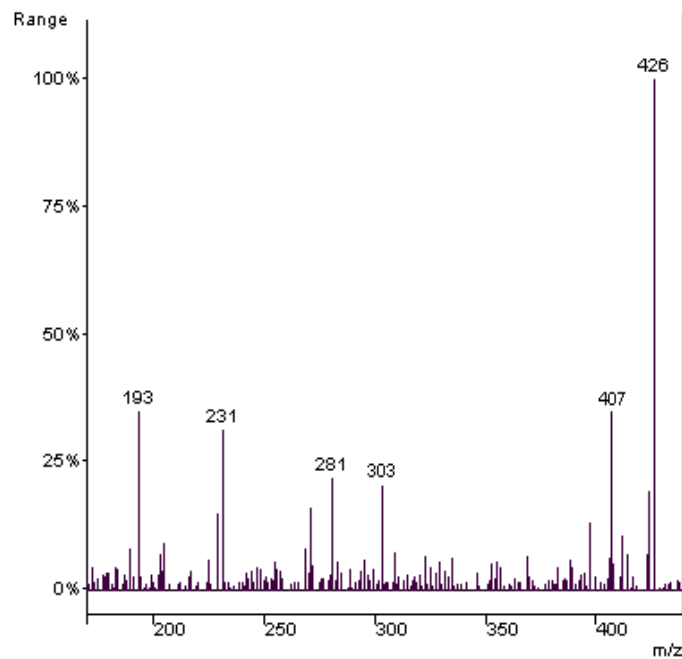
Substanz	Parent Ion (m/z)	MS/MS-Voltage (V)	Product Ion (m/z)
techn. Octylphenol	207	0,35	179
techn. Nonylphenol	221	0,30	179
n-Nonylphenol	179	0,25	73
Bisphenol A	357	0,40	191
Hexestrol	207	0,25	179
Diethylstilbestrol	412	0,35	383
Androsteron	347	0,25	271
Estron	342	0,33	257
Estradiol	416	0,33	326
2-Fluorestradiol	434	0,35	344
Mestranol	367	0,40	193
Ethinylestradiol	425	0,40	407
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -Ethinylestradiol	427	0,40	409
Estriol	414	0,25	324

Zur Auswertung und Quantifizierung muss nicht unbedingt ein einziges Produkt-Ion verwendet werden; es sind in dieser Tabelle nur die Haupt-Produkt-Ionen aufgeführt. Bei schwachem Response oder mehreren starken Ionen können auch bis zu vier Ionen addiert werden.



**Abbildung 60: MS/MS-Spektrum von Estradiol**

Am Beispiel des Estradiol liegt es nahe, die Summe von 326+285 zur Auswertung zu verwenden. Das Verhältnis der beiden Ionen kann schwanken, je nach Tuning, Konzentration der eingespritzten Lösung, und sogar auch nach Tagesform des Massenspektrometers ergaben sich Unterschiede im Response der Ionen. Die Bildung der Summe bewirkt eine Glättung der Ergebnisse.



**Abbildung 61: MS/MS-Spektrum von Ethinylestradiol**

Beim Produktspektrum von Ethinylestradiol dagegen trat eine Vielzahl von Ionen auf, die alle einen relativ schwachen Response zeigten. Anscheinend ergab sich ein erheblicher Verlust an kleinen Fragmenten in den unteren Massebereich hinein (der gar nicht mehr mit aufgenommen wurde, da die ganz kleinen Ionen von geringer Spezifität sind), wie man an dem hohen  $^{13}\text{C}$ -Satelliten mit m/z 426 erkennen kann. Dieser Isotopen-Satellit blieb stehen, da zwar ein gewisses Massenfenster isoliert wurde, aber ganz genau nur eine Masse fragmentiert wurde. Die Nachbar-Ionen der zu fragmentierenden Parent Mass blieben generell erhalten. In diesem Fall war man also mehr oder weniger gezwungen, aufgrund von schwacher Intensität und Vielzahl von Tochterionen die Summe von m/z 407+303+231+193 für die Auswertung zu bilden.

## 4.5.2 Scanrate - Peakform

Bei einer schnellen Scanrate zeigte sich bei einigen Substanzen, z. B. Mestranol, eine eigenartige Peakform. Scheinbar lief entweder die Ionenspeicherung oder die MS/MS-Fragmentierung nicht ganz reibungslos.

Diese Eigenart ließ sich durch Veränderung der Voltage oder des Isolation Window nicht beeinflussen. Daraufhin wurde die Scanrate auf beispielsweise 1 Scan / 2 sec herabgesetzt, was in einer stärkeren Glättung der Werte und einer vernünftigen Peakform resultierte.

## 4.5.3 Segment Time

Da für ein neues MS/MS-Segment mit anderen Bedingungen als das davor gemessene Segment eine gewisse Umschalt-Zeit benötigt wurde und von GC-Seite her eine Variation der Retentionszeit von ca.  $\pm 5$  sec bestand, mussten die Zeitfenster für die Segmente z.T. sehr genau kalkuliert werden.

	Segment Description	Start (min.)	End (min.)	Low Mass (m/z)	High Mass (m/z)	Ionization Mode	Ion Preparation
1	FIL/MUL DELAY	0,00	10,30	40	650	None	None
2	op msms	10,30	11,25	150	220	EI Auto	MS/MS
3	np msms	11,25	12,10	150	230	EI Auto	MS/MS
4	nnp+nop msms	12,10	13,75	65	190	EI Auto	MS/MS
5	npss FULL	13,75	15,50	75	290	EI Auto	MS/MS
6	full	15,50	17,00	75	500	None	None
7	bpa	17,00	17,70	120	380	EI Auto	MS/MS
8	diethylstilbestr+hex	17,70	19,70	145	430	EI Auto	MRM
9	androsteron	19,70	21,00	250	370	EI Auto	MS/MS
10	estron	21,00	21,65	230	360	EI Auto	MS/MS
11	estradiol+2fe	21,65	22,20	260	440	EI Auto	MRM
12	mestranol	22,20	22,80	170	390	EI Auto	MS/MS
13	ethinylestradiol	22,80	23,40	170	440	EI Auto	MS/MS
14	estriol	23,40	25,50	250	430	EI Auto	MS/MS
15	full scan schluß	25,50	27,00	75	450	None	None

Abbildung 59: Acquisitionstabelle mit den grundlegenden Messparametern der einzelnen Segmente

#### 4.5.4 Mass Range

Der Massenbereich eines jeden Acquisitionsssegmentes musste natürlich sowohl Parent- als auch Product Ions erfassen. Erfahrungsgemäß war es sinnvoll, diesen Bereich nicht allzu weit zu wählen, da ansonsten die Ionisationszeit sinkt, weil Ionen aus dem unteren Massenbereich mitgespeichert werden, um später dann doch wieder aus der Ion Trap herausgeworfen zu werden. Gerade im unteren Massenbereich (ca. unterhalb  $m/z$  150) fand sich (Full-Scan) eine Menge Untergrund. Es war sinnvoll, auf kleinere, weniger spezifische Ionen des Produkt-Ionenspektrums zu verzichten, den Massenbereich einzuschränken und gezielt bestimmte Ionen in einem gewählten Massenbereich zu sammeln (siehe Abbildung oben bei Segment Time).

#### 4.5.5 Probleme

Auf die Komplikationen mit der Umschalt-Zeit zwischen den Segmenten wurde unter Kap. 4.5.3 hingewiesen, ebenfalls auf den unglücklichen Sonderfall von 2-Hydroxy-estron, wobei sowohl Retentionszeit, Parent Mass als auch Product Ion mit einem Silikon-Peak aus dem Untergrund übereinstimmten.

$^{13}\text{C}_2$ -EED wurde zunächst als interner Standard verwendet, musste aber verworfen werden, da bei genauerer Betrachtung folgendes Problem erkennbar war: Die MS/MS-Fragmentierung lieferte aus dem Parent Ion 427 das Haupt-Product Ion 409. Dieses entstand jedoch (zwar in geringer Intensität, aber trotzdem ein Störfaktor ) ebenfalls aus dem nicht isotoopenmarkierten EED als eines der Tochterionen.

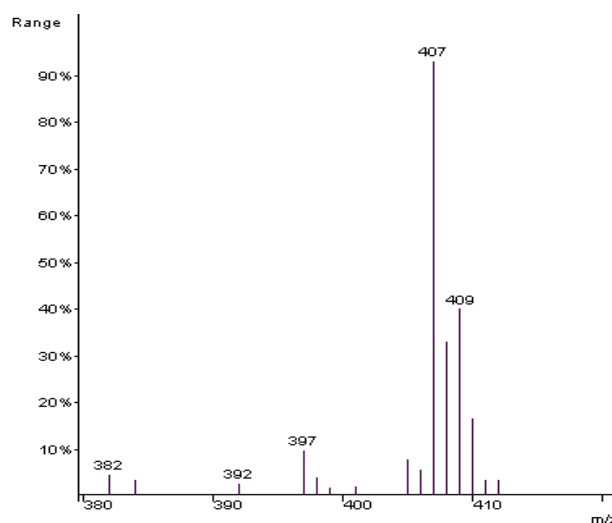


Abbildung 60: Massenbereich um  $m/z$  407 aus dem MS/MS-Spektrum von Ethinylestradiol



Somit würden in den Proben mit einem Gehalt von EED alle mit dem internen Standard quantifizierten Ergebnisse verfälscht. Hinzu kam, dass der Response für EED sowieso relativ schwach war: Das Tochtterspektrum zeigte eine Vielzahl von Massen mit geringer Intensität. Da war es von Nachteil, dass im gleichen Acquisitiomssegment (Retentionszeit-Unterschied lediglich 2-3 sec) noch eine weitere Substanz in Form des ISTD gemessen werden musste und dadurch wertvolle Empfindlichkeit verloren ging. Als Konsequenz wurde mit 2-Fluor-Estradiol (2-FE) ein neuer ISTD gewählt; diese Substanz erscheint in der Natur nicht und zeigt ähnliche GC- und MS-Eigenschaften wie die damit zu quantifizierenden Steroidhormone. 2-FE eluiert zwar kurz nach EDI, dies schlägt aber kaum als Nachteil zu Buche, weil EDI ein sehr klares Tochtterspektrum mit zwei sehr intensiven Massen bei gleichzeitig hohem Response besitzt.

Geräteseitig waren auch einige Probleme zu vermerken: Aus nicht geklärter Ursache trat des öfteren eine Massenschiebung auf. Anstatt der korrekten Parent und auch Product Ions traten Massen auf, die um eine Einheit nach oben verschoben waren. Teilweise war dieser Effekt durch ein Tuning zu beheben. Es handelte sich hierbei nicht um einen CI-Effekt (durch Wasserspuren in der Ion Trap werden Protonen angelagert, deswegen bildet sich M+1, zum Teil auch Fragment+1), denn durch sauberes Arbeiten wurde Wasser ausgeschlossen. Der Leak Check ergab niedrige Wasserwerte. Um Space Charging (durch Überladung der Ion Trap können nicht alle Ionen rechtzeitig ausgeworfen werden und fliegen z.B. eine Masse zu spät heraus auf den SEV) handelte es sich auch nicht, denn der Effekt trat sowohl bei hohen Konzentrationen als auch bei hohen Verdünnungen auf. Gelegentlich trat der eigenartige Effekt auf, dass dieses Problem innerhalb eines Tages zwar wiederholbar bestand, doch am nächsten oder übernächstentag nicht mehr auftrat. Im ungünstigsten Falle musste man sich damit abhelfen, die Auswertung auf einer Summe vorzunehmen, also das betreffende Quantifizierungssion plus das Ion eine Masse höher zu verwenden.

Viel Zeit gekostet hat ein Geräteproblem, das mit einem unkontrollierbar aus dem Lot laufendem Integrator Zero-Wert begann. Die Massenspektren besaßen auf jeder Masse eine gewisse Grundintensität, alle Massen waren in jedem Spektrum (Full Scan und MS/MS) vorhanden. Dadurch waren die Ionisationszeiten verfälscht und logischerweise fehlerhaft viel zu kurz, sodass die Empfindlichkeit des Gerätes stark darunter litt. Zunächst konnte der Fehler (symptomatisch, wie sich später herausstellte) durch Einstellungen an Potentiometern auf den Elektronik-Platinen (Boards) des Gerätes nach telefonischer Anweisung der Firmentechniker des MS ausgeglichen werden, doch nach und nach traten fehlerhafte Readings (interne elektronische Regelwerte) bei einer Vielzahl von Parametern auf, so z.B. bei Ion Trap Temperature, Multiplier Voltage, Transfer Line Temperature, axial modulation etc. Im Endeffekt waren keine Messungen mehr möglich und das Gerät musste in Reparatur geschickt werden, wo mehrere elektronische Bauteile getauscht wurden.

Zu diesem Thema muss leider gesagt werden, dass auch auf dem Gebiet der GC-MS die Regel gilt:

*„Neue Technik – Neue Fehler“!*

## 4.6 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Keines der in der Literatur [FREHSE 1991; HÄDRICH 1999; DIN 32645 1994; VOGELGESANG 1987] angeführten Konzepte zur Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze (NG und BG) ergab m.E. durchgehend wirklich sinnvolle und zufriedenstellende Ergebnisse. Der Grund liegt darin, dass alle diese Konzepte nicht den qualitativen Aspekt der GC/MS integrieren. Es ist sinnvoll, bei der Gaschromatographie mit einem FID oder der HPLC mit einem UV-Detektor Entscheidungsgrenzen festzulegen bei welchen definiert wird, ein Messwert unterscheidet sich mit einer bestimmten Signifikanz vom Rauschen des Leerwerts oder die Wahrscheinlichkeit für den Fehler 2. Art (falsch-negativ) sinke unter ein gewisses Level, und somit sei das dazugehörige Ergebnis mit einem Intervall ( $BG > x > NG$ ) oder einem Zahlenwert ( $x > BG$ ) anzugeben. Doch bei der GC/MS liegt in dem Massenspektrum, das zu einem Signal (Peakfläche) gehört, ein Ergebnis vor, das vom Auswertenden qualitativ beurteilt werden muss. Es wäre fahrlässig, sich lediglich an vorher festgelegten NG und BG als Entscheidungskriterien festzuhalten und nicht das Massenspektrum zu einem Messergebnis kritisch zu betrachten und zu beurteilen.

Folgendes ist weiterhin dabei zu bedenken: Streng genommen sind die NG und BG abhängig von der Zusammensetzung der Probe. Ein geringer Gehalt neben hoher Matrixbelastung wird mit höherer Wahrscheinlichkeit gar nicht detektiert, das Signal geht im höheren Rauschen unter. Oberflächenwasser- und auch Trinkwasserproben sind kein homogenes Probenkontingent. Hinzu kommt, dass erfahrungsgemäß die Empfindlichkeit eines Ion-Trap-deutlich von dessen Zustand abhängig ist (Warmlaufen, Drift, Tuning, Sauberkeit der Ion Trap). Zudem sammeln sich bei längeren Messserien schwerflüchtige Matrixbestandteile im Liner an, die sich im Laufe der Zeit bei Temperaturbelastung zersetzen und den Untergrund im Chromatogramm erhöhen bzw. die Ionisationszeit verkürzen

Diese Fakten relativieren die Aussagekraft von NG und BG. Genau betrachtet besitzt jede Probe andere NG und BG als die nächste Probe im Rack des Autosamplers. Die gleiche Probe, an verschiedenen Tagen gemessen, besitzt ebenfalls verschiedene NG und BG. Dennoch sollen sie als grob orientierende Eckdaten des analytischen Verfahrens angegeben werden.

Es wurde ein Kompromiss zwischen dem direkten und dem indirekten Verfahren nach DIN 32645 sowie praktischen Aspekten gewählt. Es wurden sowohl eine Kalibrationsgerade als auch Leerwerte gemessen. Wo messbare Signale im Blind- bzw. Leerwert auftraten (also wirkliche eine Kontamination mit einem Analyt vorlag), wurden sie nach DIN zur Berechnung der NG verwendet, für die BG wurden in jedem Falle die Kalibrationsdaten einberechnet.

Die Nachweisgrenzen wurden bei Vorhandensein von Blind-/Leerwerten folgendermaßen berechnet:

$$X_{NG} = S_L/b \cdot t_{f;\alpha} \cdot \sqrt{(1/m + 1/n)}$$

Wobei galt:

- $S_L$  Standardabweichung der Messsignale der Leerwerte
- $b$  Steigung der Kalibriergeraden
- $t_{f;\alpha}$  Quantil der t-Verteilung
- $m$  Anzahl der Messungen für einen Analysenwert
- $n$  Anzahl der Messungen für einen Leerwert
- $f$   $n-2$  Freiheitsgrade
- $\alpha$  Irrtumswahrscheinlichkeit, hier. 2%

traten keine Blind-/Leerwerte auf, galt die Berechnung über die Kalibrationsgerade:

$$X_{NG} = s_{X0} \cdot t_{f;\alpha} \cdot \sqrt{(1/m + 1/n + x_{mw}^2/Q_x)}$$

Wobei zusätzlich galt:

- $s_{X0}$  Verfahrensstandardabweichung
- $t_{f;\alpha}$  Quantil der t-Verteilung
- $x_{mw}$  Arithmetisches Mittel aller Gehalte der Kalibrierlösungen
- $Q_x$  Summe der Abweichungsquadrate bei der Kalibrierung

Die Bestimmungsgrenzen wurden über die Kalibrationsdaten errechnet:

$$X_{BG} = k \cdot s_{X0} \cdot t_{f;\alpha} \cdot \sqrt{(1/m + 1/n + (k \cdot x_{NG} - x_{mw})^2/Q_x)}$$

mit der Setzung von

$k$  bzw.  $1/k$  relative Ergebnisunsicherheit  $k=3$  oder  $k=2$

und der Näherung

$$x_{BG} = k \cdot x_{NG}$$

Die erhaltenen NG und BG wurden dann auf den nächsten glatten Wert der zur Eichung verwendeten Standardkonzentrationen gerundet. Als Faustregel konnte gelten: Die NG war meist das zweitunterste Kalibrationslevel mit gut erkennbarem Massenspektrum, die BG meist doppelt so hoch wie die NG und so das drittunterste Kalibrationslevel mit gut erkennbarem Massenspektrum. (Ähnliche Verfahrensweise: [TERNES 1999])

In der Praxis gelten diese Werte mit Einschränkungen, denn wenn in einer stark matrixhaltigen Probe ein Ergebnis für eine Substanz zwar über der BG lag, jedoch das Massenspektrum aufgrund Verdeckung schlecht erkennbar war, wurde „<NG“ als Ergebnis angegeben, also praktisch die NG stark angehoben. [KEMPTER 1998] berichtete ebenfalls von NG, die von der Matrix abhängig waren.

**Tabelle 13: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der nicht derivatisierten Substanzen**

Substanz	NG (ng/l)	BG (ng/l)
Atrazin	1	2,5
$\alpha$ -Endosulfan	5	10
$\beta$ -Endosulfan	5	10
Lindan	2,5	5
Bischlorphenylsulfon	5	10
Diethylphthalat	10	20
Benzylbutylphthalat	10	20
Dibutylphthalat	50	100
Diethylhexylphthalat	100	200
p, p'-DDE	0,5	1
o, p'-DDT	10	25
p, p'-DDT	2,5	5
PCB 28	0,5	1
PCB 52	0,5	1
PCB 101	0,25	0,5
PCB 138	0,25	0,5
PCB 153	0,5	1
PCB 180	0,1	0,25
PCB 194	0,5	1

**Tabelle 14: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der derivatisierten Substanzen**

Substanz	NG (ng/l)	BG (ng/l)
techn. Octylphenol	2,5	5
techn. Nonylphenol	5	10
Bisphenol A	1	2
Diethylstilbestrol	0,5	1
Hexestrol	1	2
Androsteron	0,5	1
Estron	0,25	0,5
Estradiol	0,5	1
Mestranol	1	1,5
Ethinylestradiol	1	1,5

Zum Vergleich: [BOLZ 2000] erreichte mit einer Nachweismethode für phenolische Xenoestrogene mittels Anreicherung an einer RP-18 / Polymer- Kombinationsphase und Methylierung mit Phenyl-Trimethylammoniumhydroxid Bestimmungsgrenzen von 50 ng/l für BPA, 20 ng/l für i-OP und 20 ng für techn. NP. [SCHLETT 1996] konnte Steroidhormone mittels SPE und GC/MS bis zu 10 ng/l in Trink- und Oberflächenwasser nachweisen. [TERNES 1999] senkte die NG seines ebenfalls auf SPE und GC/MSMS basierenden Verfahrens durch clean-up der Abwasserextrakte auf 1 ng/l für die Steroidhormone. Dank umfangreicher Reinigungs- und Sicherheitsmaßnahmen zur Minimierung von ubiquitären Kontaminationen bei der GC/MS-Analytik lagen bei [BRÜLL 2000] die NG der meisten Phthalate bei 20-30 ng/l. [FREY 2000] optimierte seine auf saurer flüssig/flüssig-Extraktion mit Toluol und auf GC/MS (SIM-Modus) basierende Meßmethode für die Alkylphenole und erzielte Bestimmungsgrenzen von 5-20 ng/l, je nach Matrix. Im gleichen Bereich lag [KROL 2000] mit einer HPLC-MS-Methode. [SPENGLER 2000] arbeitete mit einem clean-up-Schritt für die Analytik von Steroidhormonen, Phytoestrogenen, Phthalaten,  $\alpha$ -Endosulfan und Bisphenol A in Abwasser und Kläranlagenauslauf und erreichte NG im unteren ng/l-Bereich. Hochauflösende MS steigerte die Messempfindlichkeit in der GC-MS-Analytik erheblich, sodass bei [KALBFUS 1995] die NG für Ethinylestradiol bei 0,02 ng/l lag. Die Bestimmungsgrenzen für Pestizide liegen üblicherweise im Bereich von 25-50 ng/l [FÄRBER 1993]. In Berliner Oberflächenwässern lagen die BG für BPA mit 2 ng/l, BBP und DBP mit 20 ng/l gleich wie die hier ermittelten BG, im Falle von 30 ng/l für DEHP niedriger, bei OP mit 30 ng/l und NP mit 80 ng/l deutlich höher [PILZ 1999].

## 4.7 Vergleich mit anderen analytischen Prinzipien, Diskussion

Bei der Analytik der Steroidhormone muss unterstrichen werden, dass mit dem vorgestellten Verfahren nur die frei vorliegenden Substanzen, nicht jedoch der Anteil der konjugiert vorliegenden Hormone bestimmt werden konnte. Durch die durch menschliche Metabolisierung eingefügten Glucuronat- und Sulfat-Gruppen sind diese zu polar für die benutzte Festphasenextraktion. Nach [TAUBERT 1995] werden z. B. nur ca. 5% von Ethinylestradiol unverändert, der Rest als Konjugate über Urin und Faeces ausgeschieden. Die konjugierten Steroidhormone sind zunächst von geringerem Interesse, da sie in Ihrer Exkretionsform wenig bioverfügbar sind, sie werden jedoch mikrobiell in der Kläranlage wieder zu den freien Hormonen aufgespalten. Ob diese Spaltung in der Kläranlage quantitativ vonstatten geht, wird von keinem der Autoren bestimmt, einzig [TERNES 1999] sicherte seine Analytik durch Batch-Versuche ab.

Eine häufig verwendete Methode zur Bestimmung von Steroidhormonen in Blut und Urin, aber auch Serumspiegeln von Medikamenten ist der ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay). Die Durchführung ist relativ einfach, außer einem Photometer werden keine aufwendigen Messgeräte oder Techniken verwendet, die Besonderheit der Methode und die preisbestimmende Komponente sind die Immunreagenzien. Auch im Bereich der endokrin wirksamen Substanzen wird diese Technik entweder zum Nachweis der EWS, zum Nachweis von Vitellogenin oder als Anreicherungsschritt angewendet [CHING-HUA 2000; PALMER 1995, 1999; CASTILLO 1998]. Für die angestrebte Analytik der betreffenden Substanzen in Wasserproben ist diese Methode m.E. nicht geeignet, da die Konzentrationen um 2-3 Zehnerpotenzen geringer liegen als im normalen Arbeitsbereich eines ELISA's, der im  $\mu\text{g/l}$ -Bereich genutzt wird. Beispielsweise liegt die Nachweisgrenze eines Immunoassays mit Fluoreszenzdetektion für Estron, Estradiol und Ethinylestradiol bei  $0,2 \mu\text{g/l}$  [REDER 1999]. Allenfalls für Phthalate oder eventuell Nonylphenol in extrem belasteten Wässern wäre es prinzipiell möglich, einen ELISA einzusetzen. Zudem wird mit einem ELISA auch in der Regel nur eine Substanz bestimmt, sodass eine ganze Testbatterie nötig wäre, um die Substanzpalette der in dieser Arbeit vorgestellten Multimethode abzudecken.

In der älteren Literatur [RURAINSKI 1977] wurde als weitere immunchemische Methode der RIA eingesetzt, aufgrund von Kreuzreaktivität der Reagenzien kam der Autor jedoch zu unrealistisch hohen Ergebnissen.

Die HPLC (high performance liquid chromatography), kombiniert mit den üblichen Detektoren wie UV/VIS oder Diodenarray erreicht nicht die erforderliche Empfindlichkeit zur Bestimmung der endokrin wirksamen Substanzen in Wasser. Prinzipiell zur gleichzeitigen Analytik von mehreren Substanzen geeignet, wird die notwendige Sensitivität theoretisch mit einem Fluoreszenzdetektor bewerkstelligt, doch nicht alle der zu bestimmenden Stoffe besitzen die dazu wesentliche Eigenschaft der Fluoreszenz. Eine höhere Kategorie der Analytik wird durch Verwendung des passenden

Detektors in der HPLC/MS-Kopplung betreten. [ ] Diese Methodik hat neben der hohen Empfindlichkeit und der Multikomponentenbestimmung den Vorteil (gegenüber der GC/MS), daß keine Flüchtigkeit und damit keine Derivatisierung der Analyten notwendig ist. Als Optimum wäre die HPLC-MS/MS zu sehen.

Die normale GC/MS ohne einen zweiten Fragmentierungsschritt hat das prinzipielle Problem der Detektion von Spurenkonzentrationen im spektralen Rauschen von Matrixkomponenten aus der Probe und der Verunreinigungen, die zwangsläufig durch Derivatisierungsreagenzien (Ausnahme: Diazomethan) in das System eingetragen werden. Bei vielen Analyten ist es unabdingbar, durch Derivatisierung polarer Funktionen die Flüchtigkeit zu erhöhen- Die GC-MS/MS-Technik dagegen bietet die höchste Spezifität und ein verbessertes Signal/Rauschverhältnis durch Unterdrückung oder Elimination von Signalen, die nicht zu den betreffenden Analyten gehören. Dadurch werden verbesserte Nachweisgrenzen erreicht. Der automatisierte vorgeschaltete Derivatisierungsschritt erspart Arbeit, vermindert Fehlerquellen und steht im Trend der aktuellen Entwicklung zur Automatisierung [HANKEMEIER 1998; LERCH 2000; WERRES 2000; BRINKMANN 2000].

## 5 Messungen von Realproben, Diskussion

### 5.1 Trinkwasser / Wasserversorgung

Verschiedene Wässer eines Wasserversorgungsbetriebes (Oberflächenwasser und Grundwasser) wurden beprobt und mit der dargestellten Analytik untersucht, dabei wurden geringe Konzentrationen an endokrin wirksamen Substanzen gefunden. Der Einfachheit halber wurden die Isomeren bei Octylphenol und Diethylstilbestrol zusammengefasst.

Von den biologisch aktivsten Substanzen, den Steroidhormonen, lagen alle Werte unterhalb der Nachweisgrenzen. (Siehe Kap. 1 zu Analysenwerten aus der Literatur) Die Alkylphenole waren mit als gering einzuschätzenden Konzentrationen von 6 ng/l (Octylphenol) und 30 ng/l (Nonylphenol) anzutreffen, wobei sich die Trinkwässer aus Grund- und Oberflächenwasser nicht signifikant unterschieden. Der Vergleich mit Oberflächenwasser aus Bächen (siehe 5.2) zeigt dort noch niedrigere Konzentrationen, so dass es nicht ausgeschlossen erscheint, dass Nonylphenol aus Materialien in Kontakt mit Wasser während Aufbereitung und Leitung durch Rohrsysteme in die Wasserphase übergehen könnte. Auch Bisphenol A wurde in allen drei Wässern gefunden. Die Konzentration lag in der Mischung der beiden ersten Wässer bedeutend höherer als in den einzelnen Wässern. Dies ist ebenfalls ein Hinweis darauf, dass aus Rohrleitungen, Fugendichtungsmassen oder sonstigen Materialien, die mit dem Wasser nach den beiden ersten Probenahmepunkten in Kontakt kommen, Bisphenol A an das Wasser abgegeben wurde. Auf [TAKADA 1999; THEOBALD 1999; RICHARD 1999; PETERSEN 2000; FRITSCH 1999; PFEIFFER 1997; BÖHME 1998; MOCK 1999; RAUTER 1999; BIEDERMANN 2000] wird verwiesen: auch aus Bedarfsgegenständen wie Plastiktellern aus Polycarbonat und aus Konservendosen-Innenbeschichtungen werden nicht unerhebliche Mengen an Bisphenol A oder BPA-Diglycidether (BADGE) an Lebensmittel abgegeben. Dibutylphthalat und Diethylhexylphthalat als ubiquitär anzusehende Umweltkontaminanten [FURTMANN 1994; PFORDT 1999; BRÜLL 2000] waren mit mehreren 100 ng/l in allen drei Wässern anzutreffen. Während sich für das im unteren ng/l-Bereich vorhandene Atrazin und die im Spurenbereich auftretenden PCB 138 und 153 ein Mischungsverhältnis von 2:1 der beiden Wässer schätzen ließ, gelang diese Überschlagsrechnung für die Phthalate und für PCB 180 nicht. Es stellte sich weiterhin die Frage, woher die sichtbaren Spuren von Diethylstilbestrol im Mischwasser stammten, weil die Substanz in den beiden Ausgangswässern unterhalb der Nachweisgrenze lag. Der Nachweis von DES war sicher, das Massenspektrum eindeutig. (Zur Nicht-Quantifizierbarkeit siehe Kap 5.) Eine Erklärung sind die unterschiedlichen Probenahmezeitpunkte, die auf variierende Gehalte im Wasser schließen lassen würden, möglicherweise erschwerten aber auch statistische Schwankungen bei der Wiederfindung mit der Festphasenextraktion diese Mischungsberechnung; eine Kontamination an einzelnen PCB-Isomeren ist unwahrscheinlich.



Zu vergleichbaren Messergebnissen von EWS in Trinkwasser kommen [WEGENER 2000; WUTTKE 1999; FENT 2000]. Zur Beurteilung dieser Messwerte siehe Kap 6.

**Tabelle 15: endokrin wirksame Substanzen  
in den Wässern eines Wasserversorgungsbetriebes, eigene Untersuchungen**

Messung ng/l	TW (GW)	TW (OFW)	TW- Mix
Atrazin	17,9	5,8	14,0
a-Endosulfan	<NG	<NG	<NG
b-Endosulfan	<NG	<NG	<NG
Lindan	<NG	<NG	<NG
Bischlorphenylsulfon	<NG	<NG	<NG
Diethylphthalat	<BG	21,1	23,1
Benzylbutylphthalat	26,1	26,4	28,0
Dibutylphthalat	375	247	198
Diethylhexylphthalat	572	476	684
pp-DDE	<BG	<NG	<BG
op-DDT	<NG	<NG	<NG
pp-DDT	<NG	<NG	<NG
PCB 28	<NG	<NG	<NG
PCB 52	<NG	<NG	<NG
PCB 101	<NG	<NG	<NG
PCB 138	<NG	3,5	1,3
PCB 153	1,5	4,0	2,0
PCB 180	<NG	<NG	1,2
PCB 194	<NG	<NG	<NG
Techn. Octylphenol	5,8	<BG	6,1
Techn. Nonylphenol	33,9	30,5	36,1
Bisphenol A	33,2	3,9	125
Diethylstilbestrol	<NG	<NG	Spur
Hexestrol	<NG	<NG	<NG
Androsteron	<NG	<NG	<NG
Estron	<NG	<NG	<NG
Estradiol	<NG	<NG	<NG
Mestranol	<NG	<NG	<NG
Ethinylestradiol	<NG	<NG	<NG

## 5.2 Oberflächenwasser

Verschiedene Fließgewässer aus Südwestdeutschland wurden im Herbst 1998 auf den Gehalt an endokrin wirksamen Verbindungen untersucht (Proben und Abbildungen freundlicherweise überlassen von H. Hollert, Zoologisches Institut I der Universität Heidelberg, Arbeitsgruppe Aquatische Toxikologie). Die genauen geologischen Einzelheiten der Standorte sind bei [HOLLERT 2001] zu finden.

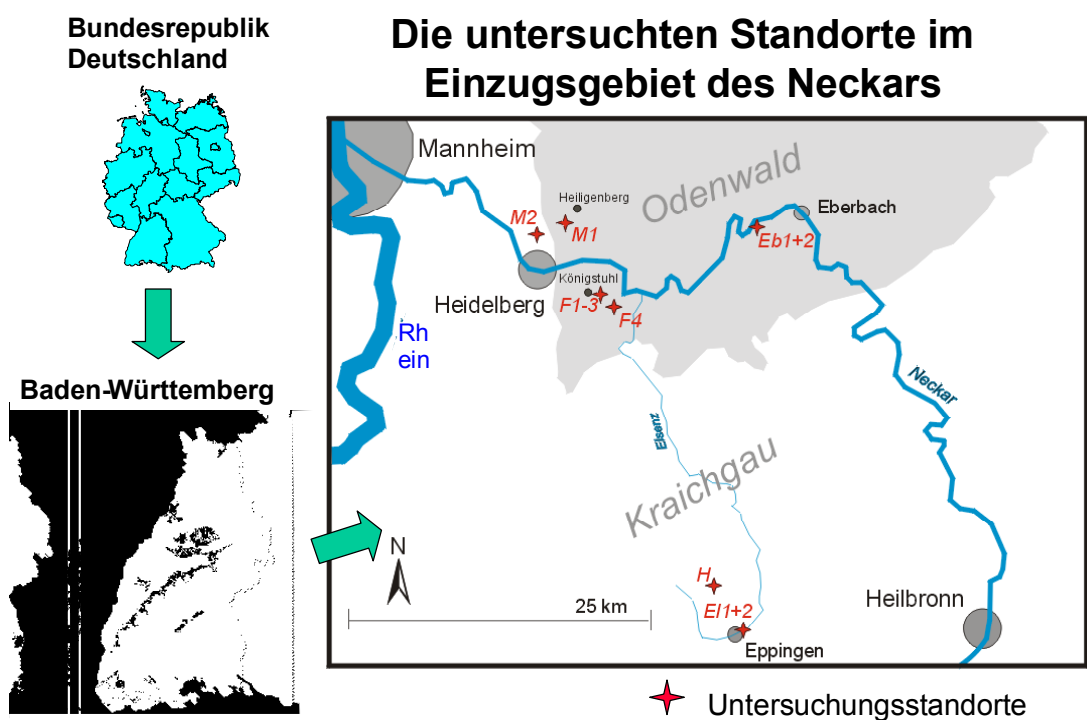


Abbildung 64: Lage der Probenahmepunkte

Die Abkürzungen bedeuten:

- F Forellenbach
- El Elsenz
- Eb Eberbach Flachwasserzone
- M Mühlbach
- H Hilsbach
- BW Blindwert (Leitungswasser Heidelberg)

Der Forellenbach entspringt mehreren Quellsümpfen im Südosten des Königstuhls und wurde an vier verschiedenen Stellen beprobt: F1 ist ein stark kontaminierter Wasserabschnitt hinter der Einleitung einer Kläranlage mit einem hohen Anteil an Klinikabwässern. F2 ist als zweiter Quellbach die dazugehörige Referenzstelle ohne Belastung durch Kläranlagenauslauf; aus F2 wird Trinkwasser gewonnen und die Entnahmestelle befindet sich unterhalb einer Wasseraufbereitungsanlage von der keine nennenswerten Kontaminationen zu erwarten sind. F3 und F4 bieten laufabwärts die Gelegenheit, eventuelle Reinigungs- oder Verdünnungseffekte zu zeigen. Laufabwärts von F4 erreicht der Forellenbach die Ortschaft Waldhilsbach. Dort fließt er verdolt bis er als Hilsbach hinter der Ortschaft wieder naturnah verläuft und nach 1-1,5 km in die Elsenz mündet.

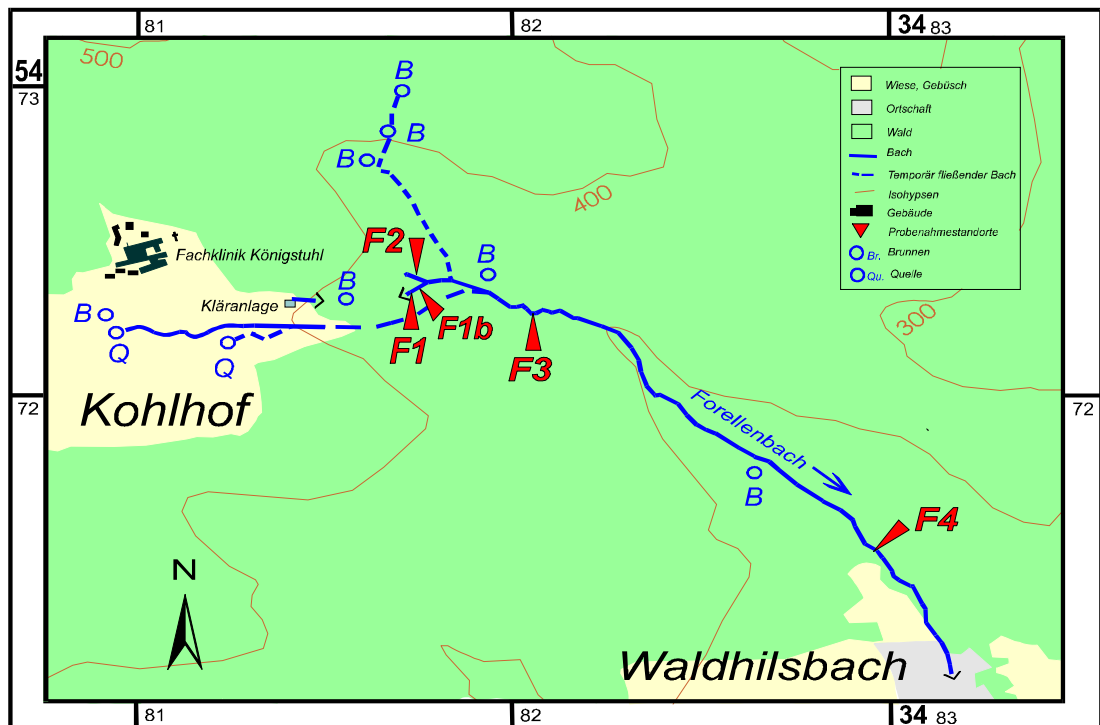


Abbildung 61: Karte der Probenahmepunkte Forellenbach

Die Elsenz als Nebenfluss des Neckars wurde mit zwei Probenstellen hinter dem Zusammenfluss mit dem Hilsbach und nach Durchqueren des Stadtgebietes von Eppingen einmal vor und einmal nach einer Kläranlage beprobt. Der Hilsbach dient hier als (durch landwirtschaftliche Nutzung beeinflusste) Referenzprobenstelle.

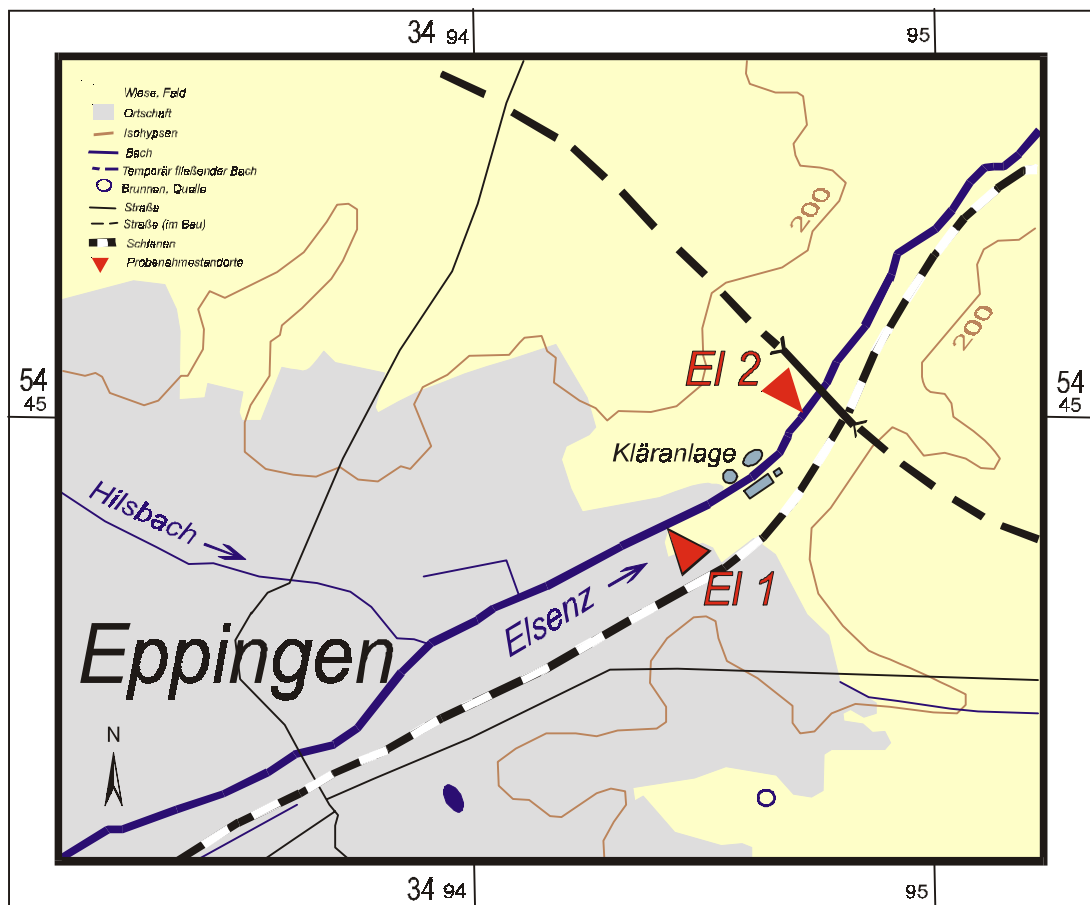


Abbildung 62: Karte Probenahmepunkte Elsenz

Die Neckarflachwasserzone wurde bei Eberbach am Einstrom und in einem Sedimentationsbereich untersucht.

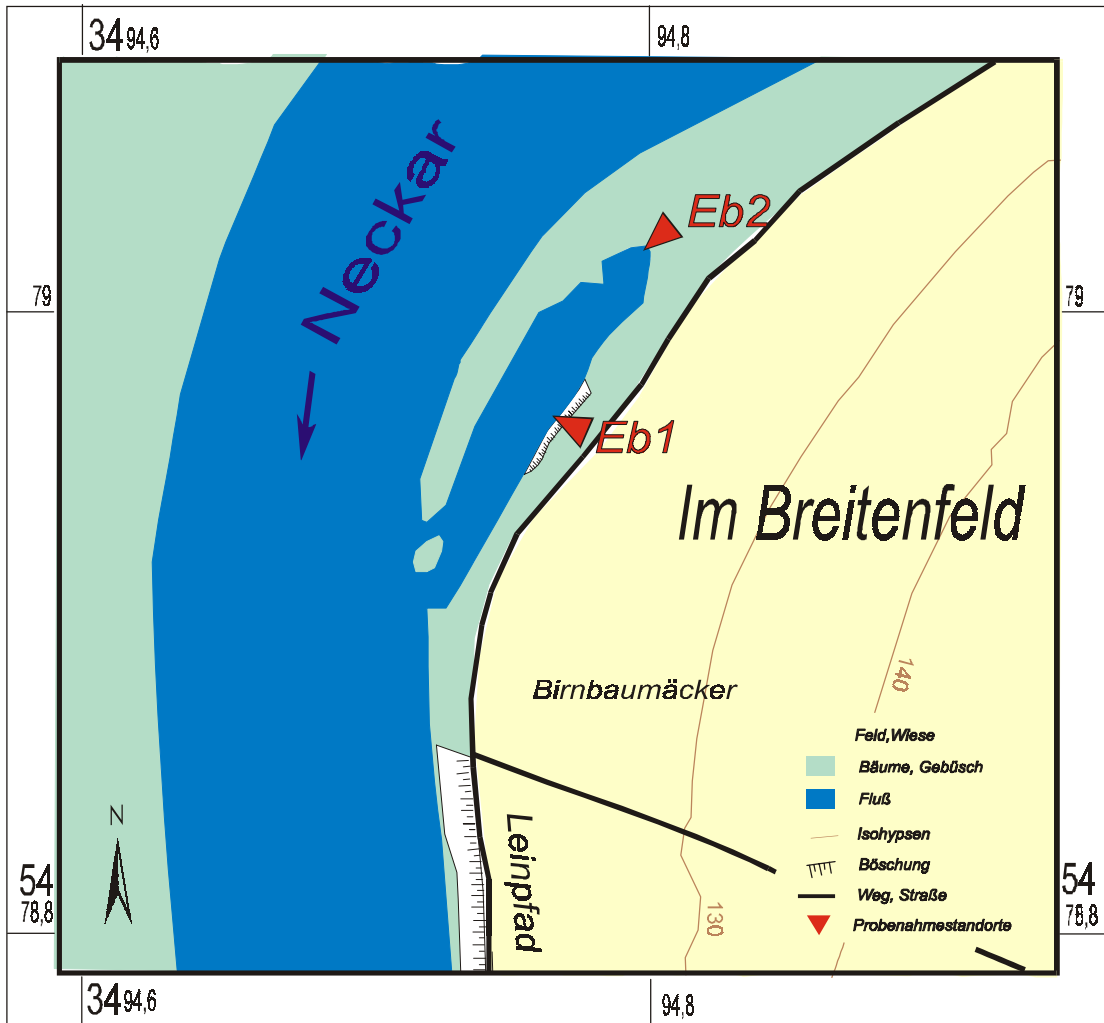


Abbildung 63: Karte Probenahmepunkte Eberbach

Der Mühlbach bei Heidelberg wurde am Oberlauf und nach Durchfluss durch ein landwirtschaftlich intensiv genutztes Gebiet und den Stadtteil Handschuhsheim beprobt.

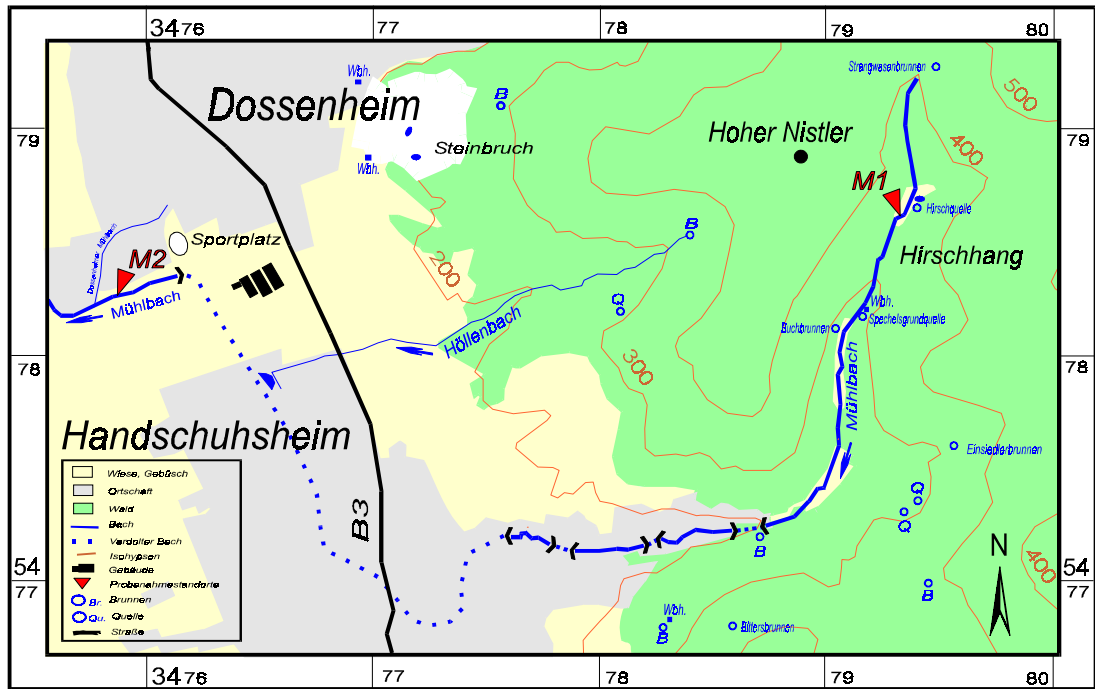


Abbildung 64: Karte Probenahmepunkte Mühlbach

## **Zusammenfassende Betrachtung:**

Anhand der Tabelle 17 ist zu erkennen, dass Phthalate in Übereinstimmung mit [BRÜLL 2000; FURTHMANN 1994; PFORDT 1999] als nahezu „ubiquitär“ vorhanden angesehen werden können. Sie traten in Konzentrationen von mehreren 100 ng/l in den analysierten Oberflächenwässern auf und entlang des Laufes des Forellenbaches fand kein Konzentrationsgefälle aufgrund Verdünnung oder Abbau statt. Es kam zu keiner Erhöhung der Werte durch Kläranlagenauslauf, weder entlang des Laufes von Elsenz, noch waren die Werte im Forellenbach bei Entnahmestelle F1 auffällig hoch. (Die „glatten“ Werte in der Tabelle entstanden durch Rundung, weil die Werte außerhalb des Kalibrationsbereiches lagen.) Diethylhexylphthalat war die weitaus am stärksten vertretene Verbindung.

Anders verhält es sich mit den Alkylphenolen und Bisphenol A. Die höchsten Konzentrationen waren in F1 zu finden (Octylphenol: 18 ng/l, Nonylphenol: 48 ng/l, Bisphenol A: 87 ng/l). Dieser Bach ist dort vom Auslauf der einer Klinik nachgeschalteten Kläranlage stark beeinflusst, diese Kläranlage konnte somit als Emittent von Bisphenol A, techn. Octyl- und Nonylphenol identifiziert werden. F2 als der nicht von der Kläranlage beeinflusster Nebenarm zeigte nur geringe Konzentrationen (unterhalb Nachweis- und Bestimmungsgrenze, bzw. Bisphenol A mit 9,4 ng/l). Die geringeren Konzentrationen von Alkylphenolen in F3 sind als Verdünnungseffekt zu sehen. Das Absinken der Werte von Octylphenol und Bisphenol A von F3 zu F4 (5 ng/l zu <BG und 1,7 ng/l zu 2,3 ng/l) sind auf einen Abbau und/oder Adsorption an sedimentierende Partikel zu sehen. Die Alkylphenole dürften aus Formulierungen von Reinigungsmitteln stammen, wo sie trotz der freiwilligen Verzichtserklärung [INDUSTRIEVERBAND KÖRPERPFLEGE- UND WASCHMITTEL E.V. (IKW) U.A. 1986] vereinzelt in der Industrie noch angewendet werden [FREY 2000; SCHIEWER 1999] und durch Abbau aus den Alkylphenoxyethoxylaten freigesetzt werden. Die Kontaminationen an Alkylphenolen sind jedoch weder auf Deutschland oder die EU beschränkt: Von den USA ist eine derartige Verzichtserklärung nicht bekannt, sodass in stark kontaminierten Grundwasservorkommen in Cape Cod sehr hohe Werte von bis zu 33 µg/l nachgewiesen wurden [RUDEL 1998], auch in der Schweiz, in den Niederlanden, Großbritannien und Japan wurden sie nachgewiesen [SCHAFFNER 1999; AHEL 1999; DACHS 1999; ISOBE 1999; BLACKBURN 1995].

Da Bedarfsgegenstände (Plastikteller) aus dem Küchenbereich und Geräte im Krankenhaus aus Polycarbonat bestehen können, wird das hier nachgewiesene Bisphenol A durch Auswaschung diesen Quellen zugeordnet.

Gleichermaßen zu interpretierende Werte zeigte der Vergleich der beiden Entnahmestellen der Elsenz. Octylphenol war schon vor der Kläranlage in diesem Gewässer enthalten, während Nonylphenol und Bisphenol A erst nach der Kläranlage nachzuweisen waren. Die Gründe für den Nachweis von BPA liegen in der vielfältigen Verwendung in einer großen Bandbreite von Kunststoffen (es existieren viele Polycarbonat-Mischkunststoffe), aus denen das Monomer Bisphenol A ausgewaschen werden und

über häusliche, industrielle und Straßenabwässer in Richtung Kläranlage getragen werden kann. Nonylphenol wird ebenfalls in Unterbodenschutz für Fahrzeuge verwendet, sodass Straßenabwässer zur Kontamination beitragen [FREY 2000].

Alle analysierten Oberflächengewässer waren demnach bis auf F1 relativ gering mit Alkylphenolen belastet, die meisten gefundenen Konzentrationen von Nonylphenol (<NG bis ca. 20 ng/l) lagen sogar noch unter denen des analysierten Trinkwassers (30-36 ng/l), was auf einen Übergang von Nonylphenol aus Materialien in Kontakt mit dem Trinkwasser in die Wasserphase hinein deutet (siehe auch 5.1).

Von den Steroidhormonen war Estron mit dem Maximalwert von 8 ng/l in der Elsenz nach der Kläranlage nachzuweisen, auch in F1 mit 2,5 ng/l, wo zusätzlich Androsteron mit 2 ng/l auftrat. Konzentrationen um 1 ng/l traten im Neckar bei Eb1 und im Mühlbach laufabwärts an Entnahmestelle 2 auf. Estron ist das im Rahmen dieser Untersuchungen hauptsächlich in Oberflächenwässern auftretende Steroidhormon und wird von Kläranlagen emittiert. Wahrscheinlich werden die anderen vom Menschen ausgeschiedene Steroidhormone, auch das in diesem Bereich nicht nachgewiesene Ethinylestradiol, mikrobiell zu Estron abgebaut. Auch Androsteron wird diesem Fund zufolge nicht oder nicht vollständig durch die Reinigungswirkung einer Kläranlage eliminiert.

Die Spurenkonzentrationen von PCB, die bereits in F2, jedoch nicht in F1 zu erkennen sind, belegen eine ältere anthropogen-industrielle Belastung (2-3 ng/l von drei PCB-Kongeneren). Laufabwärts waren Konzentrationen von 5-8 ng/l jeweils von PCB 138, 153 und 194 zu messen, d.h. aus laufabwärts gelegenen Kontaminationsquellen und nicht aus der Kläranlage gelangen die PCB in den Forellenbach. Ähnliche Restbelastungen durch das seit März 1991 verbotene Atrazin sind in der Hälfte der untersuchten Wasserproben vorhanden, die Werte liegen mit 7-55 ng/l alle unterhalb des für Trinkwasser gültigen Grenzwertes von 100 ng/l.

Die Bezeichnung „Blindwert“ in der letzten Spalte der Tabelle für eine Probe Heidelberger Leitungswasser ist etwas irreführend, da sie als „richtige“ Probe zu werten ist. Atrazin (43 ng/l), ein PCB-Kongener (PCB 153, 2,4 ng/l), eine Spur Bisphenol A (3,7 ng/l) und recht hohe Mengen an Phthalaten (2 µg/l Diethylhexylphthalat) waren in diesem Trinkwasser enthalten, damit war es (bis auf das Fehlen von Alkylphenolen) ähnlich belastet wie die in Kap. 5.1 untersuchten Trinkwässer.

Bischlorphenylsulfon ist eine in jüngerer Zeit bekannt gewordene Kontaminante, die in Flüssen und der Ostsee nachgewiesen werden konnte [OLSSON 1995]. Da sie strukturell sehr dem DDT und PCB ähnelt und persistent gegen Abbauvorgänge ist, muss sie zumindest im Verdacht stehen, ähnliche endokrine Wirkungen zu besitzen. In Fischen der Ostsee wurde BCPS in ähnlichen Konzentrationen wie PCB 138 gefunden. Aus diesem Grund sollte das Vorkommen in den untersuchten Wässern in diese Untersuchung mit eingezogen werden. BCPS ist hiermit erstmals in deutschen Fließgewässern nachgewiesen, in ähnlichen Konzentrationen (unterer ng-Bereich: 5-14 ng/l) wie die PCB.

Zur Beurteilung der Messwerte: Kap. 6



**Tabelle 16 endokrin wirksame Verbindungen in Oberflächenwässern, eigene Untersuchungen**

Messung - ng/l	F1	F2	F3	F4	E11	E12	Eb1	Eb2	M1	M2	H	BW
Atrazin	<NG	7,3	<NG	<NG	20,8	10,3	55	47,1	<NG	<NG	31,7	43,2
a-Endosulfan	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
b-Endosulfan	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Lindan	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Bischlorphenylsulfon	<NG	<BG	<NG	<NG	<BG	<NG	<BG	10,4	<NG	<NG	13,9	<BG
Diethylphthalat	<NG	360	1000	221	256	45,8	353	1000	315	278	<NG	235
Benzylbutylphthalat	103	118	119	45,6	66,4	17,9	213	152	84,7	73,8	333	106
Dibutylphthalat	134	129	109	107	107	38,8	130	193	140	116	77,8	94,6
Diethylhexylphthalat	1400	3000	1600	1800	3000	600	1700	1900	1500	2200	2000	2000
pp-DDE	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
o, p'-DDT	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
p, p'-DDT	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 28	<NG	2,5	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 52	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 101	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	5,5	<NG	<NG	<NG	6,8	<NG
PCB 138	<NG	3,4	7,7	<NG	<NG	<NG	<NG	6,8	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 153	<NG	3,2	6,8	2,6	3,2	<NG	3,4	5,6	<NG	<NG	2,9	2,4
PCB 180	<NG	<NG	5,2	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 194	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Techn. Octylphenol	17,8	<NG	5,1	<BG	9,5	10,1	<BG	<BG	<BG	<BG	6,5	<NG
Techn. Nonylphenol	48	<BG	<BG	<BG	<NG	19,1	<BG	14,4	15,9	<BG	<BG	<NG
Bisphenol A	86,7	9,4	10,7	2,3	<BG	71,1	8,4	27,4	<NG	4,3	15,6	3,7
Diethylstilbestrol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Hexestrol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Androsteron	2,2	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Estron	2,5	<NG	<NG	<NG	<NG	8,1	1,2	<NG	<NG	0,8	<NG	<NG
Estradiol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Mestranol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Ethinylestradiol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG

### 5.3 Neckar-Hochwasser

Zusätzlich wurden Wasserproben eines Hochwasserereignisses (bezogen von H. Hollert, Zoologisches Institut I der Universität Heidelberg, Arbeitsgruppe Aquatische Toxikologie) des Neckars im Oktober/November 1998 gesammelt und untersucht (Tabelle 17; Tabelle 18).

Durchweg am höchsten belastet waren die Proben zu Beginn des Hochwassers, welche die Probenserie der Wasserphase mit hohen Konzentrationen von Alkylphenolen (mehrere 100 ng/), Phthalaten (bis zu 7,7 µg/l für Benzylbutylphthalat) und Estradiol (max. 13 ng/l) einleiteten (siehe Tabelle 17), dann traten geringere Konzentrationen auf. Die Erklärung für diese absinkenden Konzentrationen ist der Verdünnungseffekt durch die hohen Niederschläge. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von [HOLLERT 1998] wird deutlich, dass durch die stärkere Strömung und Turbulenz im Flussbett Alt-Sedimente aufgewirbelt wurden. Dadurch wurden an den Partikeln adsorbierte Alkylphenole und Phthalate teilweise wieder in Lösung gebracht

Steroidhormone werden in Kläranlagen einerseits (teilweise) mikrobiell abgebaut, andererseits am Schlamm adsorbiert. Dass teilweise nach einer Kläranlage höhere Konzentrationen als am Einlauf nachgewiesen werden konnten, liegt an der mikrobiellen Spaltung der Steroidhormon-Konjugate. [SCHWEINFURTH 1996; SNYDER 1999; OEHLMANN 1996; TERNES 1998; LARSSON 1999; PANTER 1998; TYLER 1998; ENVIRONMENT AGENCY UK 1996]. Daher besitzen nach [TERNES 1999] Kläranlagenausläufe zu 90% Estradiol-Konzentrationen von weniger <0,5 bis 10 ng/l, was auch die Ergebnisse von [SPENGLER 1999] bestätigen. Weil in zwei Proben am Anfang der Messserie Estradiol mit 12 und 13 ng/l vorhanden war, liegt die Vermutung nahe dass eine Kläranlage die hohen Niederschlagsmengen nicht aufnehmen konnte und nicht behandeltes Abwasser mit höheren Konzentrationen an Estradiol in den Vorfluter gelangte. Überraschend ist hierbei die Abwesenheit bzw. die unter den Nachweisgrenzen liegenden Konzentrationen an Ethinylestradiol (<1 ng/l) und des natürlichen Hormons Estron (<0,25 ng/l), die oft gemeinsam in Kläranlagenausläufen [SPENGLER 1999] auftraten. Eine Kontamination des Meßsystems mit Estradiol kann ausgeschlossen werden, da regelmäßig auf Memory-Effekte geprüft, lange Ausheizphasen GC-und injektorseitig programmiert und mehrfache reine Lösungsmittel-Injektionen innerhalb der Messreihen eingesetzt wurden.. Die Abwesenheit von Estron ist vermutlich auf die fehlende Abbauleistung der Abwasserreinigung aufgrund mangelnder Kontaktzeit durch sehr hohen Durchfluss und Überlauf und deswegen fehlendem Abbau von EDI zu EST zurückzuführen.

Nur ein PCB-Kongener trat vereinzelt mit wenigen ng/l auf. Die zwei höchsten Werte für Atrazin (71 ng/l und 95 ng/l) waren erst im späteren Verlauf des Hochwassers am dritten Tag des Hochwassers zu finden. Für die Phthalate war ein etwas kleineres zweites Maximum mit 1,3 µg/l (Diethylphthalat), 3

$\mu\text{g/l}$  (Benzylbutylphthalat) und  $5 \mu\text{g/l}$  (Diethylhexylphthalat) am zweiten Tag zu verzeichnen. Dies zeigt, dass durch Zuflüsse des Neckars diese Substanzen mit zeitlicher Verzögerung aufgrund weiterer Entfernung und geringerer Fließgeschwindigkeit oder durch Mobilisation eines weiter flussaufwärts gelegenen Sedimentes angeliefert wurden. Gegenüber den untersuchten kleineren Oberflächenwässern sind Dibutylphthalat und Benzylbutylphthalat im Neckarhochwasser stärker vertreten, wodurch die Bandbreite der möglichen Kontaminanten durch industrielle und häusliche Verschmutzung aus einer höheren Anzahl von Verunreinigungsquellen deutlicher repräsentiert wird.

Zur Beurteilung der Messwerte: Kap. 6

**Tabelle 17: endokrin wirksame Verbindungen in Hochwasserproben des Neckars, eigene Untersuchungen**

Messung - ng/l	29.10. 12h	29.10. 14h	29.10. 16h	29.10. 22h	30.10. 02h	30.10. 06h	30.10. 08h	30.10. 10h	30.10. 12h	30.10. 14h
Atrazin	18,5	<NG	24,9	17,6	15,5	16,0	<NG	<NG	16,9	19,4
a-Endosulfan	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
b-Endosulfan	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Lindan	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Bischlorphenylsulfon	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Diethylphthalat	1.320	<BG	67,1	<NG	<NG	<NG	1.350	1.010	76,8	<NG
Benzylbutylphthalat	7.700	123	124	97,3	101	122	3.000	2.400	<NG	<BG
Dibutylphthalat	3.200	<NG	<BG	<NG	<NG	<NG	1.400	1.190	<BG	<NG
Diethylhexylphthalat	6.300	<NG	286	409	556	343	5.000	3.000	287	<BG
p, p'-DDE	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
o, p'-DDT	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
p, p'-DDT	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 28	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 52	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 101	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 138	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	2,3	<NG	4,0	<NG	<NG
PCB 153	<NG	<NG	<NG	<BG	<BG	<NG	<NG	<NG	<NG	<BG
PCB 180	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 194	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Techn. Octylphenol	28,5	60,4	95,4	5,0	5,2	5,8	11,0	11,6	9,3	<NG
Techn. Nonylphenol	250	428	228	72,5	68,5	70,2	83,3	103	78,6	86,1
Bisphenol A	13,0	12,7	<BG	<NG	<NG	<NG	3,7	9,9	11,5	<NG
Diethylstilbestrol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Hexestrol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Androsteron	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Estron	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Estradiol	13,1	12,2	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Mestranol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Ethinylestradiol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG

**Tabelle 18: endokrin wirksame Verbindungen in Hochwasserproben des Neckars:  
eigene Untersuchungen**

Messung - ng/l	30.10. 16h	30.10. 18h	31.10. 02h	31.10. 10h	31.10. 22h	01.11. 10h	01.11. 22h	02.11. 06h	02.11. 22h	03.11. 14h
Atrazin	25,8	20,7	19,6	95	71	30,4	22,1	32,6	19,6	19,2
a-Endosulfan	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
b-Endosulfan	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Lindan	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Bischlorphenylsulfon	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Diethylphthalat	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Benzylbutylphthalat	<NG	<BG	<BG	<NG	<BG	<NG	108,9	<NG	<NG	144,5
Dibutylphthalat	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Diethylhexylphthalat	<NG	<NG	<NG	<NG	<BG	<NG	<BG	<NG	<NG	<BG
p, p'-DDE	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
o, p'-DDT	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
p, p'-DDT	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 28	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 52	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<BG	<NG
PCB 101	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 138	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 153	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 180	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 194	<NG	<NG	<NG	<NG	<BG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Techn. Octylphenol	6,0	9,2	19,1	16,3	15,7	11,1	11,4	14,7	10,5	<NG
Techn. Nonylphenol	70	84,7	94,7	82,3	102	63,6	50,7	55,3	78,9	55,8
Bisphenol A	<BG	<NG	<NG	<NG	<NG	<BG	<NG	<BG	<NG	<NG
Diethylstilbestrol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Hexestrol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Androsteron	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Estron	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Estradiol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Mestranol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Ethinylestradiol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG

## 5.4 Sedimente von Oberflächenwasser und des Neckar-Hochwassers

Von den oben angeführten Bächen und dem Hochwasserereignis des Neckars wurden Sedimentproben als vorbereitete Extrakte (erhalten von Hollert, Zoologisches Institut I der Universität Heidelberg, Arbeitsgruppe Aquatische Toxikologie) untersucht. Die Probenaufbereitung der Sedimente ist von [HOLLERT 1999] beschrieben, die Sedimente waren gefriergetrocknet und per Soxhlet mit Aceton extrahiert worden. Da diese Extrakte stark matrixhaltig waren und Restwassergehalte aufwiesen, wurden sie im Stickstoffstrom getrocknet, wieder in Ethylacetat aufgenommen, filtriert und 1:20 verdünnt. Aufgrund dieses Vorgehens galten andere Nachweisgrenzen, die über die Verdünnung und Anreicherung extrapoliert wurden. Auch der erhöhte Untergrund wurde in Betracht gezogen, sodass im Extremfall von Bischlorphenylsulfon und PCB 28 die Massenspuren stark gestört wurden und sie nicht bestimmt werden konnten. Dieses einfache Verfahren zur Schätzung der Nachweisgrenzen musste gewählt werden, da kein analytfreies Material zur Leerwertbestimmung zur Verfügung stand. Die Bestimmungsgrenze wurde als Näherung mit einem Ergebnisunsicherheitsfaktor  $k = 2$  als die doppelte Nachweisgrenze berechnet.

**Tabelle 19: Nachweisgrenzen der nicht derivatisierten Substanzen in Sedimenten**

Substanz	NG (µg/kg)	BG (µg/kg)
Atrazin	40	80
α-Endosulfan	6	12
β-Endosulfan	6	12
Lindan	6	12
Bischlorphenylsulfon	n.b.	n.b.
Diethylphthalat	100	200
Benzylbutylphthalat	300	600
Dibutylphthalat	150	300
Diethylhexylphthalat	200	400
p, p'-DDE	30	60
o, p'-DDT	10	20
p, p'-DDT	20	40
PCB 28	n.b.	n.b.
PCB 52	4	8
PCB 101	10	20
PCB 138	10	20
PCB 153	10	20
PCB 180	30	60
PCB 194	10	20

**Tabelle 20: Nachweisgrenzen der derivatisierten Substanzen in Sedimenten**

Substanz	NG (µg/kg)	BG (µg/kg)
techn. Octylphenol	5	10
techn. Nonylphenol	10	20
Bisphenol A	3	6
Diethylstilbestrol	3	6
Hexestrol	3	6
Androsteron	20	40
Estron	3	6
Estradiol	4	8
Mestranol	20	40
Ethinylestradiol	6	12

Es wurden im Sediment der Bäche lediglich Phthalate, Alkylphenole und Bisphenol A nachgewiesen (Tabelle 21). Dibutylphthalat als die dominierende Substanz war mit mehreren hundert  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bis zu 2,4 mg/kg im Sediment von F 1 vertreten (Diethylhexylphthalat mit 2,2 mg/kg) während die anderen Phthalate nur unterhalb der Bestimmungs- oder Nachweisgrenze in den Sedimenten vorhanden waren. Im Sediment der Bäche war DBP stärker vertreten als in der Wasserphase und im Neckar, wo überwiegend DEHP vorherrschte. Hier scheint eine Verunreinigung mit einem speziellen Produkt vorzuliegen, was sich mehr auf das Sediment als die Wasserphase auswirkt. Phthalate wurden von [VAN DER VELDE 1999] in ähnlich hohen Konzentrationen in Sedimenten nachgewiesen.

Im Sediment von F1 waren ebenfalls die höchsten Werte von Nonylphenol, Octylphenol und Bisphenol A zu verzeichnen: Die hohe Konzentration von 5 mg/kg Nonylphenol, die mindestens um den Faktor 30 die Funde in den anderen Sedimenten überstieg, lässt auf eine starke Adsorption an Partikeln schließen, denn bei den Wasserproben war zwar auch die höchste Konzentration an NP in F1 vorhanden, jedoch nicht um Größenordnungen höher als bei den übrigen Wasserproben. Octylphenol zeigte nicht das gleiche Verhalten wie sein höheres Homologes und ist wahrscheinlich aufgrund etwas höherer Polarität und insgesamt geringeren Vorkommens nicht so stark im F1-Sediment angereichert (87  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) wie Nonylphenol.

In der Elsenz zeigte sich die Belastung mit kommunalen Abwässern durch erhöhte Werte von Alkylphenolen, BPA und DEHP im Sediment.

Bei den Neckarhochwassersedimenten (Tabelle 22) zeigten sich mit Erreichen des Abfluss-Maximums am Pegel Heidelberg am 30.10. (Abbildung ) und fast parallel damit des spektralen Absorptionskoeffizienten ( $\text{SAK}_{254}$ ) (Abbildung 65) auch die Höchstwerte von DEHP und DBP (Abbildung ) und NP (Abbildung ). Dies lässt auf eine Remobilisierung stärker kontaminierter älterer Sedimente schließen, denn die Schwebstoffkonzentration (durch jüngere Sedimente) hatte bereits am 29.10. ihr Maximum erreicht (Abbildung 65). Mit dem höheren Fluss wurden am Abend des 29. und am 30.10. die tieferliegenden Altsedimente erodiert. (Bei der Phthalat- und Nonylphenol-Grafiken ist zu beachten, dass die Zeit-Achse (durch die höhere Schwebstofffracht und somit häufigere Probenahmezeitpunkte für die chemische Analytik im linken Bereich gestreckt) nicht identisch mit der Zeit-Achse der SAK- und Abfluss-Grafik ist. In den älteren Sedimenten waren Phthalate, Alkylphenole und geringe Mengen von Bisphenol A nachzuweisen, die übrigen Substanzen waren nicht detektierbar. Die zwei Spitzenwerte von Nonylphenol zu den gleichen Zeitpunkten wie DEHP (nur mit umgekehrter Intensität) zeigen dass die stärker kontaminierten Altsedimente nur kurzzeitig an den Probenahmestellen vorbeigetragen wurden. Es schienen Sedimente mit verschiedener Belastung vorzuliegen.

Aus der SAK-Grafik wird dies nicht deutlich, da mit dem SAK die Qualität der Schwebstofffracht nicht berücksichtigt werden kann. Offensichtlich ist die Erosion der Sedimente bei Hochwasser ein schneller Vorgang. Eine andere Interpretation wäre, dass durch wechselnde Strömungsverhältnisse und mangelnde Durchmischung der schwebstoffhaltigen Wasserphase nur ein kurzer Einblick in die

sich bewegende „Fahne“ eines erodierten Sedimentes möglich war.

Die toxischen Wirkungen dieses Sediments werden an anderer Stelle beschrieben [HOLLERT 1999] und basieren eher auf dem Schwermetallgehalt. Von einem der untersuchten Sedimente (Forellenbach 2) sind allerdings mit 232  $\mu\text{g}/\text{kg}$  TS an PCB-Kongeneren auch ökotoxikologische Schadwirkungen im Gewässer zu erwarten. Die Nonylphenol- und Phthalatkonzentrationen von bis zu mehreren  $\text{mg}/\text{kg}$  TS können nach derzeitigem Kenntnisstand nicht beurteilt werden, da nicht bekannt ist, wie und ob Fische die an das Sediment gebundenen Substanzen aufnehmen; nach derzeitiger Einschätzung dürfte dieser Anteil der Belastung nicht zu vernachlässigen sein. Sediment inkorporierende und filtrierende Würmer wären z.B. sicherlich gefährdet, sofern bei ihnen die biochemischen Voraussetzungen für eine endokrine Wirkung vorhanden sind. Wirbellose stellen immerhin 95% der tierischen Organismen unseres Ökosystems [DEPLEDGE 1999].

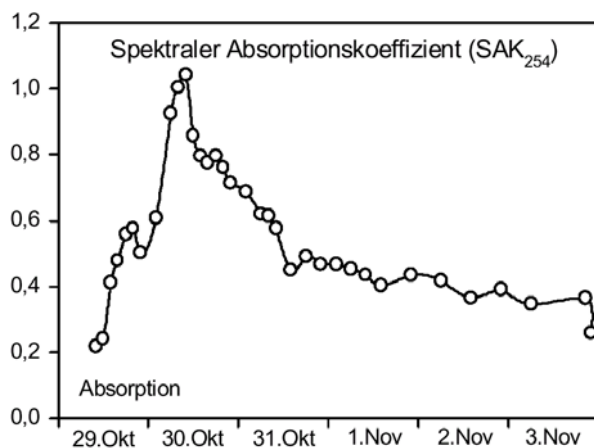


Abbildung 659: SAK im Verlauf des Hochwassers (nach [Hollert et al. 1999])

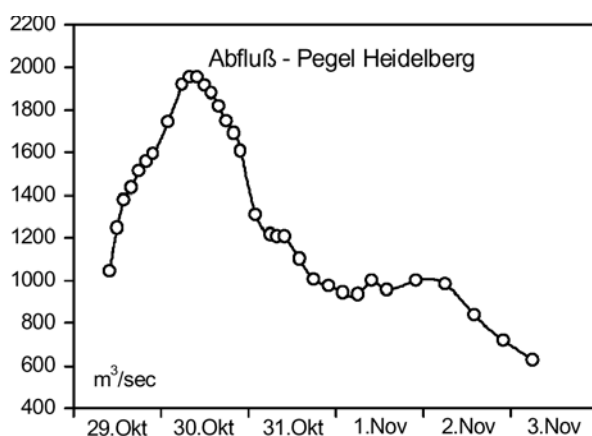


Abbildung 70: Abfluss im Verlauf des Hochwassers (nach [Hollert et al. 1999])



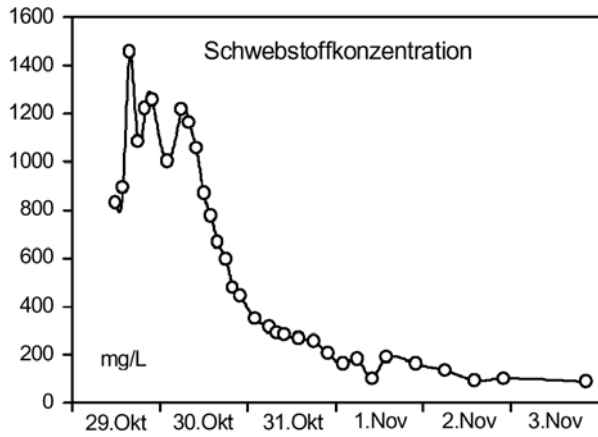


Abbildung 71: Schwebstoffkonzentration im Verlauf des Hochwassers (nach [Hollert et al. 1999])

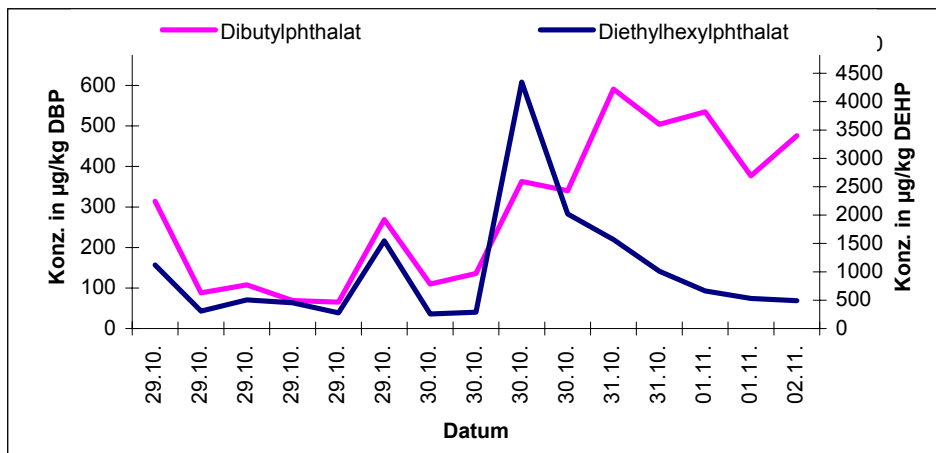


Abbildung 72: Konzentrationsverlauf von DEHP und DBP im Neckarhochwasser- Sediment

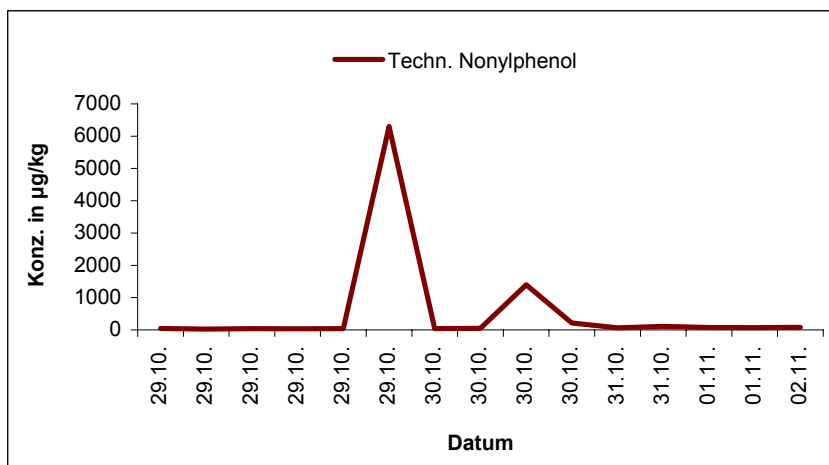


Abbildung 73: Konzentrationsverlauf von NP im Neckarhochwasser- Sediment

**Tabelle 21 endokrin wirksame Verbindungen in Sedimenten von Bächen:  
eigene Untersuchungen**

Messung - µg/kg Trockensubstanz	F1	F2	F3	F4	E1	Eb1	Eb2	H
Atrazin	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
a-Endosulfan	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
b-Endosulfan	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Lindan	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Diethylphthalat	<BG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Benzylbutylphthalat	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Dibutylphthalat	2400	1020	760	619	644	810	913	695
Diethylhexylphthalat	2200	<NG	603	<NG	1130	<BG	700	<BG
p, p'-DDE	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
o, p'-pDDT	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
p, p'-pDDT	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 52	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 101	<NG	71	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 138	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 153	<NG	161	25	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 180	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 194	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Techn. Octylphenol	87,2	<BG	<BG	<BG	22,9	<BG	<BG	17,0
Techn. Nonylphenol	5000	73,2	162	159	105	109	132	29,0
Bisphenol A	13,1	<NG	<BG	<NG	61,6	7,2	14,8	<BG
Diethylstilbestrol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Hexestrol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Androsteron	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Estron	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Estradiol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Mestranol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Ethinylestradiol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG

Diese Ergebnisse stehen in guter Korrelation zu Messungen von Sediment aus Berliner Gewässern [PILZ 1999]: Dort wurde in nahezu allen Proben DBP gefunden, mit einem Maximalwert von 2200 µg/kg TS. Dominierend unter den Phthalaten war DEHP mit einem Median von 790 µg/kg TS. NP trat dort mit einem Median von 480 und einem Maximum von 5600 µg/kg TS auf, BPA wurde mit Konzentrationen bis 116 µg/kg TS (Median: 11 µg/kg TS) bestimmt. Diese Werte stehen in sehr gutem Einklang mit den eigenen Ergebnissen. Ein Unterschied, der wahrscheinlich aus regionalen Begebenheiten herrührt (ansässige Hersteller oder Anwender) ist das in Berlin nicht nachgewiesene OP und das vereinzelt in geringen Konzentrationen auftretende BBP welches in den hier untersuchten Proben nicht vorkam.

**Tabelle 22: endokrin wirksame Verbindungen im Sedimenten von Neckarhochwasser:  
eigene Untersuchungen**

Messung - µg/kg TS	29.10. 10h	29.10. 12h	29.10. 18h	29.10. 20h	29.10. 22h	29.10. k.A.	30.10. 12h	30.10. 14h	30.10. 16h	30.10. 18h	31.10. 02h	31.10. 14h	01.11. 02h	01.11. 14h	02.11. 06h
Atrazin	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
a-Endosulfan	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
b-Endosulfan	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Lindan	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Diethylphthalat	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Benzylbutylphthalat	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	340	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Dibutylphthalat	314	88	108	69	65	269	110	136	363	340	591	504	535	377	476
Diethylhexylphthala	1120	307	506	454	276	1546	258	287	4345	2020	1570	1010	664	531	491
p, p'-pDDE	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
o, o'-pDDT	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
p, p'-DDT	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 52	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 101	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 138	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 153	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 180	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
PCB 194	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Techn. Octylphenol	10,5	<BG	<BG	<BG	<NG	85,7	<BG	10,8	37,3	10,4	14,7	<BG	13,1	10,6	11,0
Techn. Nonylphenol	42,4	27,0	38,0	34,4	38,1	6300	40,4	52,0	1400	215	64,9	110	76,8	69,2	81,4
Bisphenol A	7,1	7,0	8,1	6,5	<BG	6,5	<NG	7,4	<NG	17,6	7,5	<BG	<NG	<BG	<BG
Diethylstilbestrol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Hexestrol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Androsteron	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Estron	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Estradiol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Mestranol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG
Ethinylestradiol	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG	<NG

## 5.5 Vergleich und Kombination mit einem Biotest der AG aquatische Toxikologie

(Biotest durchgeführt von H. Hollert, Zoologisches Institut I der Universität Heidelberg, Arbeitsgruppe Aquatische Toxikologie [Hollert 1999])

Biotests wurden von vielen Forschungsgruppen [HARRIES, 1997; SUMPTER 1995; TYLER 1998; PANTER 1998; DEPLEDGE 1999; LARSSON 1999; GAGNE 1999; BJERREGAARD 1998; KLOAS 1999, 1998; PATYNA 1999; HOLLERT 1999; LUTZ 1999; PETIT 1997; MATTHIESSEN, 1999 ; PALMER 1999; GOODBRED 1999; WALTHER 1999; FENT, 1999; KELCE 1999; GIESY 1999; SERVOS 1999; FRIEDERICH 1999; ACKERMANN 1999; BURKHARDT-HOLM 1999; PALMER 1995; CHING-HUA 2000; DESBROW 1998; SPENGLER 1999; KÖRNER 1998; SENG 1998; SOTO 1991, 1994, 1995; SONNENSCHNEIN 1995; TIMM 1999; VOM SAAL 1995; CLEMENT 1997; NAGEL 1997; SCHLUMPF 1999; MATTHEWS 1999; KELCE 1999; LASCOMBE 1999] mit verschiedenen Zelltypen entwickelt und angewendet (Fischzellen-Vitellogenin-assay, modifizierter Hefezellen-assay, MCF7-Brustkrebszellen-assay) und sie erreichen teilweise befriedigende Nachweisgrenzen zur Bestimmung von endokrin wirksamen Substanzen in Wasser. [CHING-HUA 2000]. Eine gute Übersicht bietet [HOCK 2000], demnach ist der „e-screen-assay“ mit MCF-7-Zellen bislang am empfindlichsten und gelangt für den Nachweis von Estradiol bis in der sub-ng/l-Bereich. Im Vergleich zum Vitellogenin-Test ist jedoch der artifizielle Charakter der transfizierten Zellen ein Nachteil. Es handelt sich um künstliche Systeme, im Gegensatz zu Hepatocysten, die in dieser Form in lebenden Organismen vorkommen.

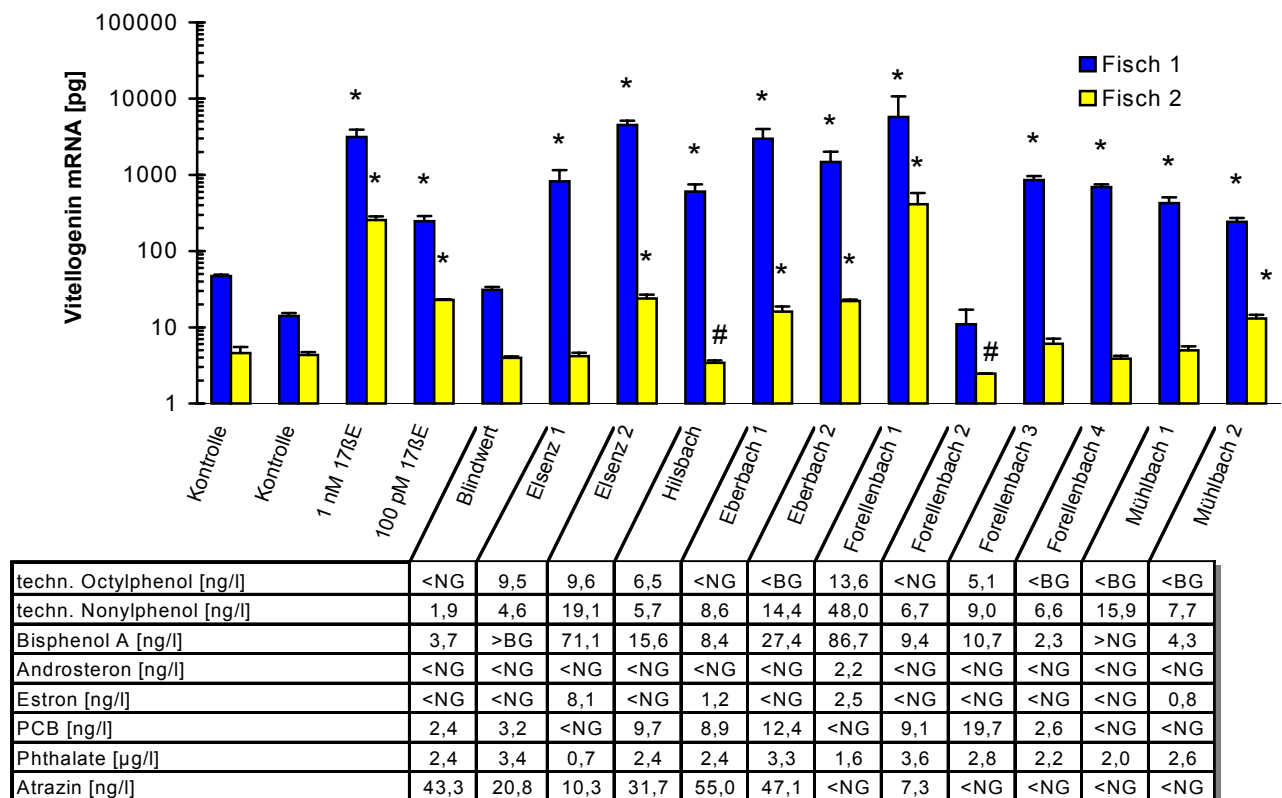
Diese Biotests können ein sinnvolles Werkzeug zum Screening auf diese Substanzen sein, bis auf den Vitellogenin-Test sind sie mit relativ geringem Zeitaufwand durchzuführen (E-sceen, MCF-7-Zellen/Hefezelltest) [HOLLERT 1999]. Doch der Nachteil dieser Methoden ist die begrenzte Aussage, die diese Tests liefern: Es kann aus den Ergebnissen nur gefolgert werden, ob in einem Wasser endokrine Aktivität gegeben ist oder nicht, ggf. kann auch die Höhe dieser estrogenen Wirkung in auf Estradiol-Konzentrationen normierten Einheiten angegeben werden [SPENGLER 1999]. Weiterhin gilt die Kritik, dass Biotests, die keinen Organismus in seiner Gesamtheit repräsentieren, nur einen kleinen Ausschnitt der möglichen endokrinen Wirkung darstellen (siehe auch Kap. 6). Im Gegensatz zur chemischen Analytik kann nicht zwischen verschiedenen Stoffen, die eine endokrine Wirkung hervorrufen, differenziert werden, geschweige denn mehrere Konzentrationen angegeben werden. Die in vitro Testmethoden eignen sich vorrangig zur Prüfung von Verdachtsstoffen auf ihre hormonelle Wirksamkeit [BERATUNGSKOMMISSION DER SEKTION TOXIKOLOGIE DER DGPT 1999]. Ein Vorteil der Biotests ist allerdings die für die einzelnen Substanzen integrierte relative Wirkungsstärke.

Hier ist auch die Kombination aus beiden Messprinzipien sinnvoll: Erst sollte zunächst ein Screening von Wasser- und Umweltproben mit einem Biotest, danach eine Untersuchung der positiven Proben mit GC-MS/MS oder anderen instrumentellen Methodendurchgeführt werden.

Im Institut für Zoologie I der Universität Heidelberg, AG Aquatische Toxikologie, wurde der Biotest auf Basis von Vitellogenin-mRNA (messenger-Ribonucleinsäure) in Forellen-Hepatocyten als Nachweis endokriner Aktivität etabliert [ISLINGER 1999] und für die Untersuchung von Sedimenten adaptiert [HOLLERT 1999]. Oberflächenwasserproben (die in 5.2 aufgeführten Bäche) wurden an XAD-Harz um den Faktor 30 angereichert und dem Vitellogenin-Test zugeführt. Diese Ergebnisse wurden mit denen in dieser Arbeit beschriebenen, chemisch-analytisch erhaltenen Messwerten verglichen. Die Anreicherung an XAD-Harz stellt ein etwas älteres, jedoch sicheres Anreicherungsverfahren für organische Spurenstoffe dar [FILIPIC 1995, THIELEMANN 1994; JUNK 1986, 1994; MARUOKA 1986, ZIETZ 2000], so dass ohne weitere Absicherung durch chemische Analyse dieser Extrakte eine ausreichende Aufkonzentration der gesuchten Substanzen postuliert wurde. Zur Kontrolle eines möglichen Effektes vom Ausbluten der XAD-Harze wurde ein Blindwert mitgeführt, der aus einer Probe Leitungswasser aus Heidelberg bestand und genauso wie die anderen Proben aufkonzentriert wurde. Es ergaben sich keine Hinweise auf störende Einflüsse auf das Testsystem.

Im Rahmen der vorliegenden Konzentrationen und des verwendeten Biotest-Systems wurde die „endokrine Wirkung“ somit als „Produktion von Vitellogenin-mRNA“ beschrieben (was natürlich nur einen Teilbereich der endokrinen oder estrogenen Wirkung repräsentiert). Es kam zu einer plausiblen Korrelation der Ergebnisse beider Messprinzipien. Die Plausibilität der Ergebnisse des Biotests wird weiterhin durch (siehe Grafik) die Positivkontrollen von Estradiol (Balkengruppen 3 und 4) und den Leitungswasser-Blindwert gestützt. Die Positivkontrollen enthielten 0,1 nmol/l und 1 nmol/l Estradiol, das sind 27,2 ng/l und 272 ng/l Estradiol. Sie führten zu einer Erhöhung der Vitellogenin-mRNA-Produktion um ca.1 bzw.2 log-Stufen. Der Leitungswasser-Blindwert enthielt nur wenige ng/l Bisphenol A und PCB sowie 43,3 ng/l Atrazin und 2,4 µg/l Phthalate (Summe) und führte zu keiner Erhöhung der Vitellogenin-mRNA-Produktion.

Zur Übertragbarkeit der Biotest-Ergebnisse auf die Verhältnisse in lebenden Fischen sei gesagt, dass die 30-fache Anreicherung durch XAD-Harz mit Sicherheit noch hinter den Verhältnissen in der Natur zurückbleibt, da die in Rede stehenden Substanzen Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten von  $\log POW = 3$  für Nonylphenol (jedoch nur Biokonzentrationsfaktor  $BCF = 100$ ) über  $\log POW = 4,2$  für Ethinylestradiol [BERATERGREGMIUM FÜR UMWELTRELEVANTE ALTSTOFFE 1988] bis  $\log POW = 4,7 - 6,8$  für PCB [SCHÖLER 2000] besitzen. Die in den Geweben von exponierten Fischen vorhandenen Konzentrationen dürften die der XAD-Extrakte sogar noch überschreiten.



**Abbildung 74: Korrelation zwischen Biotest und chemischer Analytik**  
**Symbole:** \* signifikante Erhöhung der Vitellogenin-mRNA-Produktion;  
 # signifikante Erniedrigung der Vitellogenin-mRNA-Produktion;  
 dazu Fehlerbalken auf den Säulen des Diagrammes  
 (modifiziert nach [Hollert et al. 1999])

Die Proben mit der höchsten endokrinen Wirkung auf die Forellen-Hepatocyten (Elsenz 2, Forellenbach 1) waren auch diejenigen mit den höchsten Konzentrationen an Xenoöstrogenen. Diese beiden Probestellen lagen hinter Kläranlagen, was im Einklang mit den Ergebnissen von [PURDOM 1998] an lebenden Forellen steht. Durch den XAD-Extrakt von Elsenz 2 wurde eine Steigerung der Vitellogenin-mRNA-Produktion um einen Faktor von maximal 100 (Fisch 1) erzielt, in diesem Wasser waren 8,1 ng/l Estron, 71,1 ng/l Bisphenol A, 19,1 ng/l Nonylphenol und 9,6 ng/l Octylphenol enthalten. Die außerdem vorhandenen 0,7 µg/l Phthalate und 10,3 ng/l Atrazin sind wahrscheinlich von keiner oder nur untergeordneter Bedeutung (siehe unten). Auch bei Forellenbach 1 wurde die Vitellogenin-mRNA-Produktion um ca. 2 log-Stufen gesteigert, diese Wasserprobe enthielt 2,5 ng/l Estron, 2,2 ng/l Androsteron, 86,7 ng/l Bisphenol A, 48 ng/l Nonylphenol, 13,6 ng/l Octylphenol und 1,6 µg/l Phthalate.

FB 2 als Probe mit dem höchsten Gehalt an Phthalaten (Summe 3,6 µg/l) bewirkte keine signifikante Erhöhung der Vitellogenin-mRNA-Produktion, in Fisch 2 sogar eine Erniedrigung. Offenbar sind dafür noch nicht bekannte Randeffekte verantwortlich, die mit der endokrinen Wirkung konkurrieren. Die unterschiedliche Empfindlichkeit von Organismus zu Organismus oder Teilen daraus wird an den widersprüchlichen Biotest- Ergebnissen für den Hilsbach ebenfalls deutlich (Fisch 1 - Fisch 2). Der Vollständigkeit halber sei gesagt, dass Biotests mit Vitellogenin falsch-negativ ausfallen können, falls PAK anwesend sind, die eine antiestrogene Wirkung besitzen [GAGNE 1999]

Die Phthalate besitzen nach [SOTO 1991; JOBLING 1995] zwar eine endokrine Wirkung, jedoch offensichtlich nicht in den hier vorliegenden Konzentrationen. Im Vergleich zu dem Steroidhormon Estradiol liegt die relative Wirksamkeit der Phthalate um den Faktor  $10^6$  niedriger, für die PCB ebenfalls um  $10^5$ - $10^6$ , d. h. es müssten Konzentrationen im oberen µg/l bis mg/l-Bereich vorliegen.

Der anscheinende Widerspruch zwischen den hier angegebenen Werten für Nonylphenol und den in Kap. 4 angegebenen, z.T. darüber liegenden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wird dort erläutert.

## **6 Gesundheitlich-umwelthygienische Betrachtung, Diskussion**

Mittlerweile ist von verschiedenen Autoren ein kleiner Datenbestand über das Vorkommen von endokrin wirksamen Substanzen (EWS) in Wasser und Lebensmitteln erstellt worden, sodass die Belastung von Mensch und Tier grob abgeschätzt werden kann. Nach den bisher vorliegenden Daten ist für aquatische Organismen von einer Gefährdung auszugehen, da endokrine Effekte bei mehreren Tierarten klar nachgewiesen sind (siehe auch Einleitung). Für den Menschen ist nach derzeitiger Kenntnis der Belastungspfad Trinkwasser irrelevant, während in Lebensmitteln erheblich höhere Konzentrationen an EWS nachgewiesen wurden. Jedoch sind auch diese Daten relativiert zu zahlreichen anderen Einflüssen zu sehen.

### **6.1 Mögliche Wirkungen des untersuchten Oberflächenwassers auf aquatische Organismen, Vergleich eigener Messdaten mit Literaturdaten**

#### ***6.1.1 Bekannte Konzentrationen in Wasser (Westeuropa, USA, Kanada)***

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Meßwerte von Steroidhormonen, Nonylphenol, Phthalaten, DDT, DDE und PCB stehen insgesamt in guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten. Lediglich zu Octylphenol sind keine publizierten Daten bekannt, sodass hier kein Vergleich aufgestellt werden kann. Die Maximalwerte zu Bisphenol A sind höher als die von [PILZ 1999] ermittelten Konzentrationen in Berliner Oberflächengewässern, dies kann jedoch an den regionalen Begebenheiten liegen (Industrie).

(Tabelle auf den folgenden Seiten)



**Tabelle 23: Zusammenfassung der Gehalte von EWS in verschiedenen Matrices, eigene Messwerte aus Kap 5.1 bis 5.3 und Literaturdaten aus Kap.1.4 einbezogen. Im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Messwerte sind kursiv gedruckt und mit „HW1“ für die kleineren Fließgewässer gekennzeichnet, mit „HW2“ für das Hochwasserereignis des Neckars, mit „HW“ bei Werten unterhalb der Nachweisgrenze bei beiden Probengruppen sowie für Trinkwasser. Alle Werte in ng/l falls nicht anders angegeben**

<b>Substanz</b>	<b>Kläranlagenauslauf</b>	<b>Oberflächengewässer</b>	<b>Trinkwasser</b>
<b>Estradiol</b>	<1-21 [STUMPF 1996] <1-64 [TERNES 1999] 4-48 [DESBROW 1998] 1,1 [LARSSON 1999] bis 13 [KUCH 1999] 21-130 [SATTELBERGER 1998]	<1 [STUMPF 1996] <0,5 [TERNES 1999] 1 bis 29 [FENT 2000] <0,5 HW1 <i>bis 13</i> HW2	<1 [STUMPF 1996] <1 [WEGENER 2000] 0,3 bis 0,9; <1 [FENT 2000] <0,5 HW
<b>Estron</b>	<1 [STUMPF 1996] <1 - 70 [TERNES 1999] 2-76 [DESBROW 1998] 5,8 [LARSSON 1999] bis 13 [KUCH 1999] 21-110 [SATTELBERGER 1998]	<1 [STUMPF 1996] <0,5 - 1,6 [TERNES 1999] 0,1 bis 2,9; 0,6 [FENT 2000] <i>bis 8</i> HW1 <0,25 HW2	<1 [STUMPF 1996] <1 [WEGENER 2000] <1 [FENT 2000] <0,25 HW
<b>Ethinyl- estradiol</b>	bis 62* [STUMPF 1996] <1 - 42 [TERNES 1999] bis 7 [DESBROW 1998] 5,8 [LARSSON 1999] bis 5 [KUCH 1999] 14-22 [SATTELBERGER 1998]	<1 bis 4* [STUMPF 1996] <0,5 [TERNES 1999] 2 bis 15; 1 bis 3; 4 [FENT 2000] <i>0,3</i> [SONNEBORN 1978] <1 HW	<1 [STUMPF 1996] <1 [WEGENER 2000] <1 bis 4 [FENT 2000] <i>bis 22,5**</i> [RURAINSKI 1977] <1 HW
<b>Mestranol</b>	<1-20 [STUMPF 1996] <1 - 4 [TERNES 1999] bis 8 [KUCH 1999]	<1 - 1 [STUMPF 1996] <0,5 [TERNES 1999] 2 bis 28 [FENT 2000], Einzelfälle <1 HW	<1 [STUMPF 1996] <1 [WEGENER 2000] <1 HW

<b>Nonylphenol</b>	840 10-1000 0,7 – 44 µg/l  0,9 – 4,9 µg/l	[LARSSON 1999] [FREY 2000] [SCHIEWER 1999], kontaminiert [SCHARF 1998], unfiltriert	bis 53 µg/l (max.) bis 180 µg/l  bis 290 5-40 10-400 7-52 <i>bis 48</i> <i>bis 250</i>	[GÜLDEN 1997] [SCHIEWER 1999], kontaminiert [PILZ 1999] [FREY 2000] [KALBFUS 1997] [HEEMKEN 1999] HW1 HW2	bis 140 <10 ng/l bis 33 µg/l  27-65 <i>bis 36</i>	[MATIA 1991] [RUDEL 1998] (kontaminiertes GW) [SCHIEWER 1999] HW
<b>Octylphenol</b>	60-310	[SCHARF 1998], unfiltriert	bis 18 bis 95	HW1 HW2	6	HW
<b>Phthalate (Summe)</b>	Bis 510 µg/l 1,3-4 µg/l	[GÜLDEN 1995] [SCHARF 1998]	bis 7,6 µg/l bis 9,4 µg/l bis 170 µg/l bis 7,5 mg/l bis 1,4 µg/l <i>bis 3,2 µg/l</i> <i>bis 18,5 µg/l</i>	[MATIA 1991] [PILZ 1999] [GÜLDEN 1997] [VAN DER VELDE 1999] [BRÜLL 2000] HW1 HW2	0,9-3,5 µg/l 1-19 µg/l  <i>bis 0,9 µg/l</i>	[BÄRWINKEL 2000] [VAN DER VELDE 1999] HW
<b>Bisphenol A</b>	20-55 490 720-1200	[RUDEL 1998] [LARSSON 1999] [SCHARF 1998], unfiltriert	Bis 31 9-776 <1 bis 87 <1 bis 13	[PILZ 1999] [HEEMKEN 1999] HW1 HW2	bis 40 4-125	[FENT 2000] HW
<b>DDT</b>		k.A.	bis 1400 ng/l  <2,5	[GÜLDEN 1997] (im Einzelfall) HW	<2,5	HW
<b>DDE</b>		k.A.	80 ng/l <0,5	[GÜLDEN 1997] HW	<0,5	HW
<b>PCB</b>		k.A.	1-100 ng/l bis 80 <1 4	[SCHÖLER 2001] [GÜLDEN 1997] HW HW2	1,5-7,5	HW
<b>Phyosterine (Sitosterol)</b>	bis 402  0,53 – 2,7 µg/l	β-Sitosterol [STUMPF 1996] [SATTELBERGER 1998]	<10-56	[STUMPF 1996]	20-60	[STUMPF 1996]

\* Diese z.T. extrem hohen Werte scheinen offensichtlich fehlerbehaftet zu sein: Ein Störsignal bei m/z 425 kann die Quantifizierung von EED in Full Scan-Modus stören, siehe Kap4.2.4 und [TERNES 1999], der als Coautor die [STUMPF 1996] publizierten Werte zu EED anzweifelt.

\*\* Die von [RURAINSKI 1977] veröffentlichten Werte von bis zu 22,5 ng/l EED in Trinkwasser werden nicht als korrekt angesehen, da die Analytik unter heutigen Gesichtspunkten als veraltet und von Störungen begleitet erscheint. So wurden nur 100 ml Wasser mit Diethylether extrahiert, der Extrakt eingedampft, auf DC getrennt, die Substanzflecken wurden ausgeschnitten, eluiert, eingedampft und mit RIA (Radioimmuno-Assay) untersucht. Dieser aus der Reihe fallende hohe Analysenwert wirkt nicht plausibel für deutsches Trink- oder Brunnenwasser und ist wahrscheinlich durch eine Kreuzreaktivität beim RIA zustande gekommen. Allenfalls in ariden Wassermangelgebieten mit unzureichender Wasseraufbereitung zur Trinkwassergewinnung könnten derartig hohe Werte an Steroidhormonen realistischerweise auftreten, siehe [UMWELTBUNDESAMT 1995; FENT 2000] mit Werten aus Israel.

Nach [LARSSON 1999] liegen Steroidhormone im Kläranlagenauslauf hauptsächlich frei und nicht als Konjugate vor, was in Übereinstimmung mit den Aussagen von [TERNES 1999] zuzr Spaltung der Konjugate steht.

Die von [SCHARF 1998] ermittelten Daten wurden aus unfiltrierten Wasserproben ermittelt und sind deswegen höher (durch Adsorption der Kontaminanten an unpolare Schwebstoffe in Wasser).

### **6.1.2 Substanzen mit bekannter Wirkungsschwelle**

Literaturangaben zufolge zeigt Estron auf Forellen eine Wirkung ab 25-50 ng/l, Estradiol ab 1-10 ng/l, Ethinylestradiol schon ab 0,1-1 ng/l [TYLER 1998] bzw. 0,3 ng/l [SCHIEWER 2000]. Bei Zebrafischen wurde die Reproduktion ab 1 ng/l gestört [SCHMITZ 2000].

Für Nonyphenol werden Effekte ab 10 µg/l und für Octylphenol ab 3 µg/l bzw. 13 µg/l berichtet (Forellen, Zebrafisch) [FREY 2000; SCHMITZ 2000].

Für die übrigen Substanzen existieren noch keine entsprechenden Daten aus Versuchen mit Fischen. Zur Abschätzung kann jedoch die Wirkschwelle für BPA aus Daten von Vitellogenin-Tests herangezogen werden: Demnach wäre Bisphenol A ab der gleichen Größenordnung wie Nonylphenol endokrin wirksam (10 µg/l), BPA führte aber in diesem Test nicht zu einer so starken Vitellogenin-Induktion wie NP, EED und EDI [ISLINGER 1999].

Zooplankton scheint allerdings weniger empfindlich gegen EWS als höhere Organismen zu sein. [SEVERIN-EDMAIER 2000] fand keinen Effekt von EED auf Zooplankton im ökologischen Freilandtest im Konzentrationsbereich von 40 ng/l bis 550 µg/l. NP führte zu Abundanzabnahmen bei einigen Arten im Bereich 19-44 mg/l.

Von den in den eigenen Untersuchungen gefundenen Konzentrationen an Estron (0,8-8,1 ng/l) ist bei einer Einzelstoff-Wirkungsbetrachtung zumindest kein endokriner Effekt auf Forellen zu erwarten. Die Wirkschwelle liegt mindestens um den Faktor 3 darüber. Estradiol dagegen mit 12-13 ng/l in den ersten beiden Proben des Neckar-Hochwassers kann in dieser Konzentration bei Forellen Vg-Produktion induzieren.

Zu Ethinylestradiol kann aufgrund der eigenen Untersuchungen keine Aussage getroffen werden, da trotz ausgearbeiteter Anwendung von modernen Analysetechniken die Messempfindlichkeit des entwickelten Verfahrens mit einer NG von 1 ng/l zum Nachweis einer endokrinen Wirkung des Ethinylestradiols, welches bereits ab 0,1 ng/l bzw. 0,3 ng/l Effekte auf Forellen besitzt, nicht ausreicht. Den ersten Publikationen [STUMPF 1996; RURAISKI 1977] über das Vorkommen von EED zufolge wurden in OFW und TW Konzentrationen im mittleren ng/l-Bereich erwartet, dies wurde bei der Methodenentwicklung der Analytik zugrundegelegt. Daten über die erstaunlich niedrige Wirkungsschwelle von EED lagen ebenfalls nicht vor.

Die vorhandenen Konzentrationen von EED in OFW liegen nach neueren Kenntnissen (siehe o.a. Tabelle) jedoch im unteren ng/l-Bereich, zumeist unterhalb von 1 ng/l. Dies sind bei einem größeren Anteil der Proben jedoch sicherlich Konzentrationen, die (s.o.) bereits endokrine Effekte bei Forellen oder ähnlich empfindlichen aquatischen Organismen hervorrufen können. Nach [HOLLERT 2001] ist es erforderlich diese nicht nachweisbaren aber vorhandenen Konzentrationen zu berücksichtigen: Beim rechnerischen Vergleich von aufsummierten chemischen Estradiol-Äquivalenten (Konzentration einer Substanz multipliziert mit ihrer relativen Wirksamkeit, Chem-EEQ) mit Estradiol-Äquivalenten die über einen Vitellogenin-Biotest ermittelt wurden (Bio-EEQ) kam es zu einer erheblich besseren Korrelation von Chem-EEQ und Bio-EEQ wenn diese „nicht nachweisbaren aber vorhandenen“ Substanzen als Näherung mit dem Wert ihrer Nachweisgrenze mit eingerechnet wurden. Nach [LARSSON 1999] liegen Steroidhormone im Kläranlagenauslauf hauptsächlich frei und nicht als Konjugate vor; in Übereinstimmung mit der von mir vertretenen Auffassung sei EED eine potenzielle Gefahr für Fische und aquatische Organismen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Werte der Alkylphenole liegen wiederum weit unterhalb von der Wirkungsschwelle von 3 bzw. 10 µg/l und werden in den untersuchten Gewässern - eine gleichbleibende Belastung vorausgesetzt - nicht zu endokrinen Effekten an aquatischen Organismen (zumindest an allen Arten die nicht wesentlich empfindlicher als Forellen reagieren) führen.

### **6.1.3 Extrapolation von Wirkungsschwellen**

Für die anderen Substanzen liegen keine Daten aus Expositionsversuchen oder vergleichbaren Vitellogenin-Biotests vor.

Verrechnet man die Wirkungsschwelle von Estradiol (1-10 ng/l) mit den durch Biotests an Zellkulturen gewonnenen, auf Estradiol bezogenen relativen Wirkungsstärken (siehe Kap. 7.1) der übrigen Substanzen um einen Anhaltspunkt zur Beurteilung zu erhalten, so erhält man abgeschätzte, extrapolierte Wirkungsschwellen. Sie können nur als Intervall angegeben werden, da die Angaben über die relative Wirkungsstärke je nach Biotest stark schwanken können.

Die extrapolierten Wirkungsschwellen betragen 1-10 mg/l für die Phthalate (BBP und DBP) sowie 10-100 µg/l für Bisphenol A, was gut mit dem Wert von 10 µg/l aus den Vitellogenin-Tests übereinstimmt. Aus der Reihe fällt die von [HIROI 1999] ermittelte relative Wirkungsstärke von  $10^{-2}$  für BPA, wodurch sich eine Wirkschwelle von 100-1000 ng/l errechnen ließe. Der in Oberflächenwasser (Forellenbach 1) ermittelte Maximalwert von knapp 90 ng/l hat keinen großen Sicherheitsabstand zu der geschätzten Wirkschwelle (Faktor 10). Das verwendete Testsystem mit ttels eines speziellen Reportergens wird zwar in der verfügbaren Literatur von keinem anderen Autor verwendet, muss aber deswegen nicht unbedingt weniger aussagekräftig sein. Zukünftige Forschungsergebnisse werden sicher diese Frage bald erhellen und klarstellen, ob Bisphenol A eine EWS von gewässerrelevanter Konzentration ist.

Für DEHP und DEP ist keine relative Wirksamkeit veröffentlicht und deswegen keine Wirkschwellen-Prognose möglich.

Für DDE ist aufgrund des antiandrogenen Wirkungsmechanismus [GÜLDEN 1995] keine Angabe eines Äquivalenzfaktors möglich..

Die PCB besitzen eine relative estrogene Wirkungsstärke von  $10^{-4} - 10^{-6}$ , somit wäre eine Wirkungsschwelle im Bereich von 10 µg/l bis 10 mg/l zu extrapolieren. Diese Konzentrationen wurden von den untersuchten Wässern und den Literaturangaben bei weitem nicht erreicht.

Da die Angaben zur relativen Wirkungsstärke von DDT stark variieren, kann nur ein Bereich von 1 µg/l bis 1 mg/l als Wirkungsschwelle hochgerechnet werden. Für DES wäre dagegen aufgrund der zehnfachen relativen Wirkungsstärke gegenüber EDI ein Bereich von 0,1-1 ng/l anzusetzen, ein sehr niedriger Wert, wie der von EED.

Einschränkend ist zu erwähnen, dass die Werte zur relativen Wirksamkeit in vitro ermittelt wurden und nur im Falle von DDT ein lebender Gesamt-Organismus verwendet wurde. Insofern wurde nur ein einziger molekularer Wirkmechanismus (Bindung an den Estrogen-Rezeptor) oder ein zellulärer Ausschnitt (Vg-Induktion) in Betracht gezogen, während im gesamten Organismus eine höhere

(aufgrund mehrerer Angriffspunkte) oder niedrigere (Eliminationsmechanismen) Empfindlichkeit vorliegen kann.

Die in den eigenen Untersuchungen festgestellten Konzentrationen von Phthalaten liegen mit maximal wenigen  $\mu\text{g/l}$  deutlich (Faktor 1000) unter der extrapolierten Wirkungsschwelle von 1-10  $\text{mg/l}$ , Bisphenol A liegt ebenso mit maximal knapp 90  $\text{ng/l}$  im Oberflächenwasser mindestens um den Faktor 100 unter der an dieser Stelle geschätzten Wirkschwelle von 10-100  $\mu\text{g/l}$ . Zu Atrazin sind keine Daten zur relativen Wirkungsstärke vorhanden und deswegen ist keine Aussage möglich.

Der überraschende Einzelfund von DES in einem Trinkwasser (nicht quantifizierbar, jedoch halbquantitativ im unteren  $\text{ng/l}$ -Bereich anzusiedeln) wäre im für im Rohwasser und dem diesem zugrunde liegenden Oberflächenwasser lebende Fische demnach bereits endokrin wirksam.

Diese Aussagen gelten natürlich nur unter den o.g. Prämissen. Insgesamt muss gesagt werden, dass nur zu wenigen Substanzen belastbare Daten aus *in vivo* Versuchen vorhanden sind und weitere Untersuchungen notwendig sind.

#### **6.1.4 Phytosterine in Oberflächenwasser**

Einige Phytosterine (Isoflavone) sind nur um den Faktor  $10^2$ - $10^3$  schwächer wirksam als Estradiol [UMWELTRAT 1999], die Wirkschwelle läge somit im Bereich zwischen 100  $\text{ng/l}$  und 10  $\mu\text{g/l}$ . Verweiblichende Effekte an Fischen sind angesichts des Nachweises von bis zu 56  $\text{ng/l}$   $\beta$ -Sitosterol nicht wahrscheinlich. Nur in der Nähe von einer Papierfabrik in Finnland, die offensichtlich Abwässer mit hohen Konzentrationen an Phytosterinen emittierte (welche leider nicht quantifiziert wurden), wurde die östrogene Wirksamkeit als Vitellogenin-Induktion bereits nachgewiesen [MELLANEN 1999].

#### **6.1.5 Zur Kombinationswirkung**

In der Literatur wird nicht über Kombinationswirkungen *in vivo* berichtet. Lediglich eine Publikation [ARNOLD 1996] die *in vitro* eine überadditive Kombinationswirkung mit einem um  $10^3$  stärkeren Effekt als die Einzelstoff-Wirkungen nachwies, musste wegen mangelnder Reproduzierbarkeit zurückgezogen werden [MC LACHLAN 1997]. (Es ist zu bedenken, dass dieses längere Zeit unwidersprochen in „Science“ veröffentlichte Ergebnis eines 1000fachen Synergieeffektes sicherlich eine gewisse Hysterie in der Diskussion um die EWS ausgelöst hat.) Die Hypothese einer synergistischen Wirkung ist somit nicht bestätigt [STROPP 2000]. Die Angriffspunkte der betrachteten endokrin wirksamen Substanzen liegen jedoch an verschiedenen Stellen [KELCE 1997; SCHLUMPF 1997; SAMWEL 1999; HOCK 20000]:

- Bindung an den Hormonrezeptor,
- Interaktion in der Signal-Transduktionskette
- Beeinflussung der endogenen Hormonsynthese oder
- Beeinflussung des Hormonabbaus
- weiterhin wirken sie auch über nicht-genomische Mechanismen.

Aus diesen Überlegungen sollte von einer mehr als additiven Wirkung ausgegangen werden.

Dagegen steht, dass bei Gemischen

- ebenfalls mit antagonistischen Effekten zu rechnen ist,
- z.B. eine Beeinflussung der endogenen Hormonsynthese nicht bei jeder Exposition eintritt und
- auch bei gleichgerichteten Wirkungen zweier oder mehr Stoffe nur dann eine additive Wirkung resultiert, wenn hinreichende Mengen der Einzelstoffe vorliegen.

Die "dose-additivity" ist also nicht mit einer "Response-additivity" gleichzusetzen [DEGEN 2000].

Da hierzu keine systematischen Studien vorliegen, besteht auf diesem Gebiet noch Forschungsbedarf. Beispielsweise sollten Fische realitätsnahen, gleichzeitig auftretenden geringen Konzentrationen von Nonylphenol (50 ng/l), Octylphenol (20 ng/l), Bisphenol A (50 ng/l) und Estrogen (5 ng/l) gleichzeitig exponiert werden. Hierbei sollte ein voller Life-Cycle-Test (oder ein Mehrgenerationen-Test) zum Tragen kommen, da nur dadurch klar eine endokrine Kombinationswirkung auf geringem Konzentrationsniveau ausgeschlossen oder bewiesen werden kann [NAGEL 2000]. Erste Ergebnisse eines Life-Cycle-tests (mit Einzelsubstanzen) liegen vor und zeigen für 4-tert-Octylphenol ab ca. 13,5 µg/l und für Ethinylestradiol bei 1,5 ng/l einen deutlich negativen Effekt, der sich bei Zebrafischen sowohl über verlangsamte Entwicklung und geringeres Wachstum der Männchen, als auch verzögertes Paarungsverhalten auswirkt [SCHÄFERS 2000]. Beim Medaka traten Reproduktionsstörungen ab 20 µg/l NP auf, die Nachkommengeneration war allerdings um den Faktor 10 empfindlicher, ein sehr bedenklicher Effekt [KNÖRR 2000].

Solange nicht durch umfassende Forschungsergebnisse eine Entwarnung ausgesprochen werden kann, sollte das Vorsorgeprinzip angewendet werden und durch verbessertes Abwassermanagement eine Minimierung der Substanzen erzielt werden, da verschiedene Fischarten auf Umwelteinflüsse empfindlich reagierende Organismen sind (s.u.) und zu erwarten ist, dass sich die endokrine Wirkung von Umweltchemikalien, auch in Kombination mit anderen äußeren Einflüssen, sicher nicht auf einige wenige Arten beschränken wird.

### **6.1.6 Gezielte Anwendung von EWS**

Die Belastung mit EWS dürfte unterhalb der Abwassereinleitungen von Fischzuchtanlagen in Südostasien und Afrika bedenklich sein: dort ist es üblich, gezielt synthetische oder naturidentische Hormone einzusetzen. Der gesamte Bestand an Fischen wird zu dem Geschlecht mit dem höheren Gewicht umgewandelt, z.B. bei den leicht zu kultivierenden Buntbarschen (*Oreochromis niloticus*) sind dies die Männchen [GRAHL 2000; SMITHERMAN 1978; FAO FISH. REP.]. Hier wird also kein feminisierender Effekt sondern durch den Einsatz von Methyltestosteron genau das Gegenteil erzielt.

### ***6.1.7 Schlussfolgerung, Gesamtbetrachtung mit Literaturwerten***

In der Gesamtbetrachtung der aus der Literatur entnommenen und selbst ermittelten Daten von Oberflächenwässern wird ersichtlich, dass bei den stellenweise gefundenen höheren Konzentrationen von Estradiol, Ethinylestradiol, Nonylphenol, Phthalaten, Bisphenol A und DDT bei Fischen eine endokrine Wirkung möglich ist.

Kläranausläufe weisen in der Regel noch höhere Werte bis zu ebenfalls wirksamen Werten von Estron auf; in deren Abstrom wurde eine höhere Rate an feminisierten Fischen gefunden [SUMPTER 1999]. Auch in Berliner Gewässern mit Abwasserbelastung wurde bei exponierten Karpfen und Forellen gleichzeitig mit einem höheren Vitellogeningehalt eine Geschlechterverteilung zugunsten der weiblichen Tiere nachgewiesen. Die Fischbestände bestehen zu annähernd 70% aus weiblichen Tieren und sind daher in ihrer Reproduktionskapazität stark gefährdet [DIZER 2000].

Abgesehen von lokalen „hot spots“ mit besonderen Kontaminationen an den übrigen EWS dürften Bisphenol A und PCB im Normalfall nicht zu endokrinen Effekten an Fischen führen, da (s.o.) deren relative Wirkungsstärken um Zehnerpotenzen unter der von Estradiol liegen und die Konzentrationen nach derzeitiger Kenntnis nicht allzu hoch liegen.



## 6.2 Mögliche Wirkungen des untersuchten Trinkwassers auf den Menschen, Vergleich mit Literaturdaten und Lebensmitteln

### 6.2.1 *Geringe Aufnahme an EWS über Trinkwasser, höhere Aufnahme über Lebensmittel*

Die Messwerte des Trinkwassers wurden aus den o.g. Gründen über den Vergleich mit der Aufnahme über alle Lebensmittel und der endogenen Produktion an Estrogenen interpretiert: Die Gehalte der im Rahmen dieser Arbeit und der von anderen Autoren [MATIA 1991; RURAISKI 1977; KALBFUS 1997; STUMPF 1996; WEGENER 2000; SCHIEWER 2000; FENT 2000; VAN DER VELDE 1999; BÄRWINKEL 2000] untersuchten Trinkwässer (siehe Tabelle 23) liegen zu niedrig, als dass sie zu einer endokrinen Wirkung beitragen könnten. In TW liegen die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen EED-Konzentrationen übereinstimmend mit der Literatur unter 1 ng/l (genauer: unterhalb der Nachweisgrenze von 1 ng/l) so wie sie auch von den o.a. Autoren (Ausnahme: 0,2 ng/l mit GC/HRMS [KALBFUS 1997]) angegeben wird. Die Gehalte anderer Nahrungsmittel und der daraus resultierenden täglichen Aufnahme (siehe Tabelle 24) liegen mehrere Dimensionen über den geringen Gehalten des Trinkwassers, die bis jetzt bekannt sind.

Insbesondere beinhaltet der Eintragsweg über Lebensmittel insgesamt bedeutend höhere Konzentrationen an Estradiol und Estron (tägl. Aufnahme ca. 100 ng/d), doch auch an Nonylphenol (ca. 120 µg/d) und Phthalaten (ca. 0,8 mg/d) als das Trinkwasser alleine.

Die Quelle von Steroidhormonen sind vor allem tierische Lebensmittel wie Milchprodukte und Fleisch, darunter besonders Butter und Käse und Kalbsfleisch, wobei das vorherrschende Hormon allerdings Progesteron ist. Progesteron ist ein Gestagen und fungiert in der Biosynthese als Vorläufer anderer Steroidhormone, tritt aber auch in Kartoffeln in höheren Konzentrationen auf (geschätzte Aufnahme über einen „Warenkorb“ ca. 10 µg/Tag) [FRITSCHKE 1999] und könnte mit einer mit als hoch einzuschätzenden Wirksamkeit (hier: *gestagene* Wirksamkeit) bereits an die Grenze des physiologischen Bereiches gelangen.

Schätzungen zur Aufnahme an Bisphenol A gehen von maximal 1 µg/kg Körpergewicht pro Tag aus [DANIEL 1998; BOLT 2001], wobei im Tierversuch Auswirkungen auf die männliche Nachkommenschaft schon ab der doppelten Menge festgestellt wurden [FRITSCHKE 1999], während andere Studien eine endokrine Wirkung erst bei hohen Konzentrationen bzw. sogar erst im Bereich einer toxischen Wirkung festgestellt haben [JEKAT 1999]. Aufgrund des Verdachts einer Beteiligung der BPA-Exposition an der Entstehung an Brust und Prostatakrebs wurde an anderer Stelle das genotoxische Potenzial von Bisphenol A bestimmt [METZLER 1998]. Die Konzentrationen von

Bisphenol A, die nach Kontakt von Bedarfsgegenständen aus Polycarbonat mit Lebensmittelsimulantien in diesen Matrices bestimmt wurden, lagen im mg/kg-Bereich. Bisphenol A wurde von Wasserbehältern aus Polycarbonat mit bis zu 5 µg/l an Trinkwasser abgegeben [BILES 1997]. Nach Untersuchungen aus der Schweiz [BIEDERMANN 2000] an einer großen Zahl von beschichteten Konservendosen migrierten hohe Mengen an BPA-Diglycidether aus der Beschichtung heraus in das Füllgut, wobei der größte Anteil mit den Lebensmitteln zu unbekanntem Reaktionsprodukten reagierte. Quantitative Angaben wurden nicht dazu gemacht. Auch aus den Innenbeschichtungen der Deckel von Mineralwasserflaschen kann BPA in das Wasser gelangen; Konzentrationen um 500 ng/l wurden gemessen [MINISTERIUM FÜR UMWELT UND FORSTEN RHEINLAND-PFALZ 2000]. In Fischkonserven wurden Konzentrationen von 0,02 bis über 2 mg/kg BPA-Diglycidether nachgewiesen [CHEMISCHES UNTERSUCHUNGSAMT MAINZ 1997] was nahe legt, dass die Gehalte von durch Hydrolyse entstandenem BPA auch in diesem Bereich liegen können. Proben mit einem Gehalt von mehr als 1mg/kg BADGE wurden als nicht zum Verzehr geeignet nach § 17 Abs.1 Nr.1 LMBG beanstandet, da auch BADGE als gesundheitlich nicht unbedenklich zu bewerten ist. Eine Beschränkung der Verwendung von BADGE bei der Innenbeschichtung von Dosen und Deckeln ist bei der Europäischen Kommission in Diskussion [LEBENSMITTELBRIEF 2000]. Die oben zitierten 2 µg/kg Körpergewicht als Wirkungsschwelle für BPA im Tierversuch könnten in Form von gebundenem BPA beim Menschen durch Verzehr von Lebensmitteln in Konserven überschritten werden. Wie hoch nach dem Verzehr die Wirksamkeit oder Freisetzung von BPA aus den unbekanntem Reaktionsprodukten mit den eingedosten Lebensmitteln ist, bleibt derzeit noch unbeantwortet. Aus Trinkwasser ist kein nennenswerter Beitrag zur BPA-Aufnahme zu erwarten.

Bei den Phthalaten bestehen ähnliche Verhältnisse: Für BBP gilt ein TDI-Wert von 10 µg / kg Körpergewicht, für DBP ein TDI-Wert von 50 µg / kg Körpergewicht. Diese Werte werden durch Verzehr von verpackten Lebensmitteln die Phthalate als Weichmacher in Folien oder Verbundstoff-Kompartimenten enthalten, so dass sie eventuell eine Rolle für die menschliche Gesundheit spielen könnten. [WUTTKE 1999; PFORDT 1999]. Von Trinkwasser geht nach derzeitigem Kenntnisstand bei Gehalten von 1 bis 19 µg/l [BÄRWINKEL 2000] keine Gefährdung aus.

Der als endokrin wirksam eingestufte [SCHÄFER 1996; BÖHME 1998] Lebensmittelzusatzstoff (Antioxidans) BHA ist laut Zusatzstoffzulassungs-Verordnung bis zu 200 bzw. 100 mg/kg, bezogen auf den Fettgehalt bei bestimmten Lebensmitteln zugelassen. Es wird argumentiert, die tägliche geschätzte Aufnahme von BHA (ca. 0,13 mg/kg Körpergewicht) liege weit unter dem ADI-Wert, wobei aber nicht genügend berücksichtigt wird, dass die Teststrategien zur Bestimmung des Einflusses auf die Fertilität im Hinblick auf eine ausreichende Aussagekraft kontrovers beurteilt werden [VOGEL 1994; HEINRICH-HIRSCH 1998; NIEMANN 1998].

## 6.2.2 Bekannte Konzentrationen an EWS in Lebensmitteln im Vergleich zur endogenen Produktion an Estradiol und Estron

Tabelle 24: Aufnahme von EWS über die Nahrung gegen die endogene Produktion.

Substanz	tägliche Aufnahme ggf. Schätzung	max. rel. Wirksamkeit ggf. Schätzung	Estrogen-Äquivalente (EEQ)	Relevanter Effekt zu erwarten
Estradiol und Estron	100 ng	1*	100 ng	nein
Nonylphenol	120 µg	0,001	120 ng	nein
Octylphenol	1 µg	0,001	1 ng	nein
Phthalate	0,8 mg	0,00001	8 ng	nein
Bisphenol A	60 µg	0,0004	24 ng	nein
BHA	7,8 mg	0,000001	7,8 ng	nein
Pestizide (gesamt)	2,5 µg	0,001	2,5 ng	nein
PCB	1 µg	0,001	1 ng	nein
Phytosterine (Flavonoide)	1020 mg	0,0001	102 µg	ja
Phytosterine (Coumestane)	k.A.	0,1	k.A.	?
Phytosterine (Lignane)	k.A.	k.A.	k.A.	?
Phytosterole	160-360 mg	k.A.	k.A.	?
Progesteron	10 µg	k.A.	k.A.	?
<b>endogene Produktion von Estradiol und Estron</b>	<b>50-600 µg</b>	<b>1*</b>	<b>50-600 µg*</b>	<b>physiologisch</b>

\* siehe einschränkende Bemerkung unten

Zur Tabelle: Bei mehreren Literaturangaben zur Wirksamkeit (siehe Anhang) wurde der höchste Wert eingesetzt. Für die Phytoestrogene waren nur lückenhafte Daten vorhanden. Die relative Wirksamkeit ist kritisch zu sehen (Aussagekraft der größtenteils verwendeten Screening-Methoden). Bei auf das Körpergewicht bezogenen Angaben wurde ein Durchschnittswert von 60 kg Körpermasse angenommen

Die Spannweite der endogenen Produktion von 50 bis 600 µg Estradiol und Estron pro Tag ist in den Unterschieden zwischen Mann und Frau, interindividuellen Unterschieden, den Rhythmen innerhalb des weiblichen Zyklus sowie quantitativ verschiedener Produktion vor und nach Menopause zu begründen.

Literaturstellen: zahlreiche Angaben aus dem Review von [FRITSCHKE 1999] entnommen, ferner aus [PFRORDT 1999; BERATUNGSKOMMISSION DER SEKTION TOXIKOLOGIE DER DGPT 1998; GRUNOW 1999; UMWELTRAT 1999; BÖHME 1998; GREIM 1998; KUCHEN 1998; HARTMANN 1996; DANIEL 1998; BOLT 2000, 2001].

Anmerkung: Ausgeklammert (aufgrund der nicht verallgemeinbaren, weil individuellen Verschreibung) ist in dieser Betrachtung natürlich die medizinische Anwendung von Östrogenen, die z.B. in der „Pille“ eine tägliche Aufnahme von Ethinylestradiol oder Mestranol von 30-50 µg pro Tag bewirken kann.

### **6.2.3 Die endogene Produktion überwiegt**

Um ein Maß für die wahre Belastung zu finden, muss ein gemeinsamer Nenner für die Bewertung der verschiedenen Einzelsubstanzen gefunden werden. Dieser ergibt sich durch die Multiplikation von Konzentration und relativer östrogenen Wirksamkeit als Estradiol-Äquivalent (EEQ). Beim Vergleich von endogener Produktion und Aufnahmepfad über die Lebensmittel fällt auf, dass außer den Flavonoiden (Phytosterine) keine Stoffgruppe der inkorporierten EWS den ng-Bereich an EEQ überschreitet. Einschränkend muss gesagt werden, dass bei [FRITSCH 1999] Estradiol und Estron nur undifferenziert gemeinsam in der Summe von 50-600 µg/Tag an endogener Produktion angegeben werden, wodurch der Äquivalenzfaktor (relative Wirksamkeit) von 1 (per definitionem) nicht korrekt ist, sondern aufgrund der geringeren Wirksamkeit von Estron (siehe die höhere Wirkschwelle als EDI bei [TYLER 1998]) darunter liegt und sich schätzungsweise im Bereich von 0,5 bis 1 bewegen wird. Demzufolge fallen die Phytoestrogene (s.u.) etwas mehr ins Gewicht als durch Tabelle 24 ersichtlich wird. Zur Empfindlichkeit des menschlichen Organismus gegenüber östrogenen Fremdbelastung siehe jedoch Kapitel 6.2.6.

### **6.2.4 Exkurs: Phytosterine in Lebensmitteln**

Eine quantitativ und qualitativ wichtige Rolle spielen die Phytoestrogene, die in zahlreichen pflanzlichen Lebensmitteln mit zum Teil beachtenswerten Konzentrationen von bis zu mehreren 100 mg/kg (Leinsamen; Soja und andere Leguminosen) enthalten sein können [FRITSCH 1999]. Sie besitzen eine vergleichsweise hohe biologische Wirksamkeit [HOFFMANN 2000]. In den Bereich möglicher biologischer Effekte kommen mit Sicherheit die Flavanoide mit geschätzten 102 µg/Tag an EEQ, verglichen mit 50-600 µg an endogener täglicher Produktion an Estrogenen. Besondere Aufmerksamkeit sollte den Coumestanen gewidmet werden, da sie mit einer relativen Wirksamkeit von 0,001 bis 0,1 schnell ebenfalls in den physiologischen Bereich gelangen könnten, über deren Gehalte in Lebensmitteln wurde in der Literatur jedoch bisher nicht berichtet. Für die weiteren Phytosterine, die Lignane und Phytosterole, ist von ähnlichen Verhältnissen bezüglich Vorkommen und Wirksamkeit auszugehen, wobei konkrete Literaturdaten jedoch ebenfalls fehlen.

Die Phytoestrogene werden im allgemeinen relativ schnell inaktiviert und vom Körper über Konjugation wieder ausgeschieden [DEUTSCHER BUNDESTAG, DRUCKSACHE 1997]. Die Bewertung der Phytoestrogene in der Nahrung ist nicht eindeutig, da ihnen ein protektiver Einfluss bei der Entstehung von Brust- und Prostatakrebs sowie antioxidative Effekte auf Zell-Ebene zugeschrieben werden [WUTTKE 1999; STRAUSS 1999; JOHNSON-THOMPSON 2000;

FRITSCH 1999]. Bevor die Rolle der Phytoestrogene in der Nahrung beurteilt werden kann, müssen die vorhandenen Wissenslücken (siehe

Tabelle 24) durch Bestimmung der hormonellen Wirksamkeit in vivo sowie der stoffbezogenen Aufnahmemenge geschlossen werden. Weil gerade bei den Phytoestrogenen Präkursoren und wirksame Metaboliten auftreten, reichen screenig-Methoden nicht aus; Biotransformation und Bioakkumulation müssen berücksichtigt werden. Für Genistein, welches hauptsächlich in der Sojabohne, aber auch in anderen Pflanzen auftritt, wurde eine Stoffbewertung durch das Beratergremium für Altstoffe erstellt. Da asiatische Frauen in der üblichen Kost größere Mengen an Genistein aufnehmen, sollte ein negativer Effekt auf die Fruchtbarkeit erkennbar sein, dieser ist jedoch nicht nachweisbar. Erwiesen ist dagegen das um 25% niedrigere Brustkrebsrisiko asiatischer Frauen und deren verlängerter Zyklus von durchschnittlich 32 Tagen. Diese Effekte werden auf den hohen Soja-Verzehr zurückgeführt [GDCH 2000], wenn auch ein kausaler Zusammenhang noch nicht klar erwiesen ist. Es ist höchst unwahrscheinlich, dass Phytoestrogene, die in asiatischen Ländern durch den Verzehr von Sojaprodukten in hohem Maße aufgenommen werden, dort DES-ähnliche Effekte bewirken könnten [STRAUSS 1999].

Bei Schafen und Vögeln kann die Fruchtbarkeit durch hohe Genisteinmengen herabgesetzt werden [GREIM 2000]. In vitro kann je nach Konzentration der Isoflavone aus der Sojabohne eine Verlangsamung oder auch Stimulation des Wachstums von Brustkrebszellen auftreten [ZIMMERLI 2000].

Phytoestrogene haben offensichtlich einen deutlichen Beitrag zur estrogenen Gesamtexposition des Menschen, was aber nicht unbedingt bedeuten muss, dass sie adverse Effekte auf die Reproduktion besitzen [DEGEN 2000]. Klinisch feststellbare Effekte wie Feminisierungen sind trotz des bereits 40jährigen Gebrauchs von Säuglings-Sojadiäten in den USA bis heute noch nicht bekannt geworden, diese Thematik sollte deswegen wissenschaftlich erforscht werden [ZIMMERLI 2000]. Das Fehlen von negativen Erfahrungen in der Ernährung von Säuglingen mit Sojaprodukten (in den USA seit 40 Jahren etabliert) reicht allerdings nicht aus, um von einer Sicherheit auszugehen [HOFFMANN 2000]. In der Lebensmittelwirtschaft und -wissenschaft wird die Aufnahme von Phytosterolen vielfach als positiv angesehen; der Europäischen Kommission liegen mehrere Anträge zur Zulassung von verschiedensten Phytosterol-angereicherten Lebensmitteln als „Novel Food“ vor. Für Snackartikel und Backwaren sind diese Anträge bereits genehmigt worden. Die positive Wirkung von Phytosterolen im menschlichen Organismus soll auf der höheren Affinität dieser Substanzen an die Lipoprotein-Micellen (LDL, HDL, VLDL, Chylomikronen) gegenüber Cholesterol beruhen. Somit würde Cholesterol aus den Micellen verdrängt, dem enterohepatischen Kreislauf entzogen und mit den Faeces ausgeschieden. [EUROPÄISCHE KOMMISSION 2000; MINISTERIUM FÜR UMWELT UND FORSTEN RHEINLAND-PFALZ 2000]. Dies würde den Cholesterolspiegel im Blut auf „natürliche“ Weise senken und das Risiko für Gefäßkrankheiten erniedrigen. M.E. stellt dies jedoch

nur ein „Kurieren an Symptomen“ dar, da die Ursache für das häufige Auftreten von mit Cholesterol verbundenen Krankheiten und Todesfällen in der falschen Ernährung und Lebensweise von breiten Schichten der Bevölkerung zu sehen ist. Die angewendeten Konzentrationen von Phytosterolen in Lebensmitteln sollen im unteren Prozentbereich liegen, was zu einer täglichen Aufnahme im Gramm-Bereich führen würde. Als jüngste Innovation sollen nun auch Wurst, Käse und Joghurt im Bereich von 1-4% mit Phytosterolen angereicht werden. Zu dem Antrag auf das Inverkehrbringen diesen Novel Foods sind Bedenken der Mitgliedsstaaten der EU eingereicht worden: Die tägliche Verzehrsmenge an Phytosterolen würde sich um ein Vielfaches erhöhen: von 200-400 mg (eine andere Menge als [FRITSCH 1999] annimmt) auf täglich kapp 20 Gramm (!). Eine langfristige Absenkung des Cholesterinspiegels ist bedenklich und führt vermutlich zu tiefgreifenden Störungen des Stoffwechsels. Auch die Spiegel von Carotinoiden im Blut können abgesenkt werden. Derartig angereicherte Lebensmittel sollten nur als diätetische Lebensmittel mit Warnhinweis in den Verkehr kommen [In: BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ, ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT 2001].

Anscheinend fließen jedoch die hormonähnlichen Wirkungen der Phytosterole in die Beurteilung der Novel-Food-Anträge nicht ein, Näheres ist derzeit nicht bekannt.

Im Vergleich zu den Phytosterinen erscheinen die ungewollt mit der Nahrung als Kontaminanten (Alkylphenole, Bisphenol A, DDT und DDE, PCB sowie Phthalate) oder natürlicherweise vorhandenen (Steroidhormone) aufgenommenen EWS folglich als irrelevant. Zum gleichen Ergebnis kommt [BOLT 2001] für Nonylphenol und Bisphenol A.

### **6.2.5 *Sonstige Quellen der Inkorporation von EWS***

Als Eintragsquelle kommen Phthalate in Hausstaub (Konzentration: unterer g/kg-Bereich) und Raumluft die eingeatmet werden [PFORDT 1999, BRIAN 2000; SCHNEIDER 1995] hinzu, sowie die Migration von Phthalaten (und auch z.T. Nonylphenol) aus Kinderspielzeug aus Weich-PVC das in den Mund genommen wird [BECKER 2000; FIALA 2000]. Die möglichen Mengen die inkorporiert werden könnten wurden jedoch nicht ermittelt. Eine bisher ebenfalls nicht quantifizierte Belastungsquelle stellen Zahnfüllungen aus Kunststoff dar, weil sie Bisphenol A als Monomer enthalten und an den Speichel abgeben können [SONNENSCHNEIN 1998; SCHIEWER 2000].

### **6.2.6 *Toleranz des Menschen gegen EWS***

Die hohe Empfindlichkeit von ungeborenem Leben im Mutterleib gegenüber vielen Einflüssen (also auch gegenüber EWS) steht gegenüber den hohen Levels von endogenen Estrogenen des mütterlichen Organismus während der Schwangerschaft. Es muss postuliert werden, dass die sich entwickelnden

Organismen einen Schutzmechanismus gegen diese hohen Estrogenkonzentrationen besitzen, die im gemeinsamen Blutkreislauf zirkulieren.

Eine nicht unerhebliche Toleranz des Menschen gegenüber einer estrogenen Fremdbelastung wird als Folgerung aus der Tatsache gezogen, dass unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten zu einer unterschiedlichen Exposition mit Phytoestrogenen führen [DEUTSCHER BUNDESTAG 1998]. Säuglinge, die mit Milchersatzdiäten auf Sojabasis oder gar kompletten Sojadiäten ernährt wurden, besaßen mit 0,5 – 2 µg/ml sehr hohe Konzentrationen von Isolavonen (Genistein und Daidzein) im Blut, welche die normalen Östrogenkonzentrationen (30-60 pg/ml) um das rund 20.000fache überstiegen.

Als weiteres Argument gegen einen Einfluss der hier betrachteten endokrin wirksamen Substanzen auf die Reproduktion des Menschen spricht die Tatsache, dass die in der Vergangenheit beobachteten adversen Effekte durch die Einwirkung von DES auf Föten nur deswegen auftraten, weil DES zum einen eine sehr estrogen hohe Wirksamkeit besitzt (10mal so stark wie Estradiol im E-Screen), zum anderen in sehr hohen Dosen im mittleren mg/Tag-Bereich verabreicht wurde. Fernerhin besaßen die unter DES-beeinflußter Schwangerschaft geborenen männlichen Nachkommen keine verminderte Samenzellqualität oder –quantität. Sowohl die Wirksamkeit als auch die Aufnahmemengen der hier diskutierten Xenoestrogene liegen um mehrere Größenordnungen unter der von DES, sodass der Anstieg der Häufigkeit von genitalen Missbildungen und Probleme mit der männlichen Fertilität (siehe Einleitung) mit größter Wahrscheinlichkeit nicht auf die EWS zurückzuführen ist. Fernerhin ist die Anzahl der Spermien wahrscheinlich weniger wichtig für die Fortpflanzung als lange angenommen wurde [DEHN 1996].

### ***6.2.7 Kritische Bemerkungen zur Beurteilung der hormonellen Wirksamkeit***

- a) Die verfügbare Literatur zur Beurteilung der Wirkung der EWS allgemein auf den Menschen bezieht sich zumeist auf eine toxikologische Bewertung, nicht auf die endokrine Wirkung; Für den Menschen wurde bislang kein Wert zu einer Wirkungsschwelle von endokrin wirksamen Substanzen ermittelt. Zur Bewertung einer hormonellen Wirksamkeit sind außerdem andere Studien als die angewendeten etablierten toxikologischen Methoden erforderlich, somit ist der Kenntnisstand unzureichend. Die Daten wie die No-Effect-Levels und tolerierbaren Aufnahmemengen, die aus Versuchen mit bisheriger toxikologischer Methodik ermittelt wurden, können auf dem Gebiet der EWS nicht verwertet werden.
- b) Zu den Biotests mit Fischen und einer möglichen Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen muss angemerkt werden, dass einige Fischarten auf gewisse Umweltbedingungen sehr sensitiv reagieren: Die Geschlechterverteilung kann sich in einem See durch klimatische

Veränderungen, durch schwankendes Nahrungsangebot oder durch Populationsdruck stark verschoben. [PLUTA 2000] Dies macht Fische einerseits zu empfindlichen Mess-Organismen, andererseits wird die Gefährdung von Fischarten deutlich. Ähnlich empfindlich sind nach neueren Erkenntnissen auch Amphibien. [PALMER 1995, 1999; LUTZ 1999; LYONS 1995] Die *Bioakkumulation* an EWS die der endokrinen Wirkung vorangeht, erfolgt durch Anreicherung aus dem durch die Kiemen strömenden Wasser sowie durch Nahrungsaufnahme. Der Mensch reichert die EWS hauptsächlich über den Nahrungsweg (*Biomagnifikation*) an und reagiert nicht auf eine entsprechende Art sensitiv auf Umwelteinflüsse (Ausnahme: Aufnahme von Phthalaten über die Lunge)

- c) Die Exposition an endokrin wirksamen synthetischen Stoffen ist vor dem Hintergrund der unvermeidlichen Aufnahme an Phytoestrogenen über pflanzliche Lebensmittel und der physiologischen Variation endogener Hormonspiegel zu sehen [BERATUNGSKOMMISSION DER SEKTION TOXIKOLOGIE DER DGPT 1999] (siehe deswegen Tabelle 24)
- d) Im Vergleich zwischen endogenen Estrogenen, synthetischen Xenoestrogenen und Phytoestrogenen ist zu berücksichtigen, dass die Bioverfügbarkeit der synthetischen Xenoestrogene nicht durch die Bindung an Transportproteine vermindert wird, woraus eine höhere Bioverfügbarkeit resultiert. Dieser Effekt äußert sich nur bei *in vivo* Tests, wo komplette Organismen mit ihrer Vielfalt von Regulationsmechanismen als Testobjekte dienen. Dies wird z. B. an der Relation zwischen den festgestellten Wirkschwellen von EDI und NP bei Forellen (nur drei bis vier Zehnerpotenzen, s.o.) gegen die in Zelltests ermittelte relative Wirksamkeit (vier bis sechs Zehnerpotenzen, siehe Kap. 1.4) deutlich. Die *in vivo* Wirkungsstärke ist auch bei anderen Substanzen deutlich höher, als die *in vitro* Daten zunächst vermuten lassen [BERATUNGSKOMMISSION DER SEKTION TOXIKOLOGIE DER DGPT 1999]. Aus diesem Grunde sind Ergebnisse aus Expositionsversuchen gegenüber denen von Zelltests Das Ausmaß dieser Diskrepanz *in vitro* gegenüber *in vivo* dürfte nach derzeitiger Einschätzung der Situation (die zumeist aus den Ergebnissen von Zelltests basiert) jedoch nicht so schwerwiegend sein, dass ein Einfluss der ungewollt aufgenommenen synthetischen Xenoestrogene auf die menschliche Reproduktionsfähigkeit gegeben wäre. Tierversuche sind zur Abschätzung der hormonellen Wirksamkeit unersetzlich [BOLT 2000]
- e) Die in der bunten Presse gedruckten Schlagzeilen dokumentieren zwar das Problembewusstsein und die Relevanz des umstrittenen, jedoch in einigen systematischen Studien nachgewiesenen Sinkens der Samenzellzahl –und Qualität [THIERFELDER 1998; AUGER 1995] und der hohen Anzahl ungewollt kinderloser Paare [ÄRZTE-ZEITUNG 1994; 1995]. Ein direkter Zusammenhang zwischen diesen Problemen und der Belastung an EWS kann jedoch nicht festgestellt werden [HARRISON 1997].



- f) Eine Beurteilung der menschlichen Exposition *insgesamt* und der möglichen endokrinen Wirkung bleibt somit aufgrund einiger offener Fragen dieser Thematik (vielfältige Expositionspfade, umfassende Analytik repräsentativer Nahrungsmittel, neuartige Studien zur hormonellen Wirksamkeit) zunächst vorläufig. Eine endgültige Beurteilung ist zukünftigen Forschungsergebnissen vorbehalten. Die in dieser Arbeit gezogenen Schlussfolgerungen sind demnach vor diesem Hintergrund auch kritisch zu sehen.
- g) Ein anderer Effekt von EWS könnte eine Wirkung auf das Gehirn des Kindes während der Schwangerschaft sein. Die Folge wäre eine verminderte Intelligenz [ÄRZTE-ZEITUNG 1997 (101)].

### ***6.2.8 Einfluss der allgemeinen Lebensfaktoren auf die Fertilität***

Der Stellenwert allgemeiner Lebensfaktoren wird in der gesamten Diskussion über EWS zu wenig beachtet. Das Rauchen und der Alkoholkonsum sind klare Negativfaktoren für die Fertilität der Frau, Stress (also die Psyche) wirkt sich ungünstig auf den Hormonhaushalt und somit die Reproduktionsfähigkeit aus. Auch unzureichender Schlaf kann sich Untersuchungen zufolge schadhaft auswirken. Trivial erscheinen zwar die Studien, die sich mit der negativen Wirkung zu enger Unterwäsche auf die Fertilität beschäftigen, jedoch ist dieser Einfluss genauso wichtig wie die Frage nach einer gesunden, ausgewogenen Ernährung und Lebensweise [ODENWALD 1989; DOBSON 2000; SHARPE 1993; BUJAN 1998; GERHARD 1993, 1994; SAFE 1994; KRAUSE 1992; DE KRETZER 1998; ÄRZTE-ZEITUNG 1996 (65), 1994 (212); BEDFORD 1991]. Auch Medikamente können die menschliche Fertilität beeinträchtigen [SCHILL 1987, 1989].

### **6.2.9 *Schlussfolgerung***

Meines Erachtens ist der Beitrag des untersuchten Trinkwassers und des Trinkwassers allgemein innerhalb der Gesamtaufnahme an EWS verschwindend gering.

Steroidhormone und synthetische EWS in Nahrungsmitteln insgesamt sind wiederum wahrscheinlich als weit weniger gewichtig als die Aufnahme an Phytosterinen zu betrachten.

Die Aufnahme an EWS über die Lebensmittel ist nach bisheriger Kenntnis als nur ein kleiner Faktor neben allgemeinen Lebensfaktoren auf die Reproduktionsfähigkeit des Menschen zu interpretieren.

Ausnahmen können von lokalen Spitzenbelastungen herrühren.

## 6.3 Ausblick

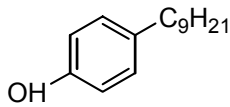
- Da zur Zeit Daten nur recht begrenzt vorliegen, ist es notwendig weitere Messungen zur Ermittlung von Gehalten an anthropogenen EWS und Phytoestrogenen in Lebensmitteln durchzuführen. Auch Bedarfsgegenstände wie Verpackungsfolien, Dosenbeschichtungen und Plastikteller sind in die Untersuchungen einzubeziehen.
- Relative Wirksamkeiten der Einzelsubstanzen müssen in normierten, standardisierten *in vivo*-Tests nach neuen Reststrategien, nicht den bisherigen toxikologischen Methoden ermittelt werden.
- Durch Studien muss Klarheit in die Frage gebracht werden, ob Soja-basierende Milchersatzdiäten wirklich keinen epidemiologisch feststellbaren Effekt auf die Reproduktionsfähigkeit besitzen.
- Mittels Biotests als Screening-Verfahren sind „endokrin auffällige“ Gewässer aufzudecken und in einem zweiten Schritt mittels chemischer Spurenanalytik die Kontaminationen an EWS zu ermitteln. Die erhaltenen Werte sind mit den relativen Wirksamkeiten zu verrechnen (Gegenüberstellung von Bio-EEQ und Chem-EEQ) um somit sicherzustellen dass die gefundenen Substanzen (und keine derzeit noch unbekanntes EWS) die Auslöser für den Ausschlag im Biotest sind. Sicherlich werden EED und EDI hier die relevantesten EWS darstellen.
- Die Kontaminationsquellen von industriellen Kontaminanten als EWS sind aufzudecken und zu eliminieren. Für die Steroidhormone sind neuartige Abwasseraufbereitungsverfahren mit einer höheren Abbauleistung gefragt. Vielversprechend erscheinen hier die Untersuchungen zum Einsatz von Membrantechnik.
- Strukturell den EWS ähnliche Substanzen und in hoher Produktionsmenge emittierte Substanzen sind im Biotest auf endokrine Wirkungen zu untersuchen. Hierbei sind cytotoxische gegen endokrine Effekte bei der Interpretation von Biotests abzuwägen [HOLLERT 2001]. Z. B. ist die Kontaminante BCPS als persistente Substanz mit Akkumulationspotential wie die PCB und EWS-ähnlicher Struktur auf ihr endokrines Potential zu testen.
- Wie empfindlich sind welche im Wasser lebende Organismen? Weitere Spezies sind auf ihre Sensibilität gegen EWS zu testen. Zusätzlich müssen Kenntnisse darüber erlangt werden, welche Substanzen welche Effekte auf Zell-Ebene, in einem gesamten Organismus sowie auf ganze Populationen und Ökosysteme bewirken.
- Da DES als Spur in einer Trinkwasserprobe nachgewiesen wurde, ist das Vorkommen von DES mit besonderer Aufmerksamkeit zu verfolgen.

## 7 Anhang

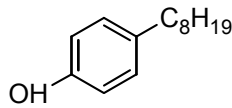
### 7.1 Stoffdaten und allgemeine Informationen zu den untersuchten Substanzen

Die Auswahl der zu analysierenden Substanzen orientierte sich an der abzuschätzenden Expositionsrelevanz, d.h. an der östrogenen Potenz der Stoffe, ihrer zu erwartenden Konzentration in der Umwelt, bekannter Belastung des Menschen und ihrer Persistenz [SCHÄFER 1996]. Dazu gehören auch Substanzen, die trotz schneller Elimination oder schnellem Abbau in der Umwelt wegen ständiger Zufuhr oder konstantem Eintrag „steady state“-Konzentrationen (Phthalate) in Körper oder Umwelt aufbauen können. In der Bundesrepublik Deutschland nicht angewendete Pestizide sowie Stoffe mit gleichzeitig geringer östrogenen Wirksamkeit und vergleichsweise geringem industriellen Ausstoß wurden nicht berücksichtigt, ebensowenig die Phytoöstrogene, weil a) deren Haupt-Eintragsweg ganz offensichtlich die Nahrungsmittel sind [FRITSCHE 1999], und b) diese Substanzen im Laufe der Evolution im Gegensatz zu den anderen ausgewählten endokrinen Disruptoren schon seit Jahrmillionen (in gleich zunehmenden Konzentrationen) in der Umwelt vorhanden sind und deshalb eine Adaption der im Wasser lebenden Organismen an die Hintergrundkonzentrationen dieser Substanzen anzunehmen ist.). Im Unterschied dazu gelangen die natürlichen Steroidhormone erst durch die neuzeitlichen Emissionen an häuslichem Abwasser in einem der Evolution eventuell abträglichen Maße in die Gewässer.

## Nonylphenol/Octylphenol



$C_{15}H_{24}O$ , MG 220,2 (NP)

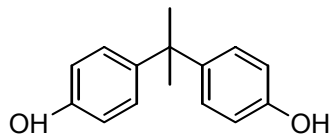


und  $C_{14}H_{22}O$ , MG 206,2 (OP)

Verwendung, Wirkung, Eigenschaften	<p>NP und OP werden im allgemeinen durch Ethoxylierung weiterverarbeitet (Ethoxylierungsgrad: 2-40). Sie dienen zur Herstellung von Tensiden, Emulgatoren, Kunstharzen, Antioxidantien, Stabilisatoren für Ethylcellulose, Weichmachern für Celluloseester, Additiven, Kautschukchemikalien, Fungiziden, Bakteriziden, Antikonzepionsmitteln, und Pharmazeutika. 4-tert.-Octylphenol wird auch als Desinfektionsmittel eingesetzt.</p> <p>[BERATERGREGIUM ALTSTOFFE 1988; RÖMPP 1995]</p>
Produktions- oder Verwendungsmenge	<p>17.000 t APEO wurden in der BRD 1985 verwendet</p> <p>47.000 t NP EU-weit (Produktion)</p> <p>23.000 t NP BRD 1995 (Produktion)</p> <p>[BERATERGREGIUM ALTSTOFFE 1988; PILZ 1999; LEISEWITZ 1998]</p>
Eintragungsweg	<p>Über die Tenside, wobei die Ethoxylat-Ketten abgebaut und oxidiert werden, sodass Alkylphenoethoxylate (APEO mit 1-5 Ethoxygruppen), deren Carbonsäuren sowie freie AP nebeneinander vorliegen. Persistent sind nur die AP. Sie werden aufgrund ihres hydrophoben Charakters zum Teil in Klärschlamm angereichert, aus welchem sie nach Ausbringung auf landwirtschaftlicher Fläche durch Auswaschung wieder in die Gewässer zurückgelangen können. Aerob erfolgt allerdings ein weiterer Abbau.</p> <p>Der Eintrag in die Gewässer und in Klärschlamm ist nach der Verzichtserklärung (1986) der dt. APEO-verwendenden Industrieverbände und in der Schweiz nach dem Verwendungsverbot für APEO bedeutend zurückgegangen.</p> <p>Europa: NPEO sollen lt. Pariser Kommission bis 2000 substituiert werden</p> <p>USA: APEO werden weiterhin verwendet</p> <p>[BERATERGREGIUM ALTSTOFFE 1988; BLACKBURN 1995; GIGER 1984, 1995, 1999, SCHAFFNER 1999; SCHIEWER 1999; KREUZINGER 1998]</p>

Wirkungsstärke	<p>NP: <math>9 \times 10^{-6}</math> VgFHT  <math>3 \times 10^{-5}</math>, <math>3 \times 10^{-6}</math>, <math>1 \times 10^{-3}</math> E-screen  <math>1 \times 10^{-5}</math> RHT</p> <p>OP: <math>3,7 \times 10^{-5}</math> VgFHT  <math>3 \times 10^{-4}</math>, <math>10^{-5}</math> - <math>10^{-4}</math> E-screen  <math>10^{-3}</math>, <math>4 \times 10^{-4}</math> RHT</p> <p>[GÜLDEN 1997; SOTO 1992, 1995; JOBLING 1995, 1993]</p>
Gefundene Konzentrationen in Wasser	<p>freies Nonylphenol:</p> <p>2,2-44 µg/l (KLA, Schweiz)  0,1-5,4 µg/l (KLA, England)  bis 37 µg/l (KLA, Schottland)  bis 45 µg/l (Flusswasser, Schweiz)  0,2-53 µg/l (Flusswasser, England)  0-15 µg/l (KLA, Niederlande)  0,2-12 µg/l (Zürichsee)  6-340 ng/l (bayr. Fließgewässer)  0,2-26 µg/l (Flusswasser, Spanien)  bis 140 ng/l (Trinkwasser, Spanien)  840 ng/l (KLA, Schweden)  bis 61 µg/l (kontaminiertes GW, USA)  bis 290 ng/l (Berliner Oberflächengewässer)</p> <p>freies Octylphenol:</p> <p>bis 23 µg/l (kontaminiertes GW, USA)</p> <p>[GÜLDEN 1997; DE VOOGT 1999; AHEL 1999; ZELLNER 1995; MATIA 1991; LARSSON 1999; RUDEL 1998; PILZ 1999]</p>
BCF	<p>Freies Nonylphenol:</p> <p>1,4-13 (Miesmuscheln)  bis 100 (Fische)  6600-10.000 (Grünalge)  13-408 (Fische)  25-100 (Regenbogenforellen)  3400 (Muscheln)  100 (Krebse)  1300 (Fische)</p> <p>[BERATERGREGIUM ALTSTOFFE 1988; GÜLDEN 1997]</p>
Besonderheiten	<p>NP und OP besitzen in den industriell verwendeten Formulierungen verzweigt-kettige Isomere, so werden bei der Gaschromatographie von NP fünf Haupt-Isomere gefunden, bei OP zwei.  Der Anreicherungsfaktor im Sediment liegt bei <math>10^3</math>-<math>10^4</math>.  Wirkungen in Fischen ab 10 µg/l (NP) und 3 µg/l (OP).</p> <p>[ZELLNER 1995; TYLER 1998; FREY 2000]</p>

## Bisphenol A

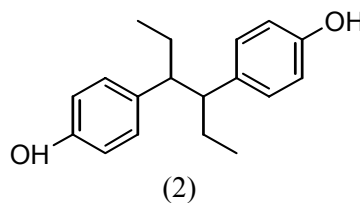
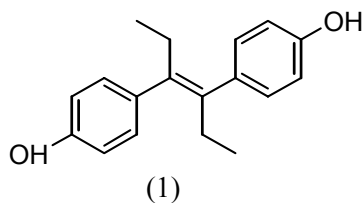


2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)-propan, C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>, MG 228,28

Verwendung, Wirkung, Eigenschaften	BPA wird als Antioxidans für Weichmacher, als Fungizid, als Zwischenprodukt bei der Herstellung von Epoxid-, Polycarbonat- (CD's, Plexiglas), Phenol-Harzen, Gerbstoffen, als farbentwickelndes Additiv in Thermopapier, in Zahnfüllmaterialien und Farbstoffen sowie als Flammenschutzmittel eingesetzt. [GÜLDEN 1997; RÖMPP 1995; PILZ 1999 ]
Produktions- oder Verwendungsmenge	210.000 t in Deutschland 1995 produziert [GÜLDEN 1997]
Eintragsweg	k.A.
Wirkungsstärke	10 <sup>-4</sup> E-screen 4 x 10 <sup>-4</sup> E-screen ≤ 4 x 10 <sup>-4</sup> VgFHT 10 <sup>-4</sup> RHT 10 <sup>-2</sup> Transkriptionstest [GÜLDEN 1997; ROUTLEDGE 1996; HIROI 1999]
Gefundene Konzentrationen in Wasser	Unterer ng/l – Bereich OFW Niederlande Bis 31 ng/l OFW Deutschland [BELFROID 1999; PILZ 1999]
BCF	<100 (Karpfen) 5-68 (k.A.) [GÜLDEN 1997; FRIEDERICH 1999]

Besonderheiten	<p>BPA ist eine der weltweit meistproduzierten Chemikalien. Bei den höheren Rückständen in Lebensmitteln entsteht BPA durch Hydrolyse von Bisphenol A–Diglycidether (BADGE), welches als Monomer für die Innenbeschichtung von Konservendosen sowie für Kunststoffgeschirr verwendet wird und als Verunreinigung darin enthalten ist. BPA wird in Wasser schnell abgebaut: Die biologische <math>t_{1/2}</math> beträgt 1-4 Tage. Hauptemissionsquelle: Recycling von Thermopapier.</p> <p>Der inhibitorische Effekt von Serum auf den Zugang von BPA zum Estrogenrezeptor ist sehr gering, daraus ergibt sich eine hohe Bioverfügbarkeit.</p> <p>[GÜLDEN 1997; MOCK 2000; THEOBALD 1999; RICHARD 1999; BILES 1997; METZLER 1998; NAGEL 1997; PILZ 1999; LEISEWITZ 1998]</p>
----------------	--

### Diethylstilbestrol (1), Hexestrol (2)



(1) 4,4'-(1,2-Diethylethylenyl)-diphenol,  $C_{18}H_{20}O_2$ , MG 268,4

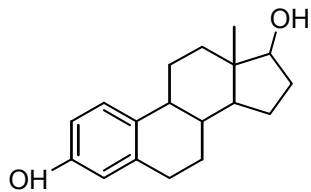
(2) 3,4-Bis(4-hydroxyphenyl)-hexan,  $C_{18}H_{22}O_2$ , MG 270,4

Verwendung, Wirkung, Eigenschaften	<p>Als veterinärmedizinisches Anabolikum ist DES verboten, als Cytostatikum wird DES noch in der Behandlung von Prostatacarcinomen eingesetzt. Zwischen 1938 und 1971 dagegen wurde DES schwangeren Frauen in den USA und Europa in der irrigen Annahme, es könne Fehlgeburten verhindern und zum Erhalt der Schwangerschaft beitragen, verabreicht. Die Töchter der behandelten Frauen zeigten ein erheblich höheres Risiko für Adenokarzinome an Cervix und Vagina, Früh- Fehl- und Totgeburten waren bei diesen Töchtern im Erwachsenenalter überdurchschnittlich häufig. Die Söhne der behandelten Frauen hatten eine dreifach höhere Rate an genitalen Missbildungen. Die Fruchtbarkeit wurde aber nicht durch die Exposition der Feten mit DES beeinflusst. In der Gruppe der Mütter wurde über eine erhöhte Brustkrebs-Inzidenz berichtet.</p> <p>HEX wird kaum noch in der Humanmedizin, dagegen veterinärmedizinisch zur künstlichen Kapaunisierung (chemische Kastration) verwendet. Es wirkt anabol wie DES.</p> <p>[WILCOX 1995; GÜLDEN 1997; RÖMPP 1995; DEGEN 1995]</p>
------------------------------------	---



Produktions- oder Verwendungsmenge	k.A.
Eintragsweg	Möglicher Eintrag nach illegalem Einsatz als Anabolika
Wirkungsstärke	DES: 10 E-screen 1 RHT  HEX: Doppelt so wirksam wie DES [Gülden 1997; Solmssen 1945]
Gefundene Konzentrationen in Wasser	DES: 0-0,8 ng/l (TW, Quellen und Brunnen) [RURAINSKI 1977]
BCF	k.A.
Besonderheiten	DES und HEX besitzen die höchste estrogene Wirksamkeit aller der in der Literatur als EWS angegebenen Substanzen.

## Estradiol

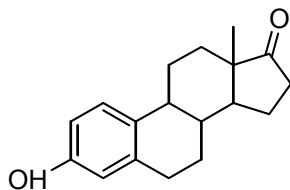


Estra-1,3,5(10)-trien-3,17b-diol C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>, MG 272,37

Verwendung, Wirkung, Eigenschaften	Weibliches Sexualhormon, Hauptsekretionsprodukt, zusammen mit den anderen natürlichen Estrogenen verantwortlich für die Ausprägung der sekundären Geschlechtsmerkmale der Frau, zusammen mit Gestagenen werden fast alle Reproduktionsvorgänge der Frau reguliert. Als Anabolikum ist EDI in der Tiermast (in der BRD verboten), besonders in Form seiner Ester in 3- od. 17-Stellung (Benzoate, Valerianate, Cipionate etc.) gegen drohende Fehlgeburten, klimakterische Beschwerden etc.; nach der Menopause zur Behandlung von Brustkrebs u. Osteoporose. Auch Estrogen-Konjugate können biologisch aktiv sein und oral verabreicht werden.  [TURAN 1995; RÖMPP 1995]
Produktions- oder Verwendungsmenge	Endogene Produktion 40 µg/d, abh. von Zyklusphase Anteilige Exkretion über Urin ca. 3 µg/d, schwängere Frauen: 260 µg/d über Urin.  [TURAN 1995; KALBFUS 1997]

Eintragsweg	<p>Über Urin und Faeces in Form von Konjugaten (Sulfate, Glucuronate) und zum geringen Teil unkonjugiert ausgeschieden, gelangt EDI in die Kanalisation und die Abwasseraufbereitung. In der Kläranlage erfolgt ein teilweiser Abbau, die Konzentrationen an freiem Hormon können jedoch aufgrund von mikrobieller Spaltung der Konjugate steigen. Durch Oxidation im Kontakt mit belebtem Klärschlamm werden Estron und Estriol gebildet. Die Literaturangaben zur Stabilität von Estrogenen in Belebtschlamm gehen sehr stark auseinander. Ein Gesamt-Gehalt (frei+konjugiert) an EDI wurde für den Main (ohne mikrobiellen Abbau) mit 1,2 ng/l abgeschätzt. Da für den Veterinärbereich keine Daten vorliegen, kann nur ergänzend gesagt werden, dass Funde von EDI zum Teil aus natürlicher endogener Produktion von Tieren oder evtl. auch aus illegalem Einsatz als Masthilfsmittel entstammen können. Massentierhaltung kann zu regional erhöhten Estrogenwerten führen.</p> <p>[TERNES 1999; KALBFUS 1997; TURAN 1995; NORPORTH 1973]</p>
Wirkungsstärke	1 (per definitionem, bei allen Tests)
Gefundene Konzentrationen in Wasser	<p>1 - 21 ng/l KLA Deutschland  n.n. (&lt;1ng/l) OFW Deutschland  n.n. (&lt;1ng/l) TW Deutschland  0 - 0,94 ng/l TW, Quellen und Brunnen, zumeist &lt;0,2 ng/l  &lt;0,5 ng/l OFW, 15 deutsche Flüsse  &lt;0,5 – 3 ng/l KLA Deutschland  &lt;0,5 – 64 ng/l KLA Kanada  2,7 - 48 ng/l KLA England</p> <p>[STUMPF 1996; RURAINSKI 1977; TERNES 1999; TYLER 1998]</p>
BCF	Natürlicherweise im Körper vorhanden

## Estron

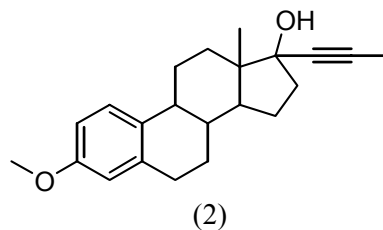
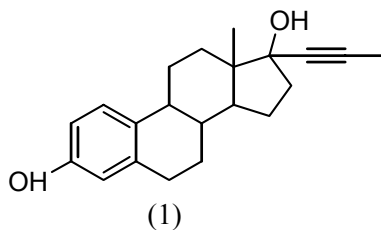


3-Hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17-on C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>, MG 270,36

Verwendung, Wirkung, Eigenschaften	<p>Das Ketosteroid Estron gehört wie Estradiol zu den Estrogenen; beide Verbindungen können im Organismus wechselweise ineinander übergehen. Spurenweise kommt es wie auch Estriol in einigen Pflanzen vor, z.B. im Palmkernöl. Verwendung als Estrogen (siehe auch: Estradiol).</p> <p>[TURAN 1995; RÖMPP 1995]</p>
------------------------------------	--

Produktions- oder Verwendungsmenge	Exkretion über Urin aus endogener Produktion 4-8 µg/d. Schwangere Frauen: 600 µg/d [TURAN 1995]
Eintragsweg	Urin und Faeces, größtenteils als Konjugate (siehe auch: Estradiol). [TURAN 1995]
Wirkungsstärke	k.A., aber aufgrund der sehr ähnlichen Struktur wie EDI sollte die Bindung an den Rezeptor und somit die Wirkungsstärke annähernd gleich sein, zumindest in der gleichen Größenordnung
Gefundene Konzentrationen in Wasser	n.n. (<1 ng/l) KLA Deutschland n.n. (<1 ng/l) OFW Deutschland n.n. (<1n g/l) TW Deutschland <0,5 – 1,6 ng/l OFW, gef. in 3 von 15 deutschen Flüssen <0,5 – 70 ng/l KLA Deutschland <0,5 – 48 ng/l KLA Kanada 1,4 - 76 ng/l KLA England [STUMPF 1996; RURAISKI 1977; TERNES 1999; TYLER 1998]
BCF	Natürlicherweise im Körper vorhanden

### Ethinylestradiol (1), Mestranol (2)



(1) 17 $\alpha$ - Ethinyl- 1,3,5(10)- östratrien- 3,17b- diol C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>, MG 296,41

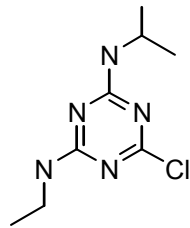
(2) 17 $\alpha$ - Ethinyl- 3- methoxy- 1,3,5(10)- estratrien- 17b- ol C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>, MG 310,42

Verwendung, Wirkung, Eigenschaften	EED ist nicht nur selbst ein starkes Estrogen, das weit verbreitet in Antikonzeptionsmitteln enthalten ist, sondern dient auch zur Synth. anderer Estrogene (MES ist der 3-Methylester) und Gestagene. Durch die Einführung der Ethinylgruppe ist der D-Ring beträchtlich gegen Oxidation stabilisiert. Aufgrund der erhöhten Stabilität wird EED zu 80-100% unverändert ausgeschieden. Nur bei 1-2% des eingenommenen EED wird die Ethinylgruppe abgespalten.  Die Konjugation mit Glucuron- oder Schwefelsäure erfolgt nach der raschen Resorption in Magen und Dünndarm überwiegend an Position 3, doch es finden trotz der sterischen Hinderung durch den Ethinylsubstituenten auch an der 17 $\beta$ -OH-Gruppe Konjugationsreaktionen statt. Im Serum ist überwiegend (6:1 – 22:1) das Sulfat zu finden, welches eine Reserve an bioverfügbarem, noch
------------------------------------	---

	<p>freizusetzendem EED darstellt.</p> <p>MES wird rasch und nahezu vollständig in der Mucosa des Dünndarms zu EED demethyliert.</p> <p>[TAUBERT 1995; TURAN 1995; RÖMPP 1995]</p>																																
Produktions- oder Verwendungsmenge	<p>EED: 93 kg (Verordnungsmenge 1993)</p> <p>MES: k.A.</p> <p>[UMWELTBUNDESAMT 1994]</p>																																
Eintragsweg	<p>EED: Urin: 1-7% unkonjugiert, 60-80% als Glucuronide, 20-30% als Sulfate Stuhl: 1-7% unkonjugiert, 20-60% als Glucuronide, 15-60% als Sulfate</p> <p>Untersuchungen deuten darauf hin, dass EED seinen eigenen Abbau hemmt.</p> <p>MES: nach Umwandlung in EED (s.o.) ebenso</p> <p>[TAUBERT 1995; RÖMPP 1995]</p>																																
Wirkungsstärke	<p>EED besitzt eine nahezu gleiche Bindungsaffinität zu den Estrogenrezeptoren im Uterus wie EDI. MES wird praktisch nicht gebunden.</p> <p>EED stimuliert in den Zielorganen die Synthese der Estrogen- und Progesteronrezeptoren.</p> <p>[TAUBERT 1995]</p>																																
Gefundene Konzentrationen in Wasser	<p>EED:</p> <table> <tr><td>bis 62 ng/l</td><td>KLA Deutschland</td></tr> <tr><td>&lt;1 - 4 ng/l</td><td>OFW Deutschland</td></tr> <tr><td>n.n. (&lt;1 ng/l)</td><td>TW Deutschland</td></tr> <tr><td>n.n. (&lt;0,2 ng/l)</td><td>OFW Deutschland</td></tr> <tr><td>ca. 0,3 – 0,5 ng/l</td><td>KLA Deutschland</td></tr> <tr><td>0 - 22,5 ng/l</td><td>TW Deutschland</td></tr> <tr><td>n.n. (&lt; 0,5 ng/l)</td><td>OFW Deutschland</td></tr> <tr><td>1 – 15 ng/l</td><td>KLA Deutschland</td></tr> <tr><td>1-42 ng/l</td><td>KLA Kanada</td></tr> <tr><td>n.n. – 7 ng/l</td><td>KLA England</td></tr> </table> <p>MES:</p> <table> <tr><td>4-20 ng/l</td><td>KLA Deutschland</td></tr> <tr><td>&lt;1 - 1 ng/l</td><td>OFW Deutschland</td></tr> <tr><td>n.n. (&lt;1 ng/l)</td><td>TW Deutschland</td></tr> <tr><td>n.n. (&lt; 0,5 ng/l)</td><td>OFW Deutschland</td></tr> <tr><td>&lt;1 - 4 ng/l</td><td>KLA Deutschland</td></tr> <tr><td>n.n. (&lt;1 ng/l)</td><td>KLA Kanada</td></tr> </table> <p>[STUMPF 1996; KALBFUS 1997; RURAINSKI 1977; TERNES 1999; TYLER 1998]</p>	bis 62 ng/l	KLA Deutschland	<1 - 4 ng/l	OFW Deutschland	n.n. (<1 ng/l)	TW Deutschland	n.n. (<0,2 ng/l)	OFW Deutschland	ca. 0,3 – 0,5 ng/l	KLA Deutschland	0 - 22,5 ng/l	TW Deutschland	n.n. (< 0,5 ng/l)	OFW Deutschland	1 – 15 ng/l	KLA Deutschland	1-42 ng/l	KLA Kanada	n.n. – 7 ng/l	KLA England	4-20 ng/l	KLA Deutschland	<1 - 1 ng/l	OFW Deutschland	n.n. (<1 ng/l)	TW Deutschland	n.n. (< 0,5 ng/l)	OFW Deutschland	<1 - 4 ng/l	KLA Deutschland	n.n. (<1 ng/l)	KLA Kanada
bis 62 ng/l	KLA Deutschland																																
<1 - 4 ng/l	OFW Deutschland																																
n.n. (<1 ng/l)	TW Deutschland																																
n.n. (<0,2 ng/l)	OFW Deutschland																																
ca. 0,3 – 0,5 ng/l	KLA Deutschland																																
0 - 22,5 ng/l	TW Deutschland																																
n.n. (< 0,5 ng/l)	OFW Deutschland																																
1 – 15 ng/l	KLA Deutschland																																
1-42 ng/l	KLA Kanada																																
n.n. – 7 ng/l	KLA England																																
4-20 ng/l	KLA Deutschland																																
<1 - 1 ng/l	OFW Deutschland																																
n.n. (<1 ng/l)	TW Deutschland																																
n.n. (< 0,5 ng/l)	OFW Deutschland																																
<1 - 4 ng/l	KLA Deutschland																																
n.n. (<1 ng/l)	KLA Kanada																																
BCF	k.A.																																
Besonderheiten	<p>MES ist wg. Metabolisierung zu EED nach oraler Einnahme im Wasser nicht als menschliches Ausscheidungsprodukt nachweisbar. Die Funde von MES im Kläranlagenein- und ausläufen können nur Fehlbefunde</p>																																

	<p>oder sehr große Mengen unsachgemäß entsorgter Altmedikamente darstellen. Nur auf Organismen, wie der Mensch enzymatisch MES zu EED demethylieren, könnte MES endokrin einwirken.</p> <p>Die z.T. in der Literatur mittels Trimethylsilylierung und normalauflösender GC-MS ohne doppelte Fragmentierung erhaltenen Funde von EED sind mit großer Wahrscheinlichkeit fehlerbehaftet bis falsch-positiv, da in Wasser eine coeluiierende Substanz mit ähnlichem Massenspektrum wie EED auftritt. (siehe Kap. 5)</p>
--	--

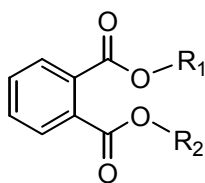
## Atrazin



2-Chlor-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5- triazin C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub> MG. 215,7

Verwendung, Wirkung, Eigenschaften	<p>Selektives systemisches Herbizid gegen Unkräuter u. Ungräser im Mais-, Zuckerrohr-, Sorghum- u. Ananasbau sowie in Kombination mit anderen Herbiziden auf Nichtkulturland. Die Anwendung von Atrazin ist in Deutschland seit 1991 verboten, trotzdem wird es immer noch gefunden (Restbestände, illegale Verwendung), auch die beiden Abbauprodukte Desisoprylatrazin und Desethylatrazin.</p> <p>[RÖMPP 1995]</p>
Produktions- oder Verwendungsmenge	k.A.
Eintragsweg	Rinse-off von Feldern und Höfen
Wirkungsstärke	k.A.
Gefundene Konzentrationen in Wasser	100 – 500 ng/l Rohwasser [FÄRBER 1991 ]
BCF	k.A.
Besonderheiten	Stärkere toxische als endokrine Wirkung

## Phthalate



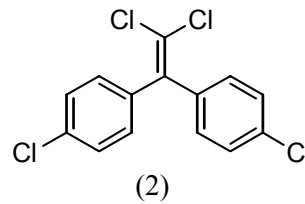
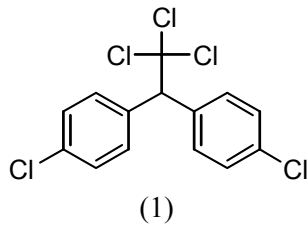
Diester der ortho-Phthalsäure

$R_1, R_2 =$  Alkylreste, z.B.  $R_1 = R_2 = C_2H_5$  bei DEP,  $R_1 = n$ -Butyl,  $R_2 =$  Benzyl bei DBP

<p>Verwendung, Wirkung, Eigenschaften</p>	<p>Weichmacher vor allem für PVC, als fettfreie Schmiermittel, Schaumverhütungsmittel, Lösungsmittel, als Trägerflüssigkeit in Pestiziden, Kosmetika, Parfüms, als Insektenrepellent und als Vorprodukte. für Duroplaste, synthetische Fasern, Folien, Lackharze (Phthalatharze, s. Alkydharze.          Von den verschiedenen Phthalaten, die als Weichmacher Verwendung finden, sind Diethylhexylphthalat (DEHP) und Diisodecylphthalat (DIDP) die mengenmäßig bedeutendsten Produkte. Der Anteil des DEHP an der Gesamtproduktion von Phthalat-Weichmachern schwankt länderabhängig zwischen 60 u. 70%. Neben den neutralen Phthalsäurediestern gibt es noch saure Phthalate., in denen nur eine Carboxy-Gruppe verestert ist. Phthalate sind nahezu ubiquitär. Ursachen hierfür sind u.a. hohe Produktions- und Anwendungsmengen, eine Vielzahl von Einsatzbereichen, die Bio- u. Geoakkumulationstendenz und eine gewisse Stabilität gegenüber physikalisch-chemischen und biologischen Abbaureaktionen .          DEHP adsorbiert stark an Partikel und wird im Sediment oder Klärschlamm nicht weiter abgebaut.          [RÖMPP 1995; PILZ 1999]</p>
<p>Produktions- oder Verwendungsmenge</p>	<p>68 000 t (USA 1979)          22 000 t (BRD 1986)          400 000 t (D 1994/95)          2,7 Mio t (weltweit 80er Jahre)          1,4 Mio t (Westeuropa 1999)          0,9 Mio t (Westeuropa)          [GÜLDEN 1997; HEBERER 1994; PFORDT 1999; PILZ 1999; SCHIEWER 1999]</p>

Eintragsweg	Über Luft- und Abwasserpfad und direkten Eintrag in die Gewässer
Wirkungsstärke	BBP $3 \times 10^{-6}$ E-screen (MCF-7) $10^{-6} - 10^{-5}$ transformierte MCF-7-Zellen DBP $\leq 10^{-6}$ transformierte MCF-7-Zellen [GÜLDEN 1997]
Gefundene Konzentrationen in Wasser	bis 7,5 mg/l DEHP OFW Niederlande 0,9 – 3,5 µg/l DEHP TW Niederlande 1 – 19 µg/l gesamt TW Deutschland bis 6,6 µg/l DEHP OFW Deutschland bis 3,1 µg/l DBP OFW Deutschland bis 200 ng/l BBP OFW Deutschland [VAN DER VELDE 1999; BÄRWINKEL 2000; PILZ 1999]
BCF	Nach der in der Literatur vorherrschenden Meinung ist eine Akkumulation nicht zu erwarten. [PFORDT 1999]
Besonderheiten	Literaturdaten über endokrine Wirksamkeit sind widersprüchlich. Auch über die Persistenz gibt es widersprüchliche Angaben (1/2 Tag – mehr als 100 Jahre) Nahezu ubiquitär aufgrund hoher Produktions- und Anwendungsmengen. Wegen Blindwertproblematik sind Maßnahmen zur Minimierung von Kontaminationen bei der Analytik notwendig. [PFORDT 1999; FURTHMANN 1994; BÄRWINKEL 2000]]

## DDT und DDE



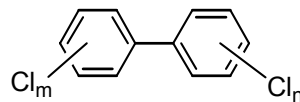
(1) DDT: 1,1,1-Trichlor-2,2-bis(4-chlorphenyl)ethan  $C_{14}H_9Cl_5$  MG 354,5

(2) DDE: 1,1-Dichlor-2,2-bis(4-chlorphenyl)ethen  $C_{14}H_8Cl_4$  MG 318

Verwendung, Wirkung, Eigenschaften	DDT: Breit wirksames nicht-systemisches Insektizid mit langanhaltender Kontakt- u. Fraßgiftwirkung. Hauptmetabolit des DDT ist DDE, das keine insektizide Wirkung mehr besitzt. DDE ist der persistenteste Metabolit in der Umwelt. [RÖMPP 1995; OPITZ 1998]
Produktions- oder Verwendungsmenge	60 000 t (Welt, 1976) [GÜLDEN 1997]
Eintragsweg	Noch als Insektizid in 3. Welt-Ländern eingesetzt. In Industrieländern sind noch persistente Rückstände (und weitere Metaboliten wie DDD und DDA) zu finden.
Wirkungsstärke	o,p'- DDT $10^{-3} - 10^{-5}$ Rattenuterus $10^{-3}$ RHT $10^{-6}$ E-screen p,p'- DDT $10^{-6}$ E-screen p,p'- DDE k.A. weil antiandrogen [GÜLDEN 1997; OPITZ 1998; KELCE 1995]
Gefundene Konzentrationen in Wasser	p,p'-DDT bis 1400 ng/l OFW Deutschland p,p'- DDE bis 80 ng/l OFW Deutschland [GÜLDEN 1997]
BCF	p,p'-DDT 1900 – 330.000 p,p'- DDE 2700 – 81.000 [GÜLDEN 1997]
Besonderheiten	Verboten seit 1972 (BRD) und 1988 (DDR)



## PCB



polychlorierte Biphenyle (Chlorbiphenyle) Verbindungsklasse  $C_{12}H_{(10-m-n)}Cl_{m+n}$  MG 189–499

<p>Verwendung, Wirkung, Eigenschaften</p>	<p>Aus 209 isomeren u. homologen Vertretern bestehende Verbindungsklasse; Gemische mit einem Chlor-Gehalt von ca. 30–60%. Ihre niedrigen Dampfdrücke, hohe Viskosität u. thermische Stabilität, Chemikalienresistenz, hohe Dielektrizitätskonstanten und flammhemmende Wirkung machen sie zur Verw. als Kühl- u. Isolierflüssigkeiten in Transformatoren, als Weichmacher für Lacke u. Klebstoffe sowie als hydraul. Flüssigkeiten, Wärmeüberträgeröle usw. besonders geeignet. Mögliche Anwendung finden sie auch in Pigmenten, Einbettungsmittel, Textilhilfsmittel, Durchschreibepapieren und Pestiziden. Interesse für den öffentlichen Gesundheitsschutz erlangten sie durch die Verwendung als Dichtungsmassen in Schulen und anderen öffentlichen Gebäuden in den 60er und 70er Jahren.</p> <p>[RÖMPP 1995; GÜLDEN 1997; SCHÖLER 1999; KOMMISSION "HUMAN-BIOMONITORING" DES UMWELTBUNDESAMTES 1999; MINISTERIUM FÜR BAUEN UND WOHNEN NORDRHEIN-WESTFALEN 1996]</p>				
<p>Produktions- oder Verwendungsmenge</p>	<p>Bisher weltweit insgesamt 1-2 Mio t</p> <p>[SCHÖLER 1999]</p>				
<p>Eintragsweg</p>	<p>Durch langanhaltende , vielfältige und breite Anwendung, mangelhafte Entsorgung, Unfälle und Leckagen mittlerweile ubiquitär vorhanden. Sekundäre Quellen sind Leckagen von Mülldeponien, Ablagerung von Klärschlamm, Transport von Flußsedimenten. PCB entstehen als Nebenprodukte bei Verbrennungsvorgängen (Müllverbrennung, Stahlfabriken, Metallrückgewinnung) und werden nach Emission atmosphärisch transportiert.</p> <p>[GÜLDEN 1997; SCHÖLER 1999]</p>				
<p>Wirkungsstärke</p>	<p>Nicht alle PCB besitzen eine estrogenere Wirkung, die aktiven PCB haben relative Wirkungsstärken von</p> <table data-bbox="539 1630 877 1702"> <tr> <td><math>10^{-4} - 10^{-6}</math></td> <td>Rattenuterus</td> </tr> <tr> <td><math>10^{-4} - 10^{-5}</math></td> <td>E-screen</td> </tr> </table> <p>Es liegen verschiedene Wirkmechanismen vor: Bindung an den Estrogenrezeptor sowie Bindung an den Ah-Rezeptor (coplanare PCB und deren Derivate) ,außerdem Hemmung der Estrogen-Desaktivierung in der Leber.</p> <p>[GÜLDEN 1997; SAFE 1993; GARNER 2000]</p>	$10^{-4} - 10^{-6}$	Rattenuterus	$10^{-4} - 10^{-5}$	E-screen
$10^{-4} - 10^{-6}$	Rattenuterus				
$10^{-4} - 10^{-5}$	E-screen				

Gefundene Konzentrationen in Wasser	<p>1 – 40 ng/l OFW Deutschland  5 -100 ng/l OFW Deutschland  [ SCHÖLER 1999; KOMMISSION "HUMAN-BIOMONITORING" DES UMWELTBUNDESAMTES ]</p>
BCF	<p>k.A.; log POW 4,7 bis 6,8, Akkumulation nachgewiesen.  [ SCHÖLER 1999; KOMMISSION "HUMAN-BIOMONITORING" DES UMWELTBUNDESAMTES 1999 ]</p>
Besonderheiten	<p>Der Einsatz der PCB wurde durch EG-Richtlinie von 1976 u. die 10. VO zum Bundesimmissionsschutzgesetz (26.7.1978) stark eingeschränkt, z.B. auf geschlossene Systeme. Der Grund hierfür ist nicht nur ihre Toxizität, sondern vor allem ihre Persistenz. Die toxikologischen Daten und Expositionsdaten für die einzelnen Kongenere, deren Eigenschaften sehr unterschiedlich sind, sind unzureichend. Problematisch bei der Beurteilung der PCB sind die Verunreinigungen mit Dioxinen und Furanen. Das Gefährdungspotential geht nach heutigen Erkenntnissen vorwiegend von coplanaren und mono-ortho-substituierten PCB aus.  [ RÖMPP 1995; KOMMISSION "HUMAN-BIOMONITORING" DES UMWELTBUNDESAMTES 1999; SCHÖLER 1999 ]</p>

**Weitere endokrin wirksame Substanzen, die nicht in dieser Multimethode erfasst werden können oder aus anderen Gründen nicht untersucht wurden:**

**Tabelle 25: weitere EWS**

Dioxine und Furane	Es waren keine apparativen Möglichkeiten zur Untersuchung von Ultraspuren vorhanden.
Butylphenol, Pentylphenol	Besitzen nur eine geringe Relevanz wegen geringer Anwendungsmengen
PAKs	Nicht methodenkompatibel aufgrund der verwendeten GC-Injektionsmethode.
Tributylzinn	Extraktion sowie Injektion nicht geeignet zur Analytik von Zinnorganika.
Estriol	Keine Wiederfindung, zu polar für die Festphasenextraktion.
2-Hydroxyestron	Coelution mit einer Silikonverunreinigung, dabei gleiches MS/MS-Spektrum. Siehe Kap. 5.
Methoxychlor	Zersetzt sich im Injektor.
Phytoestrogene	Auf dem Gebiet „Wasser“ wird eine geringe Relevanz postuliert.
Mycoestrogene	Ebenfalls geringe Relevanz.
Dieldrin, Toxaphen, Chlordan, Heptachlor, Kepon, Mirex, Toxaphen	Werden nicht in Deutschland angewendet. Es werden deswegen keine nennenswerten Rückstände erwartet.

## 7.2 Literaturliste

- Wie Umweltöstrogene auf den Menschen wirken, lässt sich noch nicht abschätzen. In: *Ärzte-Zeitung* (1997), Nr. 101 (04.06.), S. 11
- Spermienqualität ging in den letzten 20 Jahren zurück. In: *Ärzte-Zeitung* (1994), Nr. 212, S. 16
- Wird Samenqualität durch Immunsuppression verschlechtert?. In: *Ärzte-Zeitung* (1996), Nr. 65 (09.04.), S. 13
- Verwendung von BADGE und NOGE bei der Beschichtung von Dosen und Deckeln. In: *Lebensmittelbrief* (2000), Nr. 7/8, S. 197
- ACHT ARBEITSAUSSCHUSS CHEMISCHE TERMINOLOGIE IM DIN DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG: *DIN 32645 Nachweis- Erfassungs- und Bestimmungsgrenze* In: DIN DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG Berlin: Beuth Verlag, 1994
- ACKERMANN, G.; FENT, K.: Quantification of Vitellogenin and Estrogen Receptor mRNA in Fish Liver in vivo and in vitro Using Competitive Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- ADLERCREUTZ, H.: Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. In: *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7 (1995), S. 103-112
- ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W.: Phyto-oestrogens and Western diseases. In: *Ann Med* 29 (1997), Nr. 2, S. 95-120.
- AHEL, M.; MOLNAR, E.; IBRIC, S.; RUPRECHT, C.; SCHAFFNER, C.; GIGER, W.: Surfactant-derived Alkylphenolic Compounds in Sewage Effluents and Ambient Waters in Switzerland before and after Risk Reduction Measures. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- AHERNE, G. W.; BRIGGS, R.: The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. In: *J Pharm Pharmacol* 41 (1989), Nr. 10, S. 735-736
- ARBEITSGRUPPE "ANABOLICA" NACH § 35 LMBG: Bestimmung von hormonell wirksamen Stoffen (Anabolica) in Fleisch (Muskelgewebe), Leber, Niere und Fettgewebe (vorläufige Methode). In: *Bundesgesundheitsbl* (1989), Nr. 2, S. 76-80
- ARNOLD, S. F.; KLOTZ, D. M.; COLLINS, B. M.; VONIER, P. M.; GUILLETTE, L. J.; MCLACHLAN, J. A.: Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. In: *Science* 272 (1996), Nr. 5267, S. 1489-92.
- ÄRZTE-ZEITUNG: Umweltfaktoren mindern die Spermatogenese nur selten. In: *Ärzte-Zeitung* (1996), Nr. 173, S. 15

- ASCHEGRAU, P.; COOGAN, F.; QUINN, M.; CASHINS, L.: Occupational exposure to estrogenic chemicals and the occurrence of breast cancer: an exploratory analysis. In: *Am. J. Ind. Med.* 34 (1998), Nr. 1, S. 6-14
- ASHBY, J.: Endocrine Disruption Data Derived from in vivo Assays. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- ASHBY, J.; HOUTHOF, E.; KENNEDY, S.J.; STEVENS, J.; BARS, R.; JEKAT, F.W.; CAMPBELL, P.; VAN MILLER, J.; CARPANINI, F.M.; RANDALL, G.L.: The challenge posed by endocrine-disrupting chemicals.. In: *Environ Health Perspect* 105 (1997), Nr. 2, S. 164-9
- AUGER, J.; KUNSTMANN, J.M.; CZYGLIK, F.; JOUANNET, P.,: decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. In: *New England Journal of Medicine* 332 (1995), Nr. 5, S. 281-285
- B. J. DANZO 1: The effects of environmental hormones on reproduction. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 54 (1998), Nr. 11, S. 1249-1264
- BALDWIN, W.S.; GRAHAM, S. E.; SHEA, D.; LEBLANC, G. A.: Metabolic androgenization of female *Daphnia magna* by the xenoestrogen 4-nonylphenol. In: *Environ. Toxicol. Chem.* 16 (1997), Nr. 9, S. 1905-1911
- BARRETT, J.: Phytoestrogens. Friends or foes? [news]. In: *Environ Health Perspect* 104 (1996), Nr. 5, S. 478-482
- BÄRWINKEL, D.; HAUFE, J.; KROH, L.W.: Methoden zur Routineanalytik von Phthalaten in Trinkwasser und Lebensmitteln sowie aus der Umwelt mittels Passagewässer. In: *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* (2000), Nr. 11, S. 411-416
- BÄRWINKEL, L.; KROH, L.W.; HAUFE, J.: Zur Analytik von Phthalaten in Lebensmitteln und Trinkwasser. In: *Lebensmittelchemie* 54 (2000), S. 34-35
- BATTY, J.; LIM, R.: Morphological and reproductive characteristics of male mosquitofish (*Gambusia affinis holbrooki*) inhabiting sewage-contaminated waters in New South Wales, Australia. In: *Arch Environ Contam Toxicol* 36 (1999), Nr. 3, S. 301-307
- BEARD, A.P. et al.: Thyroid function and effects on reproduction in ewes exposed to the organochlorine pesticides lindane or pentachlorophenol (PCP) from conception. In: *J Toxicol Environ Health.* 58 (1999), Nr. 8, S. 509-530
- BEARER, C. F.: Biomarkers in pediatric environmental health: a cross-cutting issue. In: *Environ Health Perspect* 106 Suppl 3 (1998), S. 813-816
- BECKER, S.: Gefahr für Kinder. In: *Öko-Test* (2000), Nr. 5, S. 58-61
- BEDFORD, J. M.: Effects of elevated temperature on the epididymis and testis: experimental studies. In: *Adv Exp Med Biol* 286 (1991;286(2):19-32.), Nr. 2, S. 19-32.

- BELFROID, A.C.; VAN DER HORST, A.; RIJS, G.B.J.; SCHÄFER, A.J.; VETHAAK, A.D.: Occurrence of Natural Estrogenic Hormones and Bisphenol-A in Waste Water and in Environmental Matrices Research in the Framework of National Pilot-Survey on Estrogenic Compounds (Loes). In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Francini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- BENNETAU - PELISSERO, C.; LATONNELLE, K.; KAUSHIK, S.; LE MENN, F.: Relative Sensitivity of Siberian Sturgeon (*Acipenser baeri*) and Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) to the Dietary Phytoestrogen Genistein. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Francini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- BENSON, W.H.; NIMROD, A.C.; COLLEY, W.C.: Interaction of Endocrine Modulating Substances with and Alteration of Teleost Estrogen Receptor. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Francini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- BERATERGHEMIUM FÜR UMWELTRELEVANTE ALTSTOFFE: *BUA-Stoffbericht 13: Nonylphenol* Weinheim: VCH, 1988. - ISSN 1792601
- BERATUNGSKOMMISSION DER SEKTION TOXIKOLOGIE DER DGPT: Hormonell aktive Substanzen in der Umwelt. In: <http://pharmakologie.pharmacol.uni-mainz.de/Heft24/HORMONE.html> (1998)
- BERESFORD, N.; ROUTLEDGE, E. J.; HARRIS, C. A.; SUMPTER, J. P.: Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity. In: *Toxicol Appl Pharmacol* (2000), Nr. 1, S. 22-33
- BERGERON, J. M.; CREWS, D.; MCLACHLAN, J. A.: PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. In: *Environ Health Perspect* 102 (1994), Nr. 9, S. 780-781
- BERTRAND, M. J.; CARAZZAT, D.; SARRASIN, B.: Selective gas chromatographic analysis of monohydroxy steroids as their cyanosyl derivatives. In: *J. Chromatogr. Sci.* (1990), Nr. 4, S. 194-9
- BGVV: Dioxine und PCB in Lebensmitteln. In: <http://www.bgvv.de/presse/aktuell>
- BICKNELL, R. J.; HERBISON, A. E.; SUMPTER, J. P.: Oestrogenic activity of an environmentally persistent alkylphenol in the reproductive tract but not the brain of rodents. In: *J Steroid Biochem Mol Biol* 54 (1995), Nr. 1-2, S. 7-9
- BIDLEMAN, T. F.; RENBERG, L.: Determination of vapor pressures for chloroguaiacols, chloroveratroles, and nonylphenol by gas chromatography. In: *Chemosphere* 14 (1985), Nr. 10, S. 1475-81
- BIEDERMANN, M.; WAGNER, C.; GROB, K.; IMHOF, D.; BEUGGERT, H.: Bisphenol-A-Diglycidether (BADGE) and Novolak Glycidyl Ether (NOGE) as Additives in Can Coatings. In: *Mitt. Lebensm. Hyg.* 91 (2000), S. 274-286
- BIGSBY, R.; CHAPIN, R.E.; DASTON, G.P.; DAVIS, B.J.; GORSKI, J.; GRAY, L.E.; HOWDESHHELL, K.L.; ZOELLER, R.T.; VOM SAAL, F.S.: National strategy on endocrine disruptors. In: *Environ Health Perspect* 107 (1996), Nr. Suppl 4, S. 917-8

BIGSBY, R.; CHAPIN, R.E.; DASTON, G.P.; DAVIS, B.J.; GORSKI, J.; GRAY, L.E.; HOWDESHELL, K.L.; ZOELLER, R.T.; VOM SAAL, F.S.: Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development.. In: *Environ Health Perspect* 107 (1999), Nr. Suppl 4, S. 613-8

BILES, J. E.; MCNEAL, T. P.; BEGLEY, T. H.; HOLLIFIELD, H. C.: Determination of Bisphenol-A in Reusable Polycarbonate Food-Contact Plastics and Migration to Food-Simulating Liquids. In: *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997), Nr. 9, S. 3541-3544

BILLINGHURST, Z; CLARE, A.S.; DEPLEDGE, M.H.: Effects of 4-n-nonylphenol and 17beta-oestradiol on early development of the barnacle *Elminius modestus*. In: *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 257(2) (2001), Nr. Mar 15, S. 255-268

BINGHAM, S. A.; ATKINSON, C.; LIGGINS, J.; BLUCK, L.; COWARD, A.: Phyto-oestrogens: where are we now?. In: *Br J Nutr* 79 (1998), Nr. 5, S. 393-406

BIRKHÄUSER, M.H.: Effect of Oestrogen-like Substances on Male Fertility. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)

BISHOP, C. A.; BROOKS, R. J.; CAREY, J. H.; NG, P.; NORSTROM, R. J.; LEAN, D. R.: The case for a cause-effect linkage between environmental contamination and development in eggs of the common snapping turtle (*Chelydra S.serpentina*) from Ontario, Canada. In: *J Toxicol Environ Health* 33 (1991), Nr. 4, S. 521-547

BJERREGAARD, P.; KORSGAARD, B.; CHRISTIANSEN, L.B.; PEDERSEN, K.L.; CHRISTENSEN, L.J.; PEDERSEN, S.N.; HORN, P.: Monitoring and risk assessment for endocrine disruptors in the aquatic environment: a biomarker approach.. In: *Arch Toxicol Suppl* 105 (1998), Nr. B, S. 97-107

BLACKBURN, M.A.; WALDOCK, M.J.: Concentrations of Alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. In: *Wat. Res.* 29 (1995), Nr. 7, S. 1623

BLAHA, T.; STÖHR, K.: Lebensmittelsicherheit als Kontinuum von der landwirtschaftlichen Urproduktion bis zum Verzehr. In: *Bundesgesundhbl* 42 (1999), Nr. 6, S. 466-470

BLAU, K.; KING, G.: *Handbook of Derivates for Chromatography* London: Heyden & Son, 1981

BLOM, A.; EKMAN, E.; JOHANNISSON, A.; NORRGREN, L.; PESONEN, M.: effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line. In: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34 (1998), S. 306-310

BLUS, L. J.; HENNY, C. J.; KRYNITSKY, A. J.: The effects of heptachlor and lindane on birds, Columbia Basin, Oregon and Washington, 1976-1981. In: *Sci Total Environ* 46 (1985), S. 73-81

BÖHME, C.: Chemikalien mit östrogenem Potential in Lebensmitteln und kosmetischen Mitteln. In: *Bundesgesundheitsbl* (1998), Nr. 8, S. 340

BÖHME, C.: Toxizität und Exposition einiger Bestandteile von Lebensmittelverpackungen. In: *Bundesgesundheitsbl.* (1998), Nr. 10, S. 392

BOKERN, M.; HARMS, H.H.: Stoffwechsel der endokrin wirksamen Umweltchemikalie in Pflanzenzellen. In: *UWSF - Z Umweltchem Ökotox, Tagungsberichte ecomed '97 - Umwelt und Medizin* (1997)

- BOLT, H. M.; JANNING, P.; MICHNA, H.; DEGEN, G. H.: Comparative assessment of endocrine modulators with oestrogenic activity: I. Definition of a hygiene-based margin of safety (HBMOS) for xeno-oestrogens against the background of European developments. In: *Arch Toxicol 2001* (2001), Nr. Jan;74(11), S. 649-62
- BOLT, H.M.; DEGEN, G.H.: Hormoneffekte von Chemikalien in Nahrung und Umwelt. In: *Chemie in unserer Zeit* (2000), Nr. 1, S. 30-37
- BOLZ, U.; KÖRNER, W.; HAGENMAIER, H.: Determination and validation of a GC/MS method for the determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples. In: *Chemosphere* 40 (2000), S. 929-935
- BOUTHILLIER, L.; VINCENT, R.; GOEGAN, P.; ADAMSON, I. Y.; BJARNASON, S.; STEWART, M.; GUENETTE, J.; POTVIN, M.; KUMARATHASAN, P.: Acute effects of inhaled urban particles and ozone: lung morphology, macrophage activity, and plasma endothelin-1. In: *Am J Pathol* 153 (1998), Nr. 6, S. 1873-1884
- BOWERMAN, W. W.; GIESY, J. P.; BEST, D. A.; KRAMER, V. J.: A review of factors affecting productivity of bald eagles in the Great Lakes region: implications for recovery. In: *Environ Health Perspect* 103 Suppl 4 (1995), S. 51-59
- BRIAN, M.: Sondermüll im Haus. In: *Öko-Test* (2000), Nr. 5, S. 74-78
- BRIAN, M.: Ins Netz gegangen. In: *Öko-Test* 2 (2000), S. 38
- BRINKMANN, U.A.Th.: On-line monitoring of xenobiotics: trends and perspectives. In: *Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft in Weimar* (29.-31.5.2000)
- BROUWER, A.; LONGNECKER, M.P.; BIRNBAUM, L.S.; COGLIANO, J.; KOSTYNIK, P.; MOORE, J.; SCHANTZ, S.; WINNEKE, G.: Characterization of potential endocrine-related health effects at low-dose levels of exposure to PCBs.. In: *Environ Health Perspect* 107 Suppl 4 (1999), Nr. VI, S. 639-49
- BROWN, L. M.; POTTERN, L. M.; HOOVER, R. N.: Testicular cancer in young men: the search for causes of the epidemic increase in the United States. In: *J Epidemiol Community Health* 41 (1987), Nr. 4, S. 349-354
- BRÜLL, U.; ALBERTI, J.; FURTMANN, K.: Phthalatanalytik in Wasser und Sediment. In: *Umweltanalytiktag NRW 2000 - neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Umweltanalytik, Mülheim* (19.06.2000)
- BUA / GDCH: *Nonylphenol BUA-Stoffbericht 13* Bd. 13. Berlin: VCH Verlag , 1988. - ISSN 0179-2601, ISBN 3-527-26909-6
- BUJAN, L.: Environment and spermatogenesis. In: *Contracept Fertil Sex* 26 (1998), Nr. 1, S. 39-48
- BUNDESMINISTERIUM FÜR UMWELT: Bundesregierung nimmt Problem der Chemisierung der Umwelt ernst. In: *BMU-Pressemitteilung 42/95* (1995)
- BUNDESMINISTERIUM FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ, Ernährung und Landwirtschaft: Betr.: Antrag auf das Inverkehrbringen eines neuartigen Lebensmittels nach Artikel 4 Abs 1 der Verordnung (EG) 259/97. (2001), Nr. 06.03.



- BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T.: Liver of Several Male Brown Trout Caught in Swiss Rivers Express Vitellogenin and Show Histological Alterations. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- BUTTE, W.: Rapid method for the determination of fatty acid profiles from fats and oils using trimethylsulphonium hydroxide for transesterification. In: *Journal of Chromatography* 261 (1983), S. 142-145
- CARLSEN, E.; GIWERCMAN, A.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, NE.: evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. In: *Brit. Med. J.* 305 (1992), S. 609-613
- CARLSON, D.B. et al.: Salmonid Sexual Development Is Not Consistently Altered by Embryonic Exposure to Endocrine-Active Chemicals.. In: *Environ Health Perspect.* 108 (2000), Nr. 3, S. 249-255
- CARPY, S. A.; KOBEL, W.; DOE, J.: Health risk of low-dose pesticides mixtures: a review of the 1985-1998 literature on combination toxicology and health risk assessment [In Process Citation]. In: *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 3 (2000), Nr. 1, S. 1-125
- CARSON, R.: *Silent Spring* In: HOUGHTON MIFFLIN COMPANY Boston:, 1962
- CASTILLO, M.; ALPENDURADA, M. F.; BARCELO, D.: Characterization of organic pollutants in industrial effluents using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. In: *J. Mass Spectrom.* 32 (1997), Nr. 10, S. 110-1110
- CASTILLO, M.; OUBINA, A.; BARCELO, D.: Evaluation of ELISA Kits Followed by Liquid Chromatography- Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry for the Determination of Organic Pollutants in Industrial Effluents. In: *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998), Nr. 14, S. 2180-2184
- CERTA, H.; REINERT, T.; HAMPHOFF-KÖHLER, R.; FEDTKE, N.: Dose related bioavailability and bioaccumulation of octylphenol in the rat, consequences for risk assessment. In: *Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie* 50 (1997), S. 65
- CERTA, H.; FEDTKE, N.; WIEGAND, H.J.; BOLT, H.M.: Bioavailability, Elimination and Bioaccumulation of Alkyl Phenols - Consequences for Risk Assessment . In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- CHAPPELL, C.G.; CREASER, C.S.; SHEPHERD, M.J.: Online derivatization in combined high-performance liquid chromatography-gas chromatography-mass spectrometry. In: *Analyst (Cambridge, U. K.)* 122 (1997), Nr. 9, S. 955-961
- CHEEK, A. O.; VONIER, P. M.; OBERDORSTER, E.; BUROW, B. C.; MCLACHLAN, J. A.: Environmental signaling: a biological context for endocrine disruption. In: *Environ Health Perspect* 106 Suppl 1 (1998), S. 5-10
- CHEMISCHES UNTERSUCHUNGSAMT MAINZ: Bisphenol-A-diglycidether (BADGE). In: *Jahresbericht 1997* (1997), S. 106-107

CHILVERS, C.; PIKE, M. C.; FORMAN, D.; FOGELMAN, K.; WADSWORTH, M. E.: Apparent doubling of frequency of undescended testis in England and Wales in 1962-81. In: *Lancet* 2 (1984), Nr. 8398, S. 330-332

CHING-HUA, H.; SEDLAK, D.: Analysis of estrogenic hormones in wastewater and surface water using ELISA and GC/MS/MS. In: *American Chemical Society National Meeting, San Francisco* (2000)

CHOU, Y.J. et al.: Interactions of nitromusk parent compounds and their amino-metabolites with the estrogen receptors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the South African clawed frog (*Xenopus laevis*). C. In: *Toxicol Lett.* 20 (1999), Nr. 1-2, S. 27-36

CHRISTOPHERSEN, Asbjørg, S.; RASMUSSEN, Knut, E.; TOENNESEN, F.: Glass capillary column gas chromatography of carboxylic acids after flash-heater trimethylsilylation. In: *J. Chromatogr.* 179 (1979), Nr. 1, S. 87-95

CLARK JR., D. R.; FLICKINGER, E. L.; WHITE, D. H.; HOTHEM, R. L.; BELISLE, A. A.: Dicolfol and DDT residues in lizard carcasses and bird eggs from Texas, Florida, and California. In: *Bull Environ Contam Toxicol* 54 (1995), Nr. 6, S. 817-824

CLEMENT, B.; DONNELLY, K. C.; AKE, C. L. Jr.; GARCIA, S.; CHEN, I.; WILLETT, K.; SAFE, S.; SHALAT, S. L.: Chemical and bioassay analysis of water and soil extracts from south Texas. In: *Organohalogen Compd.* 32 (1997), S. 216-219

COLBORN, T.: Epidemiology of Great Lakes bald eagles. In: *J Toxicol Environ Health* 33 (1991), Nr. 4, S. 395-453

COLBORN, T.: Pesticides-how research has succeeded and failed to translate science into policy: endocrinological effects on wildlife. In: *Environ Health Perspect* 103 Suppl 6 (1995), S. 81-85

COLBORN, T.; SMOLEN, M. J.: Epidemiological analysis of persistent organochlorine contaminants in cetaceans. In: *Rev Environ Contam Toxicol* 146 (1996), S. 91-172

COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M.: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. In: *Environ Health Perspect* 101 (1993), Nr. 5, S. 378-384

COLBORN, T.; SMOLEN, M. J.; ROLLAND, R.: Environmental neurotoxic effects: the search for new protocols in functional teratology. In: *Toxicol Ind Health* 14 (1998), Nr. 1-2, S. 9-23

COOPER, R. L.; KAVLOCK, R. J.: Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of-evidence overview. In: *J Endocrinol* 152 (1997), Nr. 2, S. 159-166

CREWS, D.; BERGERON, J. M.; MCLACHLAN, J. A.: The role of estrogen in turtle sex determination and the effect of PCBs. In: *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7 (1995), S. 73-77

CRINNION, W.J.: Environmental medicine, part one: the human burden of environmental toxins and their common health effects.. In: *Altern Med Rev.* 5 (2000), Nr. 1, S. 52-63

CRISP, T. M.; CLEGG, E. D.; COOPER, R. L.; WOOD, W. P.; ANDERSON, D. G.; BAETCKE, K. P.; HOFFMANN, J. L.; MORROW, M. S.; RODIER, D. J.; SCHAEFFER, J. E.; TOUART, L. W.; ZEEMAN, M. G.; PATEL, Y. M.: Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis [see comments]. In: *Environ Health Perspect* 106 Suppl 1 (1998), S. 11-56

- CUNNINGHAM, A.R.; KLOPMAN, G.; ROSENKRANZ, H.S.: A dichotomy in the lipophilicity of natural estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens. In: *Environ. Health Perspect. Suppl.* 105 (1997), Nr. 3, S. 665-668
- CVUA MÜNSTER: *Jahresbericht 1999* In: CHEMISCHES LANDES- UND STAATLICHES VETERINÄRUNTERSUCHUNGSSAMT MÜNSTER Münster., 1999
- DACHS, J.; VANRY, D.A.; EISENREICH, S.J.: Occurrence of Estrogenic Nonylphenols in the Urban and Coastal Atmosphere of the Lower Hudson River Estuary . In: *EST* 33 (1999), S. 2676
- DANIEL, H.; DAYAN, A.D.; ELIAS, P.S.; GRUNOW, W.; KEMPER, F.H.; LÖSER, E.; METZLER, M.; SCHLATTER, J.: *Symposium/Kurzfassung Hormonell aktive Stoffe in Lebensmitteln* In: EISENBRAND, G. 1. Aufl. Berlin: Wiley-VCH, 1998. - 3-527-27582-7, S. 1
- DANZO, B. J.: The effects of environmental hormones on reproduction. In: *Cell Mol Life Sci* 54 (1998), Nr. 11, S. 1249-1264
- DAVIS, D.L.; BRADLOW, H.L.: Verursachen Umwelt-Östrogene Brustkrebs?. In: *Spektrum der Wissenschaft* (1995), Nr. 12, S. 38
- DE KRETZER, D. M.: Are sperm counts really falling?. In: *Reprod Fertil Dev* 10 (1998;10(1):93-5), Nr. 1, S. 93-95
- DE VOOGT, P.; DE BEER, K.; VAN DER WIELEN, F.: Determination of alkylphenol ethoxylates in industrial and environmental samples. In: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 16 (1997), Nr. 10, S. 584-595
- DE VOOGT, P.; JONKERS, C.C.A.; ZHAO, M.; VAN DER WIELEN, F.W.M.: Challenges in the determination of alkylphenol ethoxylates in environmental samples Research in the framework of a National Pilot Survey on Occurrence of Estrogenic Compounds (LOES). In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- DEGEN, G.: pers. Mitteilung (1). (2000)
- DEGEN, G. H.; BOLT, H. M.: Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. In: *Int Arch Occup Environ Health* (2000), Nr. Sep;73(7), S. :433-41
- DEGEN, G.H.: Exposition und Wirkung von Östrogenen - Kenntnisse und Erfahrungen am Beispiel des synthetischen Östrogens Diethylstilbestrol (DES). In: UMWELTBUNDESAMT: Fachgespräch Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung, UBA Texte 65/95., 1995
- DEGEN, G.H.: pers. Mitteilung (2). (2000)
- DEHENNIN, L.: Mixed silyl ether-perfluoroacyl ester derivatives for gas chromatography/mass spectrometry of estrogens. Application to the quantitative determination of estriol in human plasma. In: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 18 (1989), Nr. 5, S. 314-20
- DEHN, C.: US-amerikanische Studien belegen dass die Zahl der Spermien in den letzten 25 Jahren zugenommen hat. In: *Ärzte-Zeitung* (1996), Nr. 09.05.
- DEL OLMO, M.; GONZALEZ-CASADO, N.; NAVA, N.; VILCHEZ, J. L.: Determination of bisphenol A (BPA) in water by gas chromatography-mass spectrometry. In: *Anal. Chim. Acta* 346 (1997), Nr. 1, S. 87-92

- DEPLEDGE, M.H.; BILLINGHURST, Z.: Ecological Significance of Endocrine Disruption in Marine Invertebrates. In: *Marine Pollutant Bulletin* 39 (1999), S. 32-38
- DEROSA, C.; RICHTER, P.; POHL, H.; JONES, D. E.: Environmental exposures that affect the endocrine system: public health implications. In: *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 1 (1998), Nr. 1, S. 3-26
- DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E.J.; BRIGHTY, G.C.; SUMPTER, J.P.; WALDOCK, M.: Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. In: *EST* 32 (1998), Nr. 11, S. 1549-1558
- DEUTSCHER BUNDESTAG: Verordnung über bestimmte phthalathaltig Spielzeug- und Babyartikel. In: *Bundesanzeiger* (18.12.1999), Nr. 240
- DEUTSCHER BUNDESTAG, 13. Wahlperiode, Drucksache 13/3400, 27.12.1995: *Gesundheitsgefährdung durch Umweltchemikalien mit hormonellen Wirkungen*, 1995
- DEUTSCHER BUNDESTAG, Drucksache 13/10606: *Antwort der Bundesregierung auf die Große Anfrage der Abgeordneten Klaus Lennartz, Dr. Wolfgang Wodarg, weiterer Abgeordneter und der Fraktion der SPD*, 1995
- DIE BUNDESMINISTERIN FÜR GESUNDHEIT ANDREA FISCHER: Sechste Verordnung zur Änderung der Bedarfsgegenständeverordnung. In: *BGBl. I* (2000), S. 179
- DIEL, P.; SMOLNIKAR, K.; MICHNA, H.: In vitro test systems for the evaluation of the estrogenic activity of natural products. In: *Planta Med* 65 (1999), Nr. 3, S. 197-203
- DIKESCHEI, L. D.; WOLTER, B. G.; BOS-ZUUR, I.; BRUTEL DE LA RIVIERE, G.; NAGEL, G. T.; VAN DER KOLK, D. A.; WILLEMSE, P. H. B.: Optimization of a classical aromatase activity assay and application in normal, adenomatous and malignant breast parenchyma. In: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol* 59 (1996), Nr. 3/4, S. 305-131
- DING, W.H.; CHEN, C.T.: Analysis of Nonylphenol Polyethoxy Carboxylates by Injection-port Derivatization and Ion-Trap (Tandem) GC/MS. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- DIZER, H.: Endokrine Substanzen. In: <http://www.tu-berlin.de/fb7/ioeb/oekotoxikologie/endokrin.html> (2000)
- DOBSON, H.; SMITH, R.F.: What is stress, and how does it affect reproduction. In: *Anim Reprod Sci* 60-61 (2000 2000 2000), Nr. Jul 2, S. 743-52
- DOBSON, H.; TEBBLE, J. E.; PHOGAT, J. B.; SMITH, R. F.: Effect of transport on pulsatile and surge secretion of LH in ewes in the breeding season. In: *J Reprod Fertil* 116 (1999), Nr. 1, S. 1-8
- DODGE, J.A.; GLASEBROOK, A.; PHILLIPS, D.I.; COLE, H.W.; MAGEE, D.E.; SERLIN, B.; BRYANT, H.U.: Environmental Estrogens: Receptor binding, Cholesterol lowering and bone metabolic effects. In: *J. Bone and Mineral Res.* 9 (1994), Nr. Suppl 1, S. 134
- DOHLER, K. D.: Influence of hormones and hormone antagonists on sexual differentiation of the brain. In: *Arch Toxicol Suppl* 20 (1998), S. 131-141
- DONIKE, M.: N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid, ein neues Silylierungsmittel aus der Reihe der silylierten Amide. In: *Journal of Chromatography* 42 (1969), S. 103

- DONIKE, M.: Flüchtige Carbonsäuren als Lösungsmittel für die Trimethylsilylierung von polaren Verbindungen. In: *Journal of Chromatography* 85 (1973), S. 1
- DUNEMANN, L.; HAJIMIRAGHA, H.; BEGEROW, J.: Simultaneous determination of Hg(II) and alkylated Hg, Pb and Sn species in human body fluids using SPME-GC/MS-MS. In: *Fresenius J Anal Chem* 363 (1999), S. 466-468
- EIDEN, R.: Entwicklung einer automatisierten Methode für die gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung von organischen Zinn-, Blei- und Quecksilberverbindungen in verschiedenen Umweltmatrizes. In: *Dissertation, Heidelberg* (1998)
- EITZER, B.D.; CHEVALIER, A.: Landscape care pesticide residues in residential drinking water wells. In: *Bull Environ Contam Toxicol* 62 (1999), S. 420-427
- ELSAESSER, Werner; GILBERT, Erns.; EBERLE, Siegfried H.: Characterization and identification of low-molecular weight organic substances in biologically treated effluents. In: *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 20 (1992), Nr. 2, S. 82-91
- EMMERSON, B. T.: Ouch-ouch- disease: the osteomalacia of cadmium nephropathy. In: *Ann Intern Med* 73 (1970), Nr. 5, S. 854-855
- ENVIRONMENT AGENCY UK: The identification and assessment of oestrogenic substances in sewage treatment works effluent. Research and Development Technical Summary., 1996, S. 38
- EUROPÄISCHE KOMMISSION: *Mitteilung an die ständigen Vertretungen der Mitgliedsstaaten* Brüssel., 2000
- EUSTACHE, F.; AUGER, J.; JOUANNET, P.: Are Human Reproductive Functions Changing? Could Endocrine Disruptors Be Responsible?. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- FACEMIRE, C. F.; GROSS, T. S.; GUILLETTE JR., L. J.: Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture?. In: *Environ Health Perspect* 103 Suppl 4 (1995), S. 79-86
- FAIRCHILD, W.L.; SWANSBURG, E.O.; ARSENAULT, J.T.; BROWN, S.B.: Does an association between pesticide use and subsequent declines in catch of Atlantic salmon (*Salmo salar*) represent a case of endocrine disruption?. In: *Environ Health Perspect* 105 (1999), Nr. 5, S. 349-58
- FAO FISH. REP.: Monosex culture of male *T. nilotica* (Linnaeus) in ponds stocked at three rates., Nr. 44(4), S. 253-258
- FÄRBER, H.: Entwicklung neuer Derivatisierungstechniken für den "Programmed Temperature Vaporizer (PTV) zur gaschromatographischen Analyse von Bioziden und deren Metaboliten in landwirtschaftlich genutzten Böden. In: *Dissertation, Universität Bonn* (1993)
- FENT, K.: Wirkungen von Spurenstoffen. In: *EAWAG News* 40 D (1995), Nr. 11, S. 8-12
- FENT, K.: Hormonaktive Stoffe in Gewässern: Auch eine Gefahr fürs Trinkwasser?. In: *Mitt. Lebensm. Hyg.* 91 (2000), S. 11-25

- FENT, K.; ACKERMANN, G.; BROMBACHER, E.: Cell Line Based in vitro Systems for Detection of Estrogenic Compounds in Fish. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- FERNADEZ-GUTIERREZ, A.; MARTINEZ-VIDAL, J.L.; ARREBOLA-LIEBANAS, F.J.; GONZALEZ-CASADO, A; VILCHEZ, J.L.: Determination of endosulfan and some pyrethroids in waters by micro liquid-liquid extraction and GC-MS. In: *Fresenius J Anal Chem* 360 (1998), S. 568-572
- FERRO, E. S.; TULLAI, J. W.; GLUCKSMAN, M. J.; ROBERTS, J. L.: Secretion of metalloendopeptidase 24.15 (EC 3.4.24.15). In: *DNA Cell Biol* 18 (1999), Nr. 10, S. 781-789
- FIALA, F.; STEINER, I.; KUBESCH, K.: Migration von DEHP und DINP aus PVC-Materialien. In: *Deutsch Lebensmittel-Rundschau* 96 (2000), S. 51
- FIELD, .A.; REED, R.L.: The Occurrence of Alkylphenol Polyethoxy Carboxylates in Natural Waters, Wastewaters, and Sewage Sludge. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- FILIPIC, M.: Mutagenicity and toxicity of water extracts from the Sora river area. In: *Mutat Res* 342 (1995), Nr. 1-2, S. 1-8
- FOSSI, M. C.: Biomarkers as diagnostic and prognostic tools for wildlife risk assessment: integrating endocrine-disrupting chemicals. In: *Toxicol Ind Health* 14 (1998), Nr. 1-2, S. 291-309
- FOSTER, W. G.: The reproductive toxicology of Great Lakes contaminants. In: *Environ Health Perspect* 103 Suppl 9 (1995), S. 63-69
- FREHSE, H.; THIER, H.P.: Die Ermittlung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze bei Rückstandsanalysen nach dem neuen DFG-Konzept. In: *GIT Fach. Lab.* (1991), Nr. 4, S. 285-291
- FREIE  
HANSESTADT  
BREMEN,  
Der Senator für Frauen, Gesundheit, Jugend, Soziales und Umweltschutz, Bereich Umweltschutz und Frauen: Gewässergütebericht des Landes Bremen 1995. In: <http://alf.zfn.uni-bremen.de/~geogr/umweltatlas/manja/belastsc.htm> (1995)
- FREY, S.: Analytik von Alkylphenolen. In: *Umweltanalytiktage NRW 2000 - neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Umweltanalytik, Mülheim* (19.06.2000)
- FREY, S.: pers. Mittlg.. (2000)
- FRIEDERICH, U.: Environmental Fate, Effects and Exposures of Bisphenol A. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- FRIES, G. F.: A review of the significance of animal food products as potential pathways of human exposures to dioxins. In: *J Anim Sci* 73 (1995), Nr. 6, S. 1639-1650
- FRIGO, P.; LANG, C.; HUBER, J.: Untersuchungen zur Konzentration von Ethinylöstradiol und Estradiol im Abwasser der Stadt Wien. In: *Umweltbundesamt Austria CP-019* (1996), S. 44-46

- FRIMMEL, H.F.; GORDALLA, B.C.; RECHENBERG, J.; REICHERT, J.K.; OBST, U.; JÄGER, W.; DINGLINGER, F.; HAMM, A.; KLAPPER, H.; FÖRSTENER, U.; CALMANO, W.; AHLF, W.; MERKEL, B.J.; KOPP, R.; STEINBERG, C.; BRÜGGEMANN, R.; TRAUNSPURGER, W.: *Wasser und Gewässer* In: FRIMMEL, F.H. 1. Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1999. - 3-8274-0177-1
- FRITSCH, S.; STEINHART, H.: Occurrence of hormonally active compounds in food: a review. In: *Eur. Food Res. Technol.* 209 (1999), S. 153-179
- FRITZ, J.S.: *Analytical solid-phase extraction* In: JOHN WILEY AND SONS 1. Aufl. New York:, 1999. - 0-471-24667-0
- FUHRTMANN, F.: Kontaminationsfreie Spurenanalytik (Phthalate). In: *Vortrag bei Incom-Symposium, Düsseldorf* (1994)
- FUJIWARA, K.: Environmental and food contamination with PCB's in Japan. In: *Sci Total Environ* 4 (1975), Nr. 3, S. 219-247
- FURTMANN, K.: Kontaminationsfreie Spurenanalytik. In: *INCOM-Symposium, Düsseldorf* (1994)
- GAGNE, F.; PARDOS, M.; BLAISE, C.: Estrogenic effects of organic environmental extracts with the trout hepatocyte vitellogenin assay. In: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62 (1999), S. 723-730
- GAIDO, K. W.; LEONARD, L. S.; LOVELL, S.; GOULD, J. C.; BABAI, D.; PORTIER, C. J.; MCDONNELL, D. P.: Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast- based steroid hormone receptor gene transcription assay. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 143 (1997), Nr. 1, S. 205-212
- GAIDO, K. W.; LEONARD, L. S.; MANESS, S. C.; HALL, J. M.; MCDONNELL, D. P.; SAVILLE, B.; SAFE, S.: Differential interaction of the methoxychlor metabolite 2,2-bis-(p- hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane with estrogen receptors alpha and beta. In: *Endocrinology* 140 (1999), Nr. 12, S. 5746-5753
- GARNER, C.E.; BURKA, L.T.; ETHERIDGE, A.E.; MATTHEWS, H.B.: Catechol metabolites of polychlorinated biphenyls inhibit the catechol-O-methyltransferase-mediated metabolism of catechol estrogens. In: *Toxicol Appl Pharmacol.* 162 (2000), Nr. 2, S. 115-23
- GARZO, G.; BLAZSO, M.; GOROG, S.: Gas chromatographic analysis of steroids in pharmaceutical products. In: *Proc. Conf. Appl. Phys. Chem., 2nd , Editor(s): Buzas, Ilona. Publisher: Akad. Kiado, Budapest, Hung.* 1 (1971), S. 301-6
- GDCH (GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER): Genistein - Modellstoff zur Beschreibung endokriner Wirkungen von Phytoöstrogenen.. In: WISSENSCHAFTLICHE VERLAGSGESELLSCHAFT: BUA-Stoffbericht 222. S. Hirzel. Aufl. Stuttgart:, 2000
- GEISSLER, A.; SCHÖLER, H.F.: Gas Chromatographic determination of Phenol, Methylphenols, Chlorophenols, and Nitroquinones in water. In: *Water Research* 28 (1994), Nr. 2047-2053
- GERHARD, I.: bei hoher PCB-Belastung nimmt die Abortrate zu. In: *Ärzte-Zeitung* (1996), Nr. 221, S. 22
- GERHARD, I.; ECKRICH, W.; RUNNEBAUM, B.: Schadstoffe und Fertilitätsstörungen, Lösungsmittel, Pestizide. In: *Geburtsh. und Frauenheilk.* (1993), Nr. 53, S. 147-160

- GERSTENBERGER, L.; HEIMLER, I.; SMIES, R.; HUTZ, R.J.; DASMAHAPATRA, A.K.; TRIPOLI, V.; DELLINGER, J.A.: Minimal Endocrine Alterations in Rodents After Consumption of Lake Trout (*Salvelinus namaycush*). In: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38 (2000), S. 371-376
- GIES, A.: Fachgespräch Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung. In: *UBA, Berlin 9. - 10. März 1995* 65/95 (1995)
- GIES, A.: Umweltbelastungen durch endokrin wirksame Stoffe. In: *Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie* 50 (1997), S. 13
- GIES, A.: Status and Problems. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- GIESY, J. P.; BOWERMAN, W. W.; MORA, M. A.; VERBRUGGE, D. A.; OTHOUDT, R. A.; NEWSTED, J. L.; SUMMER, C. L.; AULERICH, R. J.; BURSIA, S. J.; LUDWIG, J. P.; ET, a. I.: Contaminants of fishes from Great Lakes-influenced sections and above dams of three Michigan rivers: III. Implications for health of bald eagles. In: *Arch Environ Contam Toxicol* 29 (1995), Nr. 3, S. 309-321
- GIESY, J.P.; PIERENS, S.L.; SNYDER, E.M.; MILES-RICHARDSON, S.; KRAMER, V.J.; SNYDER, S.A.; NICHOLS, K.M.; VILLENEUVE, D.A.: Effects of 4-Nonyl Phenol on Fecundity and Biomarkers of Estrogenicity in Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- GIGER, W.: Spurenstoffe in der Umwelt. In: *EAWAG News* 40 D (1995), Nr. 11, S. 3-7
- GIGER, W.; BRUNNER, P.H.; SCHAFFNER, C.: 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. In: *Science* 225 (1984), S. 623-625
- GIWERCMAN, A.; CARLSEN, E.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N. E.: Evidence for increasing incidence of abnormalities of the human testis: a review. In: *Environ Health Perspect* 101 Suppl 2 (1993), S. 65-71
- GOLDMAN, L. R.: New approaches for assessing the etiology and risks of developmental abnormalities from chemical exposure. In: *Reprod Toxicol* 11 (1997), Nr. 2-3, S. 443-451
- GOODBRED, S.L.: Some Research Perspectives from the United States on Endocrine Disruption in Aquatic Ecosystems. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- GOTTESFELD, Z.: Sympathetic neural response to immune signals involves nitric oxide: effects of exposure to alcohol in utero. In: *Alcohol* 16 (1998), Nr. 2, S. 177-181
- GOTTWALD, W.: *Instrumentell-analytisches Praktikum* Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1996. - 3-527-28755-8
- GRAHL, K.: pers. Mitteilung. (2000)
- GRAUMANN, K.; BREITHOFER, A.; JUNGBAUER, A.: Monitoring of estrogen mimics by a recombinant yeast assay: synergy between natural and synthetic compounds?. In: *Sci Total Environ* 225 (1999), Nr. 1-2, S. 69-79



- GREIM, H.: Hormonähnlich wirkende Stoffe in der Umwelt - Einführung und Sachstand. In: *Bundesgesundheitsbl* (1998), Nr. 8, S. 326
- GREIM, H.: Hormonähnlich wirkende Stoffe in der Umwelt. In: *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 46 (1998), Nr. 1, S. 63
- GREIM, H.: Pflanzenhormone und ihre Wirkung aus den Menschen. In: *GIT Labor-Fachzeitschrift* (2000), Nr. 10, S. 1164
- GROB, K.: *Split and splitless injection in capillary gas chromatography: with some remarks on PTV injection* Heidelberg: Hüthig Verlag, 1993. - 3-7785-2151-9
- GRUNOW, W.: Gesundheitliche Bewertung von Indikatorstoffen in Butterfetten. In: *Stellungnahme des bgvv FB 1-2010-2908/99* (4.8.99)
- GUARDIOLA, A.; VENTURA, F.; MATIA, L.; CAIXACH, J.; RIVERA, J.: Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of volatile organic compounds in Barcelona tap water. In: *J. Chromatogr.* 562 (1991), Nr. 1-2, S. 481-92
- GUERRI, C.: Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure. In: *Alcohol Clin Exp Res* 22 (1998), Nr. 2, S. 304-312
- GUILLETTE JR., L. J.; GUILLETTE, E. A.: Environmental contaminants and reproductive abnormalities in wildlife: implications for public health?. In: *Toxicol Ind Health* 12 (1996), Nr. 3-4, S. 537-550
- GUILLETTE JR., L. J.; GROSS, T. S.; GROSS, D. A.; ROONEY, A. A.; PERCIVAL, H. F.: Gonadal steroidogenesis in vitro from juvenile alligators obtained from contaminated or control lakes. In: *Environ Health Perspect* 103 Suppl 4 (1995), S. 31-36
- GÜLDEN, M.; TURAN, A.; SEIBERT, H.: Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. In: UMWELTBUNDESAMT: Texte 46/97 UBA. Berlin., 1997. - ISSN 0722-186x
- GÜNTHER, W.: Gehalte von Nonylphenol in Lebensmitteln. In: *Jahrestagung der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der GDCh Jena 1999, Tagungsband* (1999)
- HÄDRICH, J.; VOGELGESANG, J.: nKonzept 2000 - Ein statistischer Ansatz für die analytische Praxis Teil 1: Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze. In: *Deutsch Lebensmittel-Rundschau* (1999), Nr. 10, S. 428-436
- HÄKKINEN, S.; AURIOLA, S.: High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol glycosides and glycosides in berries. In: *J Chromatogr A* 829 (1998), S. 91-100
- HALLDIN, K.; BERG, C.; BRANDT, I.; BRUNSTROM, B.: Sexual behavior in Japanese quail as a test end point for endocrine disruption: effects of in ovo exposure to ethinylestradiol and diethylstilbestrol.. In: *Environ Health Perspect* 107 (1999), Nr. 11, S. 861-6
- HANKEMEIER, T.; STEKETEE, P.C.; VREULS, J.J.; BRINKMAN, U.A.T.: At-line SPE-GC-MS of micropollutants in water using the PrepStation. In: *Fresenius J Anal Chem* 364 (1999), S. 106-112
- HARINO, H.; FUKUSHIMA, M.; YAMAMOTO, Y.; KAWAI, S.; MIYAZAKI, N.: Organotin compounds in water, sediment and biological samples from the port of Osaka, Japan. In: *Arch Environ Contam Toxicol* 35 (1998), S. 558-564

- HARRIES, J.E.; SHEAHAN, D.A.; JOBLING, S.; MATTHIESEN, P.; NEALL, P.; SUMPTER, J.P.; TAYLOR, T.; ZAMAN, N.: Estrogenic activity in five UK rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. In: *Environ Toxicol Chem.* 16 (1997), S. 534-542
- HARRISON, P. T.; HOLMES, P.; HUMFREY, C. D.: Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure?. In: *Sci Total Environ* 205 (1997), Nr. 2-3, S. 97-106
- HARTMANN, S.; STEINHART, H.: Simultaneous determination of anabolic and catabolic steroid hormones in meat by gas chromatography-mass spectrometry. In: *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* 704 (1997), Nr. 1 + 2, S. 105-117
- HARTMANN, S.; LACORN, N.; STEINHART, H.: Natürliches Vorkommen von Steroidhormonen in tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln. In: *Lebensmittelchemie* 50 (1996), S. 90-91
- HEBERER, Th.: *Dissertationsschrift* Berlin :, 1994, S. 169
- HEBERER, Th., Stan, H.-J.: Vorkommen von polaren organischen Kontaminanten im Berliner Trinkwasser. In: *Vom Wasser* 86 (1996), S. 19-31
- HEEMKEN, O.P.; THEOBALD, N.; STACHEL, B.: Xenoöstrogene in Wasser- und feststoffproben der Elbe und in der Deutschen Bucht. In: *Jahrestagung der Fachgruppe Umweltchemie, Jena* (1999), S. P 15
- HEGELE-HARTUNG, C.: DDT Umweltchemikalien und Fertilität. In: *Chemie in unserer Zeit* 29 (1995), Nr. 5
- HEINRICH-HIRSCH, B.; HERTEL, R.F.; JAENIG, G.R.; ROLL, R.; GUNDERT-REMY, U.M.: Endokrine Wirkungen von Chemikalien - der Weg vom Erkennen eines Problems zum Finden einer Lösung. In: *Bundesgesundheitsbl* (1998), Nr. 8, S. 346
- HICKS, T. A.; MCGLONE, J. J.; WHISNANT, C. S.; KATTESH, H. G.; NORMAN, R. L.: Behavioral, endocrine, immune, and performance measures for pigs exposed to acute stress. In: *J Anim Sci* 76 (1998), Nr. 2, S. 474-483
- HIHI, A.K.; WAHLI, W.: Molecular Mechanisms of Estrogen Receptor Action. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- HIRAMATSU, H.; HISADA, K.; TAKASHIMA, T.: Itai-itai-disease. In: *Rinsho Hoshasen* 15 (1970), Nr. 12, S. 877-886
- HIROI, H.; TSUTSUMI, O.; MOMOEDA, M.; TAKAI, Y.; OSUGA, Y.; TAKETANI, Y.: Differential interactions of bisphenol A and 17beta-estradiol with estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta [In Process Citation]. In: *Endocr J* 46 (1999), Nr. 6, S. 773-778
- HOCK, B.; ROTHE, S.; SEIFERT, M.: Hormone in der Umwelt - die Tests im Überblick. In: *Nachrichten aus der Chemie* 48 (2000), Nr. 7/8, S. 918-924
- HOFER, T.; STEINHAUSER, K. G.: Use of Health Hazard Criteria for Estimating the Hazard Potential of Chemicals to Water in Case of a Spill. In: *Regul Toxicol Pharmacol* 2000 31 (2000), Nr. 1, S. 1-12
- HOFFMANN, L.: Stoffe aus der Umwelt mit endokriner Wirkung: mehr als nur ein Verdacht?. In: *Verbraucherdienst* (2000), Nr. 9, S. 581-582

- HOFMAN, M. A.; SWAAB, D. F.: Influence of aging on the seasonal rhythm of the vasopressin-expressing neurons in the human suprachiasmatic nucleus. In: *Neurobiol Aging* 16 (1995), Nr. 6, S. 965-971
- HOJA, B.; JAHREIS, G.: Leinsamenlignane als potentielle Bestandteile von Functional Foods. In: *Verbraucherdienst* 45 (2000), Nr. 11, S. 634-637
- HOLLANDER, D.: Environmental effects on reproductive health: the endocrine disruption hypothesis. In: *Fam Plann Perspect* 29 (1997), Nr. 2, S. 82-6, 89
- HOLLERT, H.: pers. Mitt.. (1999)
- HOLLERT, H.: *Dissertation, in Vorbereitung* Heidelberg:, 2001
- HOLLERT, H.; DÜRR, M.; KARAU, U.; SIEBERT, I.; WINN, N.; GRATZER, H.; HOLTEY-WEBER, R.; OKPARA, J.; AHLF, W.; FÄRBER, H.; BRACK, W.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T.: Interdisziplinäre Untersuchungen des gelösten und partikulär gebundenen Schädigungspotentials von zwölf Fließwasserstandorten mit In Vitro-Toxizitätstests, fraktionierungstechniken, chemischen Analysen und Aufnahmen des Makrozoobenthos. In: *Jahrestagung der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der GDCh Jena 1999, Tagungsband* (1999), S. P 18
- HOLLERT, H.; DÜRR, M.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T.: Cytotoxicity of settling particulate matter and sediments of the Neckar river (Germany) during a winter flood. In: *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (1999), Nr. 3, S. 528
- HOLLERT, H.; ISLINGER, M.; SIEBERT, I.; PAWLOWSKI, S.; BRAUNBECK, T.: Bestimmung des östrogen wirksamen Potentials von Sedimenten und Schwebstoffen mit Hilfe eines Vitellogenin-mRNA-Assays. In: DVWK, U. Kern and B. Westrich: *Methoden zur Erkundung, Untersuchung und Bewertung von Sedimentablagerungen und Schwebstoffen in Gewässern*. DVWK-Schriften. Bd. 128. Bonn., 1999, S. 290-296
- HORN-ROSS, P. L.; BARNES, S.; LEE, M.; COWARD, L.; MANDEL, J. E.; KOO, J.; JOHN, E. M.; SMITH, M.: Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States) [In Process Citation]. In: *Cancer Causes Control* (2000), Nr. 11 (4), S. 289-98
- HOSE, J. E.; GUILLETTE, L. J.: Defining the role of pollutants in the disruption of reproduction in wildlife. In: *Environ Health Perspect* 103 Suppl 4 (1995), S. 87-91
- HÜBSCHMANN, H.-D.: *Handbuch der GC-MS, Grundlagen und Anwendung* 1. Aufl. VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1996. - 3-527-28604-7
- HUMFREY, C. D.: Phytoestrogens and human health effects: weighing up the current evidence. In: *Nat Toxins* 6 (1998;6(2):51-9), Nr. 2, S. 51-59
- HUPPERT, N.; WÜRTELE, M.; HAHN, H.H.: Determination of the plasticizer N-butylenzesulfonamide and the pharmaceutical Ibuprofen in wastewater using solid-phase microextraction (SPME). In: *Fresenius J Anal Chem* 362 (1998), S. 529-536
- HÜTTER, L.A.: *Wasser und Wasseruntersuchung* 2. Aufl. Frankfurt am Main Berlin München: Verlag Moritz Doestertweg, 1979. - 3-425-05075-3
- IGUCHI, T.: Environmental endocrine disruptors. In: *Nippon Rinsho* 56 (1998), Nr. 11, S. 2953-2962

INDUSTRIVERBAND KÖRPERPFLEGE- UND WASCHMITTEL E.V. (IKW); INDUSTRIEVERBAND PUTZ- UND PFLEGEMITTEL E.V. (IPP); FACHVERBAND INDUSTRIEREINIGER IN VERBAND DER CHEMISCHEN INDUSTRIE E.V.; VERBAND DER TEXTILHILFSMITTEL-, Lederhilfsmittel-, Gerbstoff- und Waschrohstoffindustrie e.V. (TEGEWA): Freiwillige Verzichtserklärung auf Alkylphenoethoxylate (APEO). In: *Erklärung an den BMI vom 14.01.1986* (1986)

ISLINGER, M.; PAWLOWSKI, S.; HOLLERT, H.; VÖLKL, A.; BRAUNBECK, T.: Measurement of vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNase protection-assay. In: *Sci Total Environ* (1999), Nr. 15, S. 109-122

ISOBE, T.; NISHIYAMA, H.; NAKADA, N.; TAKADA, H.: Distribution of Alkylphenols in Aquatic Environment in Tokyo, Japan. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Francini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)

JACKSON, M. B.: The epidemiology of cryptorchidism. John Radcliffe Hospital Cryptorchidism Research Group. In: *Horm Res* 30 (1988;30(4-5):153-6), Nr. 4-5, S. 153-156

JAHR, D.: Determination of alkyl, chloro, and mononitrophenols in water by sample acetylation and automatic online solid phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. In: *Chromatographia* 47 (1998), Nr. 1/2, S. 49-56

JANTUNEN, L.M.M.; BIDLEMAN, T.F.: Organochlorine pesticides and enantiomers of chiral pesticides in arctic ocean water. In: *Arch Environ Contam Toxicol* 35 (1998), S. 218-228

JEFFERSON, W.N. et al.: Expression of estrogen receptor beta is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice. In: *Biol Reprod.* 62 (2000), Nr. 2, S. 307-310

JEKAT, F.W.; STROPP, G.: Assessment of the Oestrogenic Activity of Bisphenol A in vivo. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Francini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)

JENSEN, T. K.; TOPPARI, J.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N. E.: Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health?. In: *Clin Chem* 41 (1995), Nr. 12 Pt 2, S. 1896-1901

JOBLING, S.; SUMPTER, J.P.: Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. In: *Aquatic Toxicol.* 27 (1993), S. 361-372

JOBLING, S.; REYNOLDS, T.; WHITE, R.; PARKER, M.G.; SUMPTER, J.P.: A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. In: *Environ. Health Perspect.* 103 (1995), S. 581

JOHN RADCLIFFE HOSPITAL CRYPTORCHIDISM STUDY GROUP: Cryptorchidism: an apparent substantial increase since 1960. In: *Br Med J (Clin Res Ed)* 293 (1986), Nr. 6559, S. 1401-1404

JOHNSON, A.C.; ULAHANNAN, T.; WILLIAMS, R.J.: An Estimate of Sewage Treatment Effectiveness in Removing 17  $\beta$ -Oestradiol. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Francini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)

- JOHNSON-THOMPSON, MC et al.: Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma.. In: *Cancer*. 88 (2000), Nr. S5, S. 1224-1229
- JÜLICHER, B.: Tierarzneimittelrückstände und Lebensmittelüberwachung - Auswirkungen des EG-Rechts. In: *Bundesgesundhbl* (1992), Nr. 6, S. 281-286
- JUNK, G:A.; RICHARD, J.J.: Organics in water: Solid phase extraction on a small scale. In: *Anal. Chem.* 60 (1988), S. 451-454
- JUNK, G.A.; CHRISWELL, C.D.; CHANG, R.C.; KISSINGER, L.D.; RICHARD, J.J.; FRITZ, J.S.; SVEC, H.J.: Application of resins for extracting organic components. In: *Fres. Z. Anal. Chem.* 282 (1976), S. 331-337
- JUNKER-BUCHHEIT, A.: pers. Mitteilung.
- KALBFUS, W.: Belastung bayerischer Gewässer durch synthetische Östrogene. In: *Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie* 50 (1997)
- KARCHER, W.: Recent Trends and Developments in the EU in the Environmental Control and Management of Chemicals. In: *Ecotoxicol Environ Saf* 40 (1998), Nr. 1/2, S. 97-102
- KAVLOCK, R. J.: Overview of endocrine disruptor research activity in the United States. In: *Chemosphere* 39 (1999), Nr. 8, S. 1227-1236
- KAVLOCK, R. J.; ANKLEY, G. T.: A perspective on the risk assessment process for endocrine-disruptive effects on wildlife and human health. In: *Risk Anal* 16 (1996), Nr. 6, S. 731-739
- KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. P.; DEROSA, C.; FENNER-CRISP, P.; GRAY, L. E.; KAATTARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M. J.; MACZKA, C.; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D. M.; SINKS, T.; TILSON, H. A.: Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. In: *Environ Health Perspect* 104 Suppl 4 (1996), S. 715-740
- KELCE, W.R.; GRAY, L.E.: Environmental Antiandrogens as Endocrine Disruptors. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- KELCE, W.R.; STONE, C.R.; LAWS, S.C.; GRAY, L.E.; KEMPPAINEN, J.A.; WILSON, E.M.: Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent receptor antagonist. In: *Nature* 375 (1995), S. 581
- KELCE, W. R.; WILSON, E.M.: Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. In: *Journal of Molecular Medicine* 75 (1997), Nr. 3, S. 198-207
- KELLY, M.T.; LARROQUE, M.: Trace determination of diethylphthalate in aqueous media by solid-phase microextraction- liquid chromatography. In: *J Chromatogr A* 841 (1999), S. 177-185
- KEMPTER, C.; JENKINS, E.; MERZ, W.; METZGER, J.W.: Untersuchungen zum Eintrag, Verhalten und Verbleib von Sexualhormonen im Abwasser und Klärschlamm. In: *Abschlußbericht für das Forschungsvorhaben Untersuchungen zum Eintrag, Verhalten und Verbleib von Sexualhormonen im Abwasser und Klärschlamm* (1998)
- KIME, D. E.: A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. In: *Sci Total Environ* 225 (1999), Nr. 1-2, S. 3-11

- KNÖRR, S.: PhD Thesis, Heidelberg (2000)
- KLOAS, W.; LUTZ, I.; EINSPANIER, R.: Re: the use of offspring sex ratios in the search for endocrine disruptors [letter] . In: *Environ Health Perspec* 225 (1998), Nr. 1-2, S. a472-3
- KLOAS, W.; LUTZ, I.; EINSPANIER, R.: Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo.. In: *Sci Total Environ* 225 (1999), Nr. 1-2, S. 59-68
- KNAPP, D.R.: *Handbook of Analytical Derivatisation Reactions* New York : Wiley & Sons, 1979
- KOIZUMI, A.: Predictable new developments in occupational health activities. In: *Hokkaido Igaku Zasshi* 74 (1999), Nr. 2, S. 93-97
- KOLB, J.; ANDLAUER, W.; FÜRST, P.: Absorption von Genistein-Verbindungen aus Tofu mit dem isoliert perfundierten Dünndarm der Ratte. In: *Regionaltagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft der GDCh , Karlsruhe* (2000)
- KOLPIN, D.W.; THURMAN, E.M.; LINHART, S.M.: The environmental occurrence of herbicides: the importance of degradates in ground water. In: *Arch Environ Contam Toxicol* 35 (1998), S. 385-390
- KOMMISSION "HUMAN-BIOMONITORING" DES UMWELTBUNDESAMTES: Stoffmonografie PCB - Referenzwerte für Blut. In: *Bundesgesundheitsblatt* 42 (1999), Nr. 6, S. 511-521
- KOMMISSION "HUMAN-BIOMONITORING" DES UBA: Referenzwerte für HCB, b-HCH, DDT und PCB in Frauenmilch. In: *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 6 (1999), S. 533
- KÖRNER, W.; BOLZ, U.: Schritte zur Validierung einer Extraktionsmethode für estrogenartig wirkende Stoffe in Abwässern. In: *GDCh-Umwelttagung, Karlsruhe* (1998), S. W 16
- KÖRNER, W.; HANF, V.; SCHULLER, W.; ZWIRNER, M.; HAGENMEIER, H: Entwicklung und praktische Erprobung eines einfachen screening-Scstems für estrogenartig wirkende Umweltchemikalien.
- KÖRNER, W.; BOLZ, U.; SCHULLER, W.; TRIEBSKORN, R.; HANF, V.: Kläranlagenabläufe sind die Haupteintragsquelle für estrogenartig wirkende Stoffe in kleine Fließgewässer. In: *GDCh-Umwelttagung, Karlsruhe* (1998), S. W 15
- KRAUSE, W.: Umweltfaktoren und Spermatogenese. In: *Sexualmedizin* 21 (1992), S. 524-530
- KREUZINGER, N.: Zum Verhalten einiger hormonell wirksamer Substanzen in der Abwasserreinigung. In: KROIB, H. TU Wien: Wiener Mitteilungen Wasser Abwasser Gewässer: Hormonell aktive Substanzen in der Umwelt., 1998, S. 93-118
- KROKER, R.; SCHMÄDICKE, I.: Stellt die veterinärmedizinische Anwendung von steroidal Sexualhormonen und ihren Abkömmlingen ein Risiko für die Umwelt dar?. In: *Bundesgesundheitsbl* (1998), Nr. 8, S. 344
- KROL, J.; BLOCK, E.; YOUNG, M.; BENVENUTI, M.; YONUKUBO, J.; ROMANO, J.: HPLC with mass spectrometric detection for the analysis of endocrine disruptors. In: *American Chemical Society National Meeting, San Francisco* (2000)
- KUCH, H.; BALLSCHMITER, K.: Determination of Endogenous and Exogenous Estrogens in STW-Effluents at the ng/L-Level. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)

- KUCH, H.; BALLSCHMITTER, K.: Hormonell wirksame Verbindungen in der Umwelt Baden-Württembergs. In: AKADEMIE FÜR TECHNIKFOLGENABSCHÄTZUNG IN BADEN-WÜRTTEMBERG: Arbeitsbericht Nr. 151. Stuttgart., 1999
- KUCHEN, A.; MÜLLER, F.; FARINE, M.; ZIMMERMANN, H.; BLASER, O.; WÜTHRICH, C.: Die mittlere tägliche Aufnahme von Pestiziden und anderen Fremdstoffen über die Nahrung in der Schweiz. In: *Mitt Lebensm Hyg* 90 (1999), S. 78
- KULLING, S.E.; ROSENBERG, B.; METZLER, M.: Zur Mutagenität des Pflanzenestrogens Cumestrol. In: *Lebensmittelchemie* 51 (1997), S. 40
- LAESSIG, S.A., et al.: Neurotoxic effects of endocrine disruptors.. In: *Curr Opin Neurol.* 12 (1999), Nr. 6, S. 745-751
- LANDRIGAN, P. J.: Children's health and the environment--the first Herbert L. Needleman Award Lecture [In Process Citation]. In: *Matern Child Health J* 1 (1997), Nr. 1, S. 61-64
- LARSSON, D.G.J.; ADOLFSSON-ERICI, M.; PARKKONEN, J.; PETTERSSON, M.; BERG, A.H.; OLSSON, P.-E.; FÖRLIN, L.: Ethinylestradiol - an undesired fish contraceptive?. In: *Aquatic toxicology* 45 (1999), S. 91-97
- LASCOMBE, I.; BEFFA, D.; DIEZI, J.; KUCERA, P.; RUEGG, U.; TARRADELLAS, J.; WAHLI, W.: Identification of New Estrogenic Environmental Chemicals Using in vitro Assays. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- LEATHERLAND, J. F.: Changes in thyroid hormone economy following consumption of environmentally contaminated Great Lakes fish. In: *Toxicol Ind Health* 14 (1998), Nr. 1-2, S. 41-57
- LEGLER, J.; VAN DEN BRINK, C.E.; BROEKHOF, J.; BROUWER, A.; MURK, A.J.; VETHAAK, V.; VAN DER BURG, B.: In vitro and in vivo Assessment of Potential (Anti-) Estrogenic Compounds Using Luciferase Reporter Gene Assays with a Stably Transfected Cell Line and Transgenic Zebrafish. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- LEISEWITZ, A.; SCHWARZ, W.: Stoffströme wichtiger endokrin wirksamer Industriechemikalien (Bisphenol A; Dibutylphthalat/Benzylbutylphthalat; Nonylphenol/Alkylphenoethoxylylate). In: UMWELTBUNDESAMT BERLIN: Forschungsbericht für das Umweltbundesamt, UFOPLAN-No. 106 01 076., 1998
- LERCH, O.; ZINN, P.; GÖTZE, H.-J.: Automation of the GC/MS analysis of mineral oil contaminants in water. In: *Fresenius J Anal Chem* 367 (2000), S. 195-200
- LEWIS, D. L.; GARRISON, A. W.; WOMMACK, K. E.; WHITEMORE, A.; STEUDLER, P.; MELILLO, J.: Influence of environmental changes on degradation of chiral pollutants in soils. In: *Nature* 401 (1999), Nr. 6756, S. 898-901
- LISBOA, B. P.: Methoxyimino-tert-butyltrimethylsilyl ethers as derivatives for the gas chromatography-mass spectrometry of 3 (or 17)-hydroxy-C19- and 20-hydroxy-C21-ketosteroids. In: *Dev. Anal. Methods Pharm., Biomed., Forensic Sci., [Proc. Int. Conf.]* , Meeting Date 1986, . Editor(s): Piemonte, Giuseppe. Publisher: Plenum, New York, N. Y. (1987), S. 191-207

L.J. GUILLETTE, Jr.: Contaminants as Hormones and Anti-hormones: Lessons from Embryos. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland March 7 - 12, 1999* (1999)

LLOYD; J.; ROBERTS; B.: gas chromatographic characterisation of cooking fats with reference to a case of murder. In: *Journal of Chromatography* 77 (1973), S. 228-232

LUTZ, I.; KLOAS, W.: Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. In: *Sci Total Environ* 225 (1999), Nr. 1-2, S. 49-57

LYE, C. M.: Impact of oestrogenic substances from oil production at sea. In: *Toxicol Lett* 112-113 (2000), Nr. 8, S. 265-272

LYONS, R.: Estrogens and estrogenic exposure. In: [http://cassfos02.ucsd.edu/personal/ron/CVNC/esrogens/estrogen\\_paper.html](http://cassfos02.ucsd.edu/personal/ron/CVNC/esrogens/estrogen_paper.html) (1995)

MAC, M. J.; EDSALL, C. C.: Environmental contaminants and the reproductive success of lake trout in the Great Lakes: an epidemiological approach. In: *J Toxicol Environ Health* 33 (1991), Nr. 4, S. 375-394

MACGEE; J.; ALLEN; K.: Preparation of methyl esters from saponifiable fatty acids in small biological specimens for gas-liquid chromatographic analysis. In: *Journal of Chromatography*, 100 (1974), S. 35-42

MACLATCHY, D. L.; VAN DER KRAAK, G. J.: The phytoestrogen beta-sitosterol alters the reproductive endocrine status of goldfish. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 134 (1995), Nr. 2, S. 305-312

MAKYNEN, E.A.; KAHL, M.D.; JENSEN, K.M.; TIETGE, J.E.; WELLS, K.L.; VAN DER KRAAK, G.; ANKLEY, G.T.: Effects of the mammalian antiandrogen vinclozolin on development and reproduction of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). In: *Aquatic Toxicol* 48 (2000), Nr. 4, S. 461-475

MANDAT, K.; SWIETOCZOWSKI, A.; WIECZORKIEWICZ, B.; GUBALA, M.: Increase in the number of operations for undescended testis. In: *Wiad Lek* 45 (1992), Nr. 7-8, S. 287-290

MANESS, S. C.; MCDONNELL, D. P.; GAIDO, K. W.: Inhibition of androgen receptor-dependent transcriptional activity by DDT isomers and methoxychlor in HepG2 human hepatoma cells. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 151 (1998), Nr. 1, S. 135-142

MANNI, L.; MICERA, A.; PISTILLO, L.; ALOE, L.: Neonatal handling in EAE-susceptible rats alters NGF levels and mast cell distribution in the brain. In: *Int J Dev Neurosci* 16 (1998), Nr. 1, S. 1-8

MARUOKA, S.; YAMANAKA, S.; YAMAMOTO, Y.: Isolation of mutagenic components by high-performance liquid chromatography from XAD extract of water from the Nishitakase river, Kyoto City, Japan. In: *Sci. Tot. Env.* 57 (1986), S. 29-38

MASUDA Y; KAGAWA R; KURANTSUNE M: Comparison of polychlorinated biphenyls in yusho patients and ordinary persons. In: *Bull Environ Contam Toxicol* 11 (1974), Nr. 3, S. 213-216

MATIA, L.; VENTURA, F.; ROBLES, M.; GUARDIOLA, A.; RIVERA, J.; GIRONA, J.: Use of flavor profile and volatile organic compound analysis in the characterization of tastes and odors in Barcelona water supply. In: *Water Supply IWSA Int. Water Supply Conf. Exhib., 18th, 1991*, SS4/12-SS4/19 7 (1991), Nr. 9, S. 3-4



- MATTER, L.: Identifizierung von tierischen Fetten und deren Mischungen mittels Kapillargaschromatographie. In: *Fat Sci. Technol.* 93 (1991), Nr. 4, S. 536-538
- MATTHEWS, J.B.; CLEMONS, J.H.; FERTUCK, K.C.; ZACHAREWSKI, T.R.: Estrogenic Substances Exhibit Differential Ligand Preferences, and Binding Affinities to Recombinant Human  $\alpha$  and Rainbow Trout Estrogen Receptors. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- MATTHIESSEN, P.: Aspects of the UK Programme on Endocrine Disruption in the Marine Environment (EDMAR). In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- MAURER, H.H.: Liquid chromatography- mass spectrometry in forensic and clinical toxicology (review). In: *J Chromatogr B* 713 (1998), S. 3-25
- MAZUR, W.: Phytoestrogen content in foods. In: *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12 (1998), Nr. 4, S. 729-742
- MCLACHLAN, J. A.: Synergistic effect of environmental estrogens: Report withdrawn . In: *Science* 277 (1997), S. 462-463
- MCMASTER, M.E.; JARDINE, J.J.; MUNKITTRICK K.R.: The Use of Steroid Hormones in Examining Endocrine Disruption: An Interlaboratory Study. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- MEINRATH, G.; VOLKE, P.; HELLING, C.; DUDEL, E.G.; MERKEL, B.J.: Determination and interpretation of environmental water samples contaminated by uranium mining activities. In: *Fresenius J Anal Chem* 364 (1999), S. 191-202
- MEISSNER, G.; HARTONEN, K.; RIEKKOLA, M.L.: Supercritical fluid extraction combined with solid-phase extraction as sample preparation technique for the analysis of  $\beta$ -blockers in serum and urine. In: *Fresenius J Anal Chem* 360 (1998), S. 618-621
- MELLANEN, P.; PETANEN, T.; LEHTIMAKI, J.; MAKELA, S.; BYLUND, G.; HOLMBOM, B.; MANNILA, E.; OIKARI, A.; SANTTI, R.: Wood-derived estrogens: studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo in trout. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 136 (1996), Nr. 2, S. 381-388
- MELLANEN, P.; SOIMASUO, M.; HOLMBOM, B.; OIKARI, A.; SANTTI, R.: Expression of the vitellogenin gene in the liver of juvenile whitefish (*Coregonus lavaretus* L. s.l.) exposed to effluents from pulp and paper mills. In: *Ecotoxicol Environ Saf* 43 (1999), Nr. 2, S. 133-137
- METZLER, M.; KULLING, S.E.; PFEIFFER, E.; JACOBS, E.; MAYER, S.; HODAPP, C.: Genotoxizität von Endo- und Xeno-Estrogenen und ihren Metaboliten. In: *GDCh-Umweltagung, Karlsruhe, Tagungsband* (1998), S. 78
- MILIADIS, G.E.: Analysis of pesticide residues in water samples by gas capillary chromatography. In: *Bull Environ Contam Toxicol* 61 (1998), S. 255-260

- MINISTERIUM FÜR BAUEN UND WOHNEN NORDRHEIN-WESTFALEN: Richtlinie für die Bewertung und Sanierung belasteter Baustoffe und Bauteile in Gebäuden. In: *Ministerialblatt für das Land NRW* 52 (1996), Nr. 9.8.1996
- MINISTERIUM FÜR UMWELT UND FORSTEN RHEINLAND-PFALZ: Bisphenol A in Mineralwasser. In: *Mitteilungsbogen 58b/00* (2000)
- MINISTRY OF ENVIRONMENT AND ENERGY, Denmark: *Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects: Miljøprojekt No. 290* In: DANISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1995
- MINISTRY OF ENVIRONMENT AND ENERGY, Denmark: *Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects: Miljøprojekt No. 290* In: DANISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1995
- MITCHELL, M. A.: Rapid method for the estimation of estriol in pregnancy by gas liquid chromatography. In: *Can. J. Med. Technol.* 34 (1972), Nr. 3, S. 106-21
- MOCK, P.; STEINER, G.: BADGE aus der Sicht der Überwachung von Bedarfsgegenständen - Untersuchungen an unbefüllten, fabrikneuen Konservendosen unterschiedlicher Herkunft. In: *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 95 (1999), Nr. 7, S. 269
- MÖDER, M.; POPP, P.; EISERT, R.; PAWLISZYN, J.: Determination of polar pesticides in soil by solid-phase micro extraction coupled to high-performance liquid chromatography- electrospray mass spectrometry. In: *Fresenius J Anal Chem* 363 (1999), S. 690-685
- MÖDER, M.: pers. Mitteilung. (2000)
- MOL, HGJ. Jansen, HGM.; CRAMERS, CA.; VREULS, JJ.; BRINKMANN UAT: Automation in GC analysis. In: *J. Chromatogr. A* 703 (1995), S. 277-307
- MOLLER, H.; PRENER, A.; SKAKKEBAEK, N. E.: Testicular cancer, cryptorchidism, inguinal hernia, testicular atrophy, and genital malformations: case-control studies in Denmark. In: *Cancer Causes Control* 7 (1996), Nr. 2, S. 264-274
- MOORE, N.: Do Phthalic Acid Esters Cause Endocrine Disruption?. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- MUELLER, A.M.F.; MAKROPOULOS, V.; BOLT, H.M.: Substances from environment and foods acting like hormones. Their toxicological significance. In: *Dtsch.Apoth.Ztg.* 135 (1995), S. 17-24
- MÜLLER; K-D.; HUSMANN; H.; NALIK; H.P.; SCHOMBURG; G.: Trans-Esterification of fatty acids from microorganisms and human blood serum by Trimethylsulfonium Hydroxide for GC Analysis. In: *Chromatographia* 30 (1990), Nr. 5/6, S. 245-248
- MÜLLER, A.M.F.; MAKROPOULOS, V.; BOLT, H.M.: Hormonartig wirkende Substanzen in Umwelt und Nahrung. In: *Deutsche Apotheker Zeitung* 135 (1995), Nr. 42, S. 3923
- MULTIGNER, L.; MAGISTRINI, M.; DUCOT, B.; SPIRA, A.: Secular sperm trends in stallions between 1981 and 1996. In: *J Androl* 20 (1999), Nr. 6, S. 763-768

- MUNARI, F.; COLOMBO, P.A.; MAGNI, P.; ZILIOLI, G.; TRESTIANU, S.; GROB, K.: GC instrumentation for on-column injection of large volumes; automated optimization of conditions. In: *J Microcolumn Separation* 7 (1995), Nr. 4, S. 403-409
- MUNOZ-GUERRA, J.; CARRERAS, D.; SORIANO, C.; RODRIGUEZ, C.; RODRIGUEZ, A.F.: Use of ion trap gas chromatography- tandem mass spectrometry for detection and confirmation of anabolic substances at trace levels in doping analysis. In: *J Chromatogr B* 704 (1997), S. 129-141
- MURK, A.J.; BELFROID, A.C.; MEERMAN, J.; LEGLER, J.; SCHÄFER, A.J.; RIJS, V.; VETHAAK, V.: Application Of 3 in Vitro Bioassays for Estrogenicity in Some Dutch Waste Water Treatment Plants and Large Rivers Research in the Framework of National Pilot-Survey on Estrogenic Compounds (Loes). In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- NAGEL, R.: Endokrine Stoffe in der Umwelt: Eine Einführung oder Silent Spring - Our Stolen Future - no way out?. In: *Umweltanalytiktage NRW 2000 - neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Umweltanalytik, Mülheim* (2000)
- NAGEL, S.C.; VOM SAAL, F.S.; THAYER, K.A.; DHAR, M.G.; BOECHLER, M.; WELSHONS, W.V.: Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. In: *Environ. Health Perspect.* 105 (1997), Nr. 1, S. 70-76
- NEEDHAM, L.L.; BLOUNT, B.; BROCK, J.W.; SCHURZ ROGERS, H.; SAMPSON, E.; JACKSON, R.: Development and Application of Methods for Assessing Human Levels of Phthalates and Phytoestrogens. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- NIEDAN, V.: Biotika und Xenobiotika in der Umwelt - Untersuchungen zum Verbleib von biogen gebildeten chlororganischen Verbindungen und Herbiziden. In: *Dissertation, Universität Heidelberg* (1998)
- NIEMANN, L.; HILBIG, V.; PFEIL, R.: Pflanzenschutzmittel und Hormonsystem - Möglichkeiten gesundheitlicher Störungen und ihre Manifestation im Tierversuch. In: *Bundesgesundheitsbl* (1998), Nr. 8, S. 330
- NIMROD, A. C.; BENSON, W. H.: Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. In: *Crit Rev Toxicol* 26 (1996), Nr. 3, S. 335-364
- NISHIMURA, N.; FUKAZAWA, Y.; UCHIYAMA, H.; IGUCHI, T.: Effects of estrogenic hormones on early development of *Xenopus laevis*. In: *J Exp Zool* 278 (1997), Nr. 4, S. 221-233
- NORDMEYER, K.; THIER, H.P.: Solid-phase extraction for replacing dichlormethane partitioning in pesticide multiresidue analysis. In: *Z Lebensm Unters Forsch* 208 (1999), S. 259-263
- NORPOTH, K.; NEHRKORN, A.; KIRCHNER, M.; HOLSEN, H.; TEIPEL, H.: Untersuchungen zur Frage der Löslichkeit und Stabilität ovulationshemmender Steroide in Wasser, Abwässern und Belebtschlamm. In: *Zbl. Bakt. Hyg. I, Abt. Orig. B* 156 (1973), S. 500
- NOSER, J.; SUTTER, A.; AUCKENTHALER, A.: Moschusverbindungen: Brauchbare Indikatoren für Trinkwasserverunreinigungen?. In: *Mitt. Lebensm. Hyg.* 91 (2000), S. 102-115

- ODENWALD, M.: Die geballten Umweltgifte wirken wie eine Antibabypille. In: *GIP Reproduction* (1989), Nr. 907, S. 25
- ODENWALD, M.: Bereite jedes fünfte Paar bleibt ungewollt ohne Kinder. In: *Ärzte-Zeitung* (1995), Nr. 55 (25.03.), S. 24
- OEHLMANN, J.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; LEFFLER, U.S.; BAUER, B.; FIORONI, P.; OETKEN, M.; KAYSER, G.; KORHAMMER, S.; MARKERT, B.: Umweltchemikalien mit hormonähnlicher Wirkung in Wasser - eine Gefahr für die Fortpflanzungsfähigkeit von Mensch und Tier?. In: *IHI-Schriften, Wasser in Boden - Pflanze - Atmosphäre* (1996), Nr. 2, S. 31-40
- OHLSON, C. G.; HARDELL, L.: Testicular cancer and occupational exposures with a focus on xenoestrogens in polyvinyl chloride plastics . In: *Chemosphere* 40 (2000), Nr. 9-11, S. 1277-82
- OKUMURA, T.: Simultaneous determination of trace levels of water contaminants by capillary gas chromatography/mass spectrometry. In: *Kankyo Kagaku* 5 (1995), Nr. 3, S. 597-604
- OLEA, N.; PAZOS, P.; EXPOSITO, J.: Inadvertent exposure to xenoestrogens. In: *Eur J Cancer Prev* 7 Suppl 1 (1998), S. S17-23
- OLSSON, A.; BERGMAN, A.: A New Persistent Contaminant Detected in Baltic Wildlife: Bis(4-chlorophenyl)Sulfone. In: *Ambio* 24 (1995), Nr. 2, S. 119-123
- OOSTERKAMP, A.J.; HOCK, B.; SEIFERT, M.; IRTH, H.: Novel monitoring strategies for xenoestrogens. In: *TrAC, Trends Anal. Chem.* 16 (1997), Nr. 10, S. 544-55
- OPITZ, R.: Pesticides as Endocrine Disrupting Compounds - a Review of Current Literature. Research Project in Environmental Engineering. Berlin., 1998
- OSOWSKI, S. L.; BREWER, L. W.; BAKER, O. E.; COBB, G. P.: The decline of mink in Georgia, North Carolina, and South Carolina: the role of contaminants. In: *Arch Environ Contam Toxicol* 29 (1995), Nr. 3, S. 418-423
- PAKDEL, F.; PETIT, F.; LE GUÉVEL, R.; MADIGOU, T.; MÉTIVIER, R.; LE GOFF, P.; FLOURIOT, G.; VALOTAIRE, Y.: Two Complementary Bioassays to Determine the Mechanisms of Action of Xenoestrogens. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- PALANZA, P.; MORELLINI, F.; PARMIGIANI, S.; VOM SAAL, F.S.: Prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on behavioral development.. In: *Neurosci Biobehav Rev* 106 (1999), Nr. Suppl 1, S. 1011-27
- PALMER, B. D.; PALMER, S. K.: Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the red-eared turtle and African clawed frog. In: *Environ Health Perspect* 103 Suppl 4 (1995), S. 19-25
- PALMER, B.D.; PALMER, S.K.; SELCER, K.W.: Effects of Reproductive Endocrine Disruptors on Amphibians. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- PANTER, G.H.; THOMPSON, R.S.; SUMPTER, J.P.: Adverse reproductive Effects in male fathead minnows exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens oestradiol and oestrone. In: *Aquatic Toxicology* 42 (1998), S. 243

- PARMIGIANI, S.; PALANZA, P.; VOM SAAL, F. S.: Ethotoxicology: an evolutionary approach to the study of environmental endocrine-disrupting chemicals. In: *Toxicol Ind Health* 14 (1998), Nr. 1-2, S. 333-339
- PÄRT, P.: Endocrine Disrupting Chemicals - Activities within the European Commission. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- PARYZKOVA, J.: Quantitative analysis of industrial products by capillary gas chromatography with on-column injection. In: *Chem. Prum.* 39 (1989), Nr. 8, S. 426-8
- PATNODE, K. A.; CURTIS, L. R.: 2,2',4,4',5,5'- and 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl alteration of uterine progesterone and estrogen receptors coincides with embryotoxicity in mink (*Mustela vison*). In: *Toxicol Appl Pharmacol* 127 (1994), Nr. 1, S. 9-18
- PATYNA, P.J.; DAVI, R.A.; PARKERTON, T.F.; BROWN, R.P.; COOPER, K.R.: A proposed multigeneration protocol for Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to evaluate effects of endocrine disruptors.. In: *Sci Total Environ* 233 (1999), Nr. 1-3, S. 211-20
- PAULSEN, C. A.; BERMAN, N. G.; WANG, C.: Data from men in greater Seattle area reveals no downward trend in semen quality: further evidence that deterioration of semen quality is not geographically uniform [see comments]. In: *Fertil Steril* 65 (1996), Nr. 5, S. 1015-1020
- PESONEN, M.; VAKKURI, O.; KORKALAINEN, M.; LAITINEN, J.T.: TCDD Alters Melatonin Metabolism in Fish Hepatocytes. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- PETERSEN, H.; SCHESFER, A.; BUCKOW, C.A.; SIMAT, T.J.; ZIMMERMANN, T.: Bisphenol A-Diglycidether (BADGE): Synthese und bestimmung relevanter Derivate in Lebensmitteln. In: *Lebensmittelchemie* 54 (2000), S. 37-40
- PETIT, F.; L, Goff, P.; CRAVEDI, J.-P.; VALOTAIRE, Y.; PAKDEL, F.: Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. In: *J. Mol. Endocrinol.* 19 (1997), Nr. 3, S. 321-335
- PFEIFFER, C.; EMMERLING, C.; SCHRÖDER, D.; NIEMEYER, J.: Antibiotika Ivermectin, Monensin) und endokrine Umweltchemikalien (Nonylphenol, Ethinylöstradiol) im Boden. In: *UWSF - Z Umweltchem Ökotox* 10 (1998), Nr. 2, S. 147
- PFEIFFER, E.; ROSENBERG, B.; FRIES, J.; METZLER, M.: Zum aneugenem Potential von Kunststoffmonomeren des Bisphenol-Typ. In: *Lebensmittelchemie* 51 (1997), S. 40-41
- PFORDT, J.; BRUNS-WELLER, E.: Die Phtalsäureester als eine Gruppe von Umweltchemikalien mit endokrinem Potential. In: NIEDERSÄCHSISCHES MINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, Landwirtschaft und Forsten: Verbraucherschutz. Hannover:, 1999
- PFORDT, J.; BRUNS-WELLER, E.: Phthalsäureester - eine gruppe von Umweltchemikalien mit endokrinem Potential. In: *Lebensmittelchemie* 53 (1999), S. 89
- PHARRIS-CIUREJ, N. D.; COOK, L. S.; WEISS, N. S.: Incidence of testicular cancer in the United States: has the epidemic begun to abate?. In: *Am J Epidemiol* 150 (1999), Nr. 1, S. 45-46

- PICKERING, A.D.: COMPREHEND - COMmunity Programme of Research on Environmental Hormones and ENdocrine Disrupters. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- PLUTA, R.: pers. Mitt.. (2000)
- PODREKA, S.; GEORGES, A.; MAHER, B.; LIMPUS, C. J.: The environmental contaminant DDE fails to influence the outcome of sexual differentiation in the marine turtle *Chelonia mydas*. In: *Environ Health Perspect* 106 (1998), Nr. 4, S. 185-188
- POPP, W.; VAHRENHOLZ, C.; KRAUS, R.; NORPORTH, K.: Polychlorierte Biphenyle und Reproduktionsstörungen. In: *Zbl. Hyg.* 193 (1993), S. 528-556
- PORTELLI, M. J.; DE SOLLA, S. R.; BROOKS, R. J.; BISHOP, C. A.: Effect of dichlorodiphenyltrichloroethane on sex determination of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*). In: *Ecotoxicol Environ Saf* 43 (1999), Nr. 3, S. 284-291
- PRZYREMBEL, H.: Natürliche Pflanzeninhaltsstoffe mit Wirkung auf das Hormonsystem. In: *Bundesgesundheitsbl* (1998), Nr. 8, S. 335
- PULLIN, R.S.V.; BHUKASWAN, T.; TONGUTHAI, K.; MACLEAN J.L.: Feasibility of commercial production of sex-reversed Nile tilapia fingerlings in the Philippines. The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture, ICLARM Conf. Proc. 15. Bangkok: Dept. of Fish, S. 183-186.
- PURCHASE, I.F.: Ethical review of regulatory toxicology guidelines involving experiments on animals: the example of endocrine disrupters. In: *Toxicol Sci.* 52 (1999), Nr. 2, S. 141-147
- PURDOM, C.E.; HARDIMAN, P.A.; BYE, V.J.; ENO, N.C.; TYLER, C.R.; SUMPTER, J.P.: Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. In: *Chemistry and Ecology* 8 (1994), S. 275
- RAGOTZKY, K.: Phytosterine: Neue Chancen im Kampf gegen den Herzinfarkt. In: *Lebensmittelchemie* 53 (1999), S. 151
- RALOFF, J.: That Feminine Touch. In: *Science News* 145 (1994), S. 56-59
- RATHNER, M.; SONNEBORN, M.: Biologisch wirksame Östrogene in Trink- und Abwasser. In: *Forum Städte-Hygiene* 30 (1979), S. 45
- RAUTER, W.; DICKINGER, G.; ZIHLARZ, R.; LINTSCHINGER, J.: Determination of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and its hydrolysis products in canned oily foods from Austrian market. In: *Z Lebensm Unters Forsch* 208 (1999), S. 208-211
- RAVERDINO, V.: On-line derivatization of eluted substances in dynamic high-performance liquid chromatography-mass spectrometry through the particle-beam interface. In: *J. Chromatogr.* 554 (1991), Nr. 1-2, S. 125-40
- RAWLINGS, N. C.; COOK, S. J.; WALDBILLIG, D.: Effects of the pesticides carbofuran, chlorpyrifos, dimethoate, lindane, triallate, trifluralin, 2,4-D, and pentachlorophenol on the metabolic endocrine and reproductive endocrine system in ewes. In: *J Toxicol Environ Health* 54 (1998), Nr. 1, S. 21-36
- REGIERUNG DER BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND: Organozinnverbindungen in Fischen und anderen Meerestieren. In: *Mitteilung Az 422-7333/23* (2000)

- REINLI, K.; BLOCK, G.: Phytoestrogen content of foods--a compendium of literature values. In: *Nutr Cancer* 26 (1996), Nr. 2, S. 123-148
- REITER, L. W.; DEROSA, C.; KAVLOCK, R. J.; LUCIER, G.; MAC, M. J.; MELILLO, J.; MELNICK, R. L.; SINKS, T.; WALTON, B. T.: The U.S. federal framework for research on endocrine disruptors and an analysis of research programs supported during fiscal year 1996. In: *Environ Health Perspect* 106 (1998), Nr. 3, S. 105-113
- RICHARD, N.; BIEDERMANN, M.; GROB, K.: Reaction of Bisphenol-A-Diglycidyl Ether (BADGE) from Can Coatings with food componenets. In: *Mitt. Lebensm. Hyg.* 90 (1999), S. 532
- RICHARDSON M.L.; BOWRON J.M.: The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. In: *J. Pharm. Pharmacol.* 37 (1985), S. 1-12
- RIMKUS, G.; GATERMANN, R.; BISELLI, S.; HÜHNERFUSS, H.: Nachweis von Moschusxylol- und Moschusketon-Metaboliten in der aquatischen Umwelt. In: *Lebensmittelchemie* 53 (1999), S. 88
- RODGERS- GRAY, T.P.; JOBLING, S.; MORRIS, S.; KELLY, C.; KIRBY, S.; JANBAKSH, A.; WALDOCK, M.J.; SUMPTER, J.P.; TYLER, C.: Long-Term Temporal Changes in the Estrogenic Composition of Treated Sewage Effluent and Its Biological Effects on Fish. In: *EST* 34 (2000), Nr. 8, S. 1521-1528
- RÖHRIG, L.; PÜTTMANN, M.; MEISCH, H.U.: Determination of persistent organochlorine compounds in blood by solid-phase micro extraction and GC-ECD. In: *Fresenius J Anal Chem* 361 (1998), S. 192-196
- RÖMPP: Phthalsäureester. Chemie-Lexikon. 9. Aufl. Stuttgart: Thieme, 1995
- ROSENTHAL, Arthur F.; YASEEN, Akhtar: Simplified estriol determination in pregnancy urine. In: *Clin. Chim. Acta* 31 (1971), Nr. 1, S. 171-4
- ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P.: Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Nr. 6, S. 3280-3288
- ROUTLEDGE, E. J.; PARKER, J.; ODUM, J.; ASHBY, J.; SUMPTER, J. P.: Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 153 (1998), Nr. 1, S. 12-19
- ROUTLEDGE, E.J.; SUMPTER, J.P.: estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products using a recombinant yeast screen. In: *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (1996), S. 241-248
- ROUTLEDGE, E.J.; SCHEAHAN, D.; DESBROW, C.; BRIGHTY, G.C.; WALDOCK, M.; SUMPTER, J.P.: Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. In: *EST* 32 (1998), S. 1559-1565
- RUBIN, C.H. et al.: Endocrine disruptors: an emerging environmental health problem.. In: *J Med Assoc Ga.* 88 (1999), Nr. 4, S. 27-30
- RÜCKER, G.; NEUGEBAUER, M.; WILLEMS, G.G.: *Instrumentelle pharmazeutische Analytik* Stuttgart: Wiss. Verlagsgesellschaft, 1988
- RUDEL, R. A.; MELLY, S.; GENO, P. W.; SUN, G.; BRODY, J. G.: Identification of Alkylphenols and Other Estrogenic Phenolic Compounds in Wastewater, Septage, and Groundwater on Cape Cod, Massachusetts. In: *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998), Nr. 7, S. 861-869
- RURAINSKI, R.D.; THEISS, H.J.; ZIMMERMANN, W.: Über das Vorkommen von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Trinkwasser. In: *gwf* (1977), Nr. 6, S. 288-291

- RÜSSEL, H.: *Rückstandsanalytik von Wirkstoffen in tierischen Produkten* Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1986
- SAFE, S.: Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls: progress and problems. In: *Environ Health Perspect* 100 (1993), S. 259-268
- SAFE, S. H.; ZACHAREWSKI, T.: Organochlorine exposure and risk for breast cancer. In: *Prog Clin Biol Res* 396 (1997), S. 133-145
- SAFE, S.H.: Dietary and Environmental Estrogens and Antiestrogens and their Possible Role in Human Disease. In: *Environ. Sci. & Pollut Res.* 1 (1994), Nr. 1, S. 29-33
- SAFE, S.H.: Hazard and risk assessment of chemical mixtures using the toxic equivalency factor approach.. In: *Environ Health Perspect* 65 (1998), S. 1051-8
- SAMWEL, M.: Hormonell wirksame Chemikalien. In: *Umweltnachrichten* 81 (1999)
- SANDERSON, J. T.; SEINEN, W.; GIESY, J. P.; VAN DEN BERG, M.: 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? [In Process Citation]. In: *Toxicol Sci* 54 (2000), Nr. 1, S. 121-7
- SANTARIUS, K.; ROESEL, E.: The mass-specific detector as a multi-detector in the analysis of hormone residues in slaughter animals. In: *Fleischwirtschaft* 69 (1989), Nr. 12, S. 1841-5
- SANTODONATO, J.: Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. In: *Chemosphere* 34 (1997), Nr. 4, S. 835-848
- SANTTI, R.; MAKELA, S.; STRAUSS, L.; KORKMAN, J.; KOSTIAN, M. L.: Phytoestrogens: potential endocrine disruptors in males. In: *Toxicol Ind Health* 14 (1998), Nr. 1-2, S. 223-237
- SATTELBERGER, R.; HARTL, W.; LORBEER, G; SCHARF, S.: Steroidhormone in der aquatischen Umwelt- erste Untersuchungsergebnisse aus Österreich. In: KROIB, H. TU Wien: Wiener Mitteilungen Wasser Abwasser Gewässer: Hormonell aktive Substanzen in der Umwelt., 1998, S. 59-70
- SAWAL, G.; ZUM BRUCH, A.; LEPOM, P.: Method for the Simultaneous Determination of Estrogenic Steroids and Bisphenol A in Water Samples on Low Ppt-Level by Capillary Gas Chromatography / Mass Spectrometry. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- SCHÄFER, W.R.; ZAHRADNIK, H.P.; FRIJUS-PLESSEN, N.; SCHNEIDER, K.: Anthropogene Substanzen mit unerwünschter Östrogenwirkung. In: *Umweltmedizin* 1 (1996), Nr. 1, S. 35
- SCHÄFER, W.R.; ZAHRADNIK, H:P.; WERNER, K.: Xenoestrogene und menschliches Endometrium. In: *Umweltmedizin in Forschung und Praxis* 2 (1997), Nr. 4, S. 281-288
- SCHAFFNER, C.; REISER, R.; ALBRECHT, A.; STURM, M.; LOTTER, A.F.; GIGER, W.: Nonylphenol and Nonylphenolmonoethoxylate in Dated Recent Lake Sediments: Historic Record of Risk Reduction Measures. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- SCHÄNZER, W.: Doping. In: *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 44 (1996), S. 971-976



- SCHARF, S.; SATTELBERGER, R.; LORBEER, G.: Potentiell hormonell aktive Substanzen in der aquatischen Umwelt - erste Untersuchungsergebnisse aus Österreich. In: KROIB, H. TU Wien: Wiener Mitteilungen Wasser Abwasser Gewässer: Hormonell aktive Substanzen in der Umwelt., 1998, S. 45-58
- SCHIEWER, S.; VOßENKAUL, K.: Das Aachener Graduiertenkolleg zur Eliminierung Endokrin wirksamer Substanzen aus Wasser (AGEESA) - Einsatz von Membrantechnik zum verbesserten Abbau östrogenen Substanzen in Kläranlagen. In: <http://www.uwrf.rwth-aachen.de/Graduiertenkolleg> (1999)
- SCHIEWER, S.; VOßENKAUL, K.: Das Aachener Graduiertenkolleg zur Eliminierung Endokrin wirksamer Substanzen aus Abwasser (AGEESA) - Einsatz von Membrantechnik zum verbesserten Abbau östrogenen Substanzen in Kläranlagen. . In: T. MELIN, R. Rautenbach, M. Dohmann: Membrantechnik in der Wasseraufbereitung und Abwasserbehandlung, Begleitbuch zur 3. Aachener Tagung Siedlungswasserwirtschaft und Verfahrenstechnik. Aachen., 2000
- SCHILL, W.-B.: Zum Problem der Umweltbelastung aus andrologischer Sicht. In: *Fertilität* (1987), Nr. 3, S. 115-120
- SCHILL, W.-B.: Medikamentöse Einflüsse auf die männliche Fertilität. In: *medwelt* 40 (1989), S. 1247-1251
- SCHLEBUSCH, J.: pers. Mitteilung. (1998)
- SCHLETT, C.; PFEIFER, B.: Bestimmung von Steroidhormonen in Trink- und Oberflächenwässern. In: *Vom Wasser* (1996), Nr. 87, S. 327-333
- SCHLUMPF, M.; LICHTENSTEIGER, W.: Hormonaktive Xenobiotika - Störungen von Fortpflanzungs- und Entwicklungsprozessen. In: *UWSF - Z Umweltchem Ökotox* 8 (1996), Nr. 6, S. 321-332
- SCHLUMPF, M.; LICHTENSTEIGER, W.: Endokrin wirksame Chemikalien - Sind Reproduktionsstörungen bei Mensch und Tier die Folgen einer früheren Belastung?. In: *UWSF - Z Umweltchem Ökotox, Tagungsberichte ecomed '97 - Umwelt und Medizin* (1997)
- SCHLUMPF, M.; SUTER - EICHENBERG, R.; CONSCIENCE - EGLI, M.; HALLER, V.; COTTON, B.; DURRER, S.; STEINMANN, B.; MÜLLER, M.; LICHTENSTEIGER, W.: Persistent Cosmetics in the Ecosystem: Developmental and reproductive toxicity of musk xylene and UV sunscreens. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- SCHMITZ, A.; BÖHMER, W.; SCHÄFERS, C.; WENZEL, A.: Multigeneration study with ethinylestradiol: environmental concentrations affect reproduction in fish.. In: *Third SETAC World Congress, Brighton, UK, 21-25 May 2000, Abstract Book* (2000), S. 104
- SCHNEIDER, G.: Phthalsäureester-Emissionen aus Farben, Lacken, PVC-Bodenbelägen, Klebstoffen und Kosmetika. In: *Umwelt & Gesundheit* 1 (1995), S. 23
- SCHÖLER, H.F.: Polychlorierte Biphenyle (PCB). In: DOTT, W.; MERK, H.; NEUSER, J. und OSIEKA, R.: Lehrbuch der Umweltmedizin (in Vorbereitung). Stuttgart: WVG, 2001

- SCHRÖDER, H.F.: Festphasenextraktion mit selektiver Elution in Verbindung mit massenspektroskopischer Detektion - Eine vielversprechende Vorgehensweise bei der Untersuchung von Abwässern auf polare, organische Inhaltsstoffe. In: *Vom Wasser* 80 (1993), S. 323-339
- SCHROEDER, H.F.: Polar organic pollutants in the Elbe river. Liquid chromatographic-mass spectrometric and flow-injectionanalysis-mass spectrometric analyses demonstrating changes in quality and concentration during the unification process in Germany. In: *J. Chromatogr. A* 712 (1995), Nr. 1, S. 123-40
- SCHULTE, E.; WEBER, K.: Schnelle Herstellung der Fettsäuremethylester aus Fetten mit TMSH oder Natriummethylat. In: *Fat Sci. Technol.* 91 (1989), Nr. 5, S. 181-183
- SCHWEINFURTH, H.; LÄNGE, R.; MIKLAUTZ, H.; SCHAUER, G.: Umweltverhalten und aquatische Toxizität von Ethinylestradiol. In: *Umweltbundesamt Austria CP-019* (1996), S. 283-7
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON TOXICITY, Ecotoxicity and the Environment of the European Union: Les Perturbateurs endocriniens: cause visible - effet frappant. In: *Consumer Voice* 2 (1999), S. 8
- SEIDEL, H.J.; KREFELDT, T.: Umweltmedizinische Katastrophen: Welche medizinischen Erkenntnisse bringt ihre Analyse?. In: *Umweltmed Forsch Prax* 3 (1998), Nr. 5, S. 313
- SEIFERT, M.; BRENNER-WEIß, G.; HAINDL, S.; NUSSER, M.; OBST, U.; HOCK, B.: A new concept for the bioeffects-related analysis of xenoestrogens: hyphenation of receptor assays with LC-MS. In: *Fresenius J Anal Chem* 363 (1999), S. 767-770
- SEIFERT, M.; HAINDL, S.; HOCK, B.: Development of an enzyme linked receptor assay (ELRA) for estrogens and xenoestrogens. In: *Anal Chim Acta* 386 (1999), S. 191-199
- SENG, D.; YUSUF, A.; BÖHM, S.; GUTH, S.; MÜBLER, B.; EISENBRAND, G.: Untersuchungen zur hormonellen/antihormonellen Aktivität verschiedener Lebensmittelinhaltsstoffe in funktionellen in vitro Assays. In: *Lebensmittelchemie* 52 (1998), S. 53
- SERVOS, M.R.; BURNISON, K.; BENNIE, D.; SHERRY, J.; BROWN, S.; VAN DER KRAAK, G.; SCHNELL, A.; TERNES, T.: Impacts of Alkylphenol Polyethoxylates, Natural and Synthetic Estrogens in Municipal Effluents in Canada. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- SEVERIN-EDMAIER, G.F.: *Effekte hormonell wirksamen Substanzen auf das Zooplankton aquatischer Modellsysteme* München: Dissertation TU München, 2000
- SHACKLETON, C. H. L.: Derivatization of estrogen conjugates for analysis by capillary gas chromatography. In: *Steroids* 38 (1981), Nr. 5, S. 485-94
- SHARPE, M.; SKAKKEBAEK, NE.: are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?. In: *Lancet* 341 (1993), S. 1392-1395
- SHARPE, R.M.; TURNER, K.J.; SUMPTER, J.P.: Endocrine disruptors and testis development [letter]. In: *Environ Health Perspect* 65 (1998), Nr. 5, S. A220-1
- SIEKMANN, L.; SIEKMANN, A.; BREUER, H.: Measurement by isotope dilution mass spectrometry of 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol-17 $\beta$  and norethisteronein serum of women taking oral contraceptives. In: *Biomedical Mass Spectrometry* 7 (1980), Nr. 11/12, S. 511-514

SMITH, R.-K.; BROWN, M.; STONE, J.: Determination of nonylphenol ethoxylate surfactants in wastewater. In: *American Chemical Society National Meeting, San Francisco* (2000)

SMITHERMAN, R.O.; SHELTON, W.; GOVER, H.: Production of normal male and androgen sex-reversed *Tilapia aurea* and *Tilapia nilotica* fed with a commercial catfish diet in ponds. Proceedings of the Symposium on Culture of Exotic Fishes, Atlanta, Georgia, USA, 4-11 January 1978., S. 34-42

SNYDER, S.A.; KEITH, T.L.; VERBRUGGE, D.A.; SNYDER, E.M.; GROSS, T.S.; KANNAN, K.; GIESY, J.P.: Analytical Methods for Detection of Selected Estrogenic Compounds in Aquaeous Mixtures. In: *EST 33* (1999), S. 2814-2820

SOLMSEN, U.V.: Synthetic estrogens and the relation between their structure and activity. In: *Chem. Rev.* 36 (1945), S. 481-598

SONNEBORN, M.; AURAND, K.; HÄSSELBARTH, H.; LAHMANN, E.; MÜLLER, G.; NIEMITZ, W.: Zum Vorkommen von Steroiden mit biologisch wirksamer Östrogenaktivität im Wasserkreislauf. In: *Organische Verunreinigungen in der Umwelt, ISBN 3 503 017 135 20 3* (1978)

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M.: An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. In: *J Steroid Biochem Mol Biol* 65 (1998), Nr. 1-6, S. 143-150

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A.M.; FERNANDEZ, M.F.; OLEA, N.; OLEA-SERRANO, M.F.; RUIZ-LOPEZ, M.; DOLORES, M.: Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. In: *Clin. Chem. (Washington, D. C)* 41 (1995), Nr. 12B, Pt. 2, S. 1888-95

SOTO, A. M.; MICHAELSON, C. L.; PRECHTL, N. V.; WEILL, B. C.; SONNENSCHNEIN, C.; OLEA-SERRANO, F.; OLEA, N.: Assays to measure estrogen and androgen agonists and antagonists. In: *Adv Exp Med Biol* 444 (1998), S. 9-23; discussion 23-8

SOTO, A.M.; LIN, T.M.; JUSTICIA, H.; SILVIA, R.M.; SONNENSCHNEIN, C.: An "in culture" Bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (e-screen). In: COLBORN, T. und CLEMENT, C.: Chemically induced alterations in sexual development: the wildlife/human connection., S. 295-309

SOTO, A.M.; JUSTICIA, H.; WRAY, J.W.; SONNENSCHNEIN, C.: p-Nonyl-Phenol: An Estrogenic Xenobiotic Released from "Modified Polystyrene". In: *Environment Health Perspectives* 92 (1991), S. 167-173

SOTO, A.M.; CHUNG, K.L.; SONNENSCHNEIN, C.: The Pesticides Endosulfan, Toxaphene and Dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. In: *Environmental health Perspectives* 102 (1994), Nr. 4, S. -380383

SOTO, A.M.; SONNENSCHNEIN, C.; CHUNG, K.L.; SERRANO, M.F.; OLEA, N.; FERNANDEZ, M.F.: The E-Sreen assay as a tool to identify estrogens; An update on estrogenic environmental pollutants. In: *Environ.Health Perspect.* 103 (1995), S. 113-122

SOTO, A.M.; SONNENSCHNEIN, C.; PRECHTL, N.V.; WEILL, B.C.; MICHAELSON, C.L.: In vitro Assays for Hormone Agonists and Antagonists: The E-SCREEN Assay. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)

- SPENGLER, P.; ORTH, C.; KÖRNER, W.; METZGER, J.W.: Schwer abbaubare Substanzen mit östrogenartiger Wirkung im Abwasser von kommunalen und industriellen Kläranlagenabläufen. In: *Jahrestagung der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der GDCH, Jena* (1999), S. P. 44
- STEPHANOU, E.: Environmental determination of alkylphenol polyethoxylate refractory residues using mass spectrometric techniques. In: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 20 (1985), Nr. 1-2, S. 41-54
- STEPHANOU, E.; REINHARD, M.; BALL, H.A.: Identification and quantification of halogenated and non-halogenated octylphenol polyethoxylate residues by gas chromatography/mass spectrometry using electron ionization and chemical ionization. In: *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 15 (1988), Nr. 5, S. 275-82
- STOESSEL, J. M.; ULRICH, A. M.; HUMBERT, E.: Gas-chromatographic determination of estriol during pregnancy. In: *Bull. Soc. Pharm. Nancy* 95 (1972), S. 28-41
- STOKER, T.E.; PARKS, L.G.; GRAY, L.E.; COOPER, R.L.: Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid function in the male rat. A focus on the EDSTAC recommendations. Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee. In: *Crit Rev Toxicol* 30 (2000), Nr. 2, S. 197-252
- STRAUSS, L.; SANTTI, R.; SAARINEN, N.; STRENG, T.; JOSHI, S.; MAKELA, S.: Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. In: *Toxicol Lett* 102-103 (1998), S. 349-354
- STRAUSS, L.; MÄKELÄ, S.; STRENG, T.; SALMI, S.; JOSHI, S.; SANTTI, R.: Phytoestrogens, Potential Endocrine Disruptors in Males. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- STROPP, G.: Hormonähnliche Wirkungen von Chemikalien - eine aktuelle Diskussion in der Toxikologie. In: *GIT Bioforum* (2000), Nr. 9, S. 584-586
- STUMPF, Marcus; TERNES, Thomas A.; HABERER, Klaus; BAUMANN, Wolfram: Determination of natural and synthetic estrogens in sewage plants and river water. In: *Vom Wasser* 87 (1996), S. 251-261
- SUCHER, W.; BENNETT, J.; CATBURY, D.: Attacke auf die Manneskraft. In: *SDR, Abenteuer Wissenschaft, Studio Mannheim 1994, März* (1994), Nr. 3
- SUMPTER, J. P.: Xenoendocrine disrupters--environmental impacts. In: *Toxicol Lett* 102-103 (1998), S. 337-342
- SUMPTER, J.P.: Reproductive effects from estrogen activity in polluted water. In: *Arch Toxicol* (1998), Nr. Suppl. 20, S. 143-150
- SUMPTER, J.P.: Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Freshwater Fish. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- SUMPTER, J.P.; JOBLING, S.: Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. In: *Environmental health Perspectives* 103 (1995), S. 173-178

- SUMPTER, J.P.; JOBLING, S.; TYLER, C.R.: oestrogenic substances in the aquatic environment and their potential impact on animals, particularly fish. In: *Soc. Exp. Biol. Biochem. Semin. Series 57* (1996), S. 205-224
- SUN, Gang; GENO, Paul W.: determination of trace endocrine active phenolic compounds by GC/MS. In: *Meas. Toxic Relat. Air Pollut., Proc. Spec. Conf. Publisher: Air & Waste Management Association, Pittsburgh, Pa. 2* (1997), S. 477-485
- SUPELCO INC.: Produktspezifikation Sylon BTZ. (1996), Nr. T496019
- SUZUKI, H.: Minamata disease (mercury poisoning). In: *Kangogaku Zasshi* 34 (1970), Nr. 8, S. 126-127
- TABAK, H.; BUNCH, R.L.: *Development in Industrial Microbiology* Washington:, S. 367-376
- TAKADA, H.; ISOBE, T.; NAKADA, N.; NISHIYAMA, H.; IGUCHI, T.; IRIE, H.; MORI, C.: Bisphenol A and Nonylphenols in Human Umbilical Cords. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- TAKAHASHI, S.; TANABE, S.; TAKEUCHI, I.; MIYAZAKI, N.: Distribution and specific bioaccumulation of butyltin compounds in a marine ecosystem. In: *Arch Environ Contam Toxicol* 37 (1999), S. 50-61
- TAKIZAWA, Y.: Studies on the Niigata episode of Minamata disease outbreak. Investigation of causative agents of organic mercury poisoning in the district along the river Agano. In: *Acta Med Biol (Niigata)* 17 (1970), Nr. 4, S. 293-297
- TAUBERT, H.-D.; KUHL, H.: *Kontrazeption mit Hormonen 2. Aufl.* Stuttgart - New York: Georg Thieme erlag , 1995, S. 74
- TAYLOR, M. R.; HOLMES, P.; DUARTE-DAVIDSON, R.; HUMFREY, C. D.; HARRISON, P. T.: A research strategy for investigating the ecological significance of endocrine disruption: report of a UK workshop. In: *Sci Total Environ* 233 (1999), Nr. 1-3, S. 181-191
- TCHERNITCHIN, A.N.; TCHERNITCHIN, N.N.; MENA, M.A.; UNDA, C.; SOTO, J.: Imprinting: perinatal exposures cause the development of diseases during the adult age. In: *Acta Biol Hung.* 50 (1999), Nr. 4, S. 425-40
- TERNES, T.A.: Pharmaka und endokrin wirksame Verbindungen in Gewässern. In: *ATV-Schriftenreihe* 15 (1999), S. 66-73
- TERNES, T.A.; KRECKEL, P., Mueller, P.; WILKEN, R.-D.: Verhalten und Auftreten von natürlichen und synthetischen Hormonen in kommunalen Kläranlagen. In: *GDCh-Umwelttagung, Karlsruhe* (1998), S. W 30
- TERNES, T.A.; KRECKEL, P.; MUELLER, J.; SCHUPPERT. B.; WILKEN, R.D.: Behavior and Occurrence of Estrogens in Municipal Sewage Treatment Plants. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- THEOBALD, A.; SIMONEAU, C.; PONCARI, P.; RONCARI, A.; ANKLAM, E.: Correlations between the levels of Bisphenol-A-diglycidether (BADGE) in cans, lids and homogenized food matrix from canned fish in oil. In: *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 95 (1999), Nr. 5, S. 186

- THEOBALD, A.; SIMONEAU, C.; RONCARI, P.; RONCARI, A.; ANKLAM, E.: Monitoring of Bisphenol-A-Diglycidether in Canned Milk Products and vegetable Oils. In: *DLR 95* (1999), Nr. 9, S. 362
- THIELE, B.; PRAST, H.; KLEIST, E.; GÜNTHER, K.; DÜRBECK, W.: Off-line-Kopplung von HPLC und GC-MS zur Bestimmung von Nonylphenol in Miesmuscheln. In: *Gerstel-Informationsschrift* (1996), S. 12
- THIELE, B.; PRAST, H.; GÜNTHER, K.: New Methods for the Ultra Trace Analysis of Nonylphenol in Environmental Matrices. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- THIELEMANN, H.: Experimentelle Untersuchungen zur Festphasenanreicherung von Phenolverbindungen aus wässriger Matrix an Adsorberharz. In: *Gesundheits-Ing.* 115 (1994), S. 313
- THIER, H.-P.: *Rückstansanalytik von Pflanzenschutzmitteln* Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1986. - 3-13-666601-1
- THIERFELDER, W.: Hormone in der Umwelt - das Ende der Männlichkeit?. In: *Bundesgesundheitsblatt* (1995), Nr. 9, S. 337
- THIERFELDER, W.; MEHNERT, W.H.; LAUBMANN, D.; ARNDT, D.; REINEKE, H.H.: Der Einfluß umweltrelevanter östrogenen oder östrogenartiger Substanzen auf das Reproduktionssystem. In: *Bundesgesundheitsblatt* (1995), Nr. 9, S. 338
- THIERFELDER, W.; SEHER, Ch.; DORTSCHY, R.; ENGEL, S.: Abnahme der Spermaqualität bei gesunden Männern aus ungewollt kinderlosen Partnerschaften. In: *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 42 (1999), Nr. 6, S. 471
- THUREN, A.: Determination of phthalates in aquatic environments. In: *Bull Environ Contam Toxicol* 36 (1986), Nr. 1, S. 33-40
- THURMAN, E.M.; MILLS, M.S.: *Solid-phase extraction: principles and practice* In: JOHN WILEY AND SONS 1. Aufl. New York, 1998. - 0-471-61422-X
- TIKKANEN, M. J.; ADLERCREUTZ, H.: Method for the quantitative determination of urinary estriol conjugates in human pregnancy. In: *J. Steroid Biochem.* 31 (1972), Nr. (5), S. 807-18
- TILSON, H. A.; KAVLOCK, R. J.: The workshop on endocrine disrupter research needs: a report. In: *Neurotoxicology* 18 (1997), Nr. 2, S. 389-392
- TIMM, G.: Endocrine Disruptor Screening and Testing: A Consensus Strategy. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- TOBIN, J.M.; COONEY, J.J.: Action of inorganic tin and organotins on a hydrocarbon-using yeast *Candida maltosa*. In: *Arch Environ Contam Toxicol* 36 (1999), S. 7-12
- TOPP, E.; STARRATT, A.: Rapid Mineralization of 4-Nonylphenol In Soil. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- TOPPARI, J.; SKAKKEBAEK, N. E.: Sexual differentiation and environmental endocrine disrupters. In: *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12 (1998), Nr. 1, S. 143-156

- TOPPARI, J.; LARSEN, J.C.; CHRISTIANSEN, P.; GIWERCMAN, A.; GRANDJEAN, P.; GUILLETTE, L.J.; JEGOU, B.; JENSEN, T.K.; JOUANNET, P.; KEIDING, N.; LEFFERS, H.; MCLACHLAN, J.A.; MEYER, O.; MÜLLER, J.; RAJPERT-DEMEYRS, E.; SCHEIKE, T.; SHARPE, R.; SUMPTER, J.; SKAKKEBAEK, N.E.: Male Reproductive Health and Environmental Xenoestrogens. In: *Environmental Health Perspectives* 104 (1996), Nr. Suppl.4, S. 741
- TURAN, A.: Exkretion natürlicher und synthetischer Östrogene und ihrer Metabolite: Vorkommen und Verhalten in Wasser. In: UMWELTBUNDESAMT: Fachgespräch Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung, UBA Texte 65/95., 1995, S. 16-21
- TYLER, C. R.; JOBLING, S.; SUMPTER, J. P.: Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. In: *Crit Rev Toxicol* 28 (1998), Nr. 4, S. 319-361
- TYLER, C.R.; ROUTLEDGE, E.J.: Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment
- Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. In: *Pure & Appl. Chem.* 70 (1998), S. 9
- UEKI, M.: [Present status of forensic analyses and possible approach for a rapid identification of toxins] [In Process Citation]. In: *Nippon Hoigaku Zasshi* 53 (1999), Nr. 3, S. 318-321
- UMWELTBUNDESAMT: *Umweltbundesamt: Jahresbericht 1994*, 1994
- UMWELTBUNDESAMT: Beeinflussen Umweltchemikalien Verhalten und Gehirnentwicklung?. In: *Pressemitteilung* 01 (1999), S. 1-4
- UMWELTRAT: Sondergutachten Umwelt und Gesundheit (1999). In: <http://www.umweltrat.de/son99kf.htm> (1999)
- USDIN, S.: Sexual disruption in U.K. fish. In: *Endocrine/Estrogen letter* 4 (1998), Nr. 2, S. 5
- VALLS, M.; BAYON, J. M.; ALBAIGES, J.: Broad spectrum analysis of ionic and non-ionic organic contaminants in urban wastewaters and coastal receiving aquatic systems. In: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 39 (1990), Nr. 4, S. 329-48
- VAN DER VELDE, E.G.; BELFROID, A.C.; DE KORTE, G.A.L.; VERSTEEGH, A.F.M.; SCHÄFER, A.J.; VETHAAK, A.D.; RIJS, G.B.J.: Occurrence of Phthalates in Waste Water and Environmental Samples. Research in the Framework of a National Pilot Survey on Estrogenic Compounds (Loes). In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- VAN DER VELDE, E.G.; DE KORTE, G.A.L.; LINDERS, S.H.M.A.; HIJMAN, W.C.: Method Development for the Analysis of Phthalates in Environmental Samples with GC-MS. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- VAN DER VEN, H.: pers. Mitteilung. (2000)
- VAN LEEUWEN, F. X.; FEELEY, M.; SCHRENK, D.; LARSEN, J. C.; FARLAND, W.; YOUNES, M.: Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited . In: *Chemosphere* 40 (2000), Nr. 9-11, S. 1095-101

- VAN OS, J.L.: The Neglected Role of Domestic Animals in the Discussion on Hormone Disruptors. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- VETHAAK; A.D.; BELFROID, A.C.; MURK, AJ; DE VOOGT, P.; RIJSG.B.J.; SCHÄFER, A.J.: Dutch National Investigation into the Occurrence and Effects of Estrogenic Compounds in the Aquatic Environment (Loes): First Results and Lessons to be Learned. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- VINGGAARD, A. M.; JOERGENSEN, E. C.; LARSEN, J. C.: Rapid and sensitive reporter gene assays for detection of antiandrogenic and estrogenic effects of environmental chemicals. In: *Toxicol Appl Pharmacol* 155 (1999), Nr. 2, S. 150-160
- VINGGAARD, A.M.; LARSEN, J.C.: An Improved in vitro Method for Detection of Androgenic and Anti-Androgenic Effects of Environmental Chemicals. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- VOGEL, R.: Eine Teststrategie für die Erfassung der reproduktionstoxizität chemischer Stoffe. In: *Bundesgesundheitsbl.* 3 (1994), S. 114-117
- VOGELGESANG, J.: Limit of detection and limit of determination: application of different statistical approaches to an illustrative example of residue analysis. In: *Fresenius Z. Anal Chem* 328 (1987), S. 213-220
- VOLLES, P.: Östrogenartige Chemikalien: Starke Mischung. In: *Deutsche Apotheker-Zeitung* (1996), Nr. 32, S. 54
- VOLMER, D.A.; HUI, J.P.M.: Rapid SPME/LC/MS/MS analysis of N-methylcarbamate pesticides in water. In: *Arch Environ Contam Toxicol* 35 (1998), S. 1-7
- VOM SAAL, F. S.; NAGEL, S. C.; PALANZA, P.; BOECHLER, M.; PARMIGIANI, S.; WELSHONS, W. V.: Estrogenic pesticides: binding relative to estradiol in MCF-7 cells and effects of exposure during fetal life on subsequent territorial behaviour in male mice. In: *Toxicol Lett* 77 (1995), Nr. 1-3, S. 343-350
- VOM SAAL, F.S.: Environmental estrogenic chemicals: their impact on embryonic development. In: *Hum.Ecol.Risk Assess.* 1 (1995), S. 3-15
- VOS, J. G.; DYBING, E.; GREIM, H. A.; LADEFOGED, O.; LAMBRE, C.; TARAZONA, J. V.; BRANDT, I.; VETHAAK, A. D.: Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. In: *Crit Rev Toxicol* 30 (2000), Nr. 1, S. 71-133
- WAHLBERG, C.; RENBERG, L.; WIDEQVIST, U.: Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates as their pentafluorobenzoates in water, sewage sludge and biota. In: *Chemosphere* 20 (1990), Nr. 1-2, S. 179-95
- WALKER, S. E.; KEISLER, L. W.; CALDWELL, C. W.; KIER, A. B.; VOM SAAL, F. S.: Effects of altered prenatal hormonal environment on expression of autoimmune disease in NZB/NZW mice. In: *Environ Health Perspect* 104 Suppl 4 (1996), S. 815-821



- WALTHER, B.Th.: Assessing reproductive toxicity based on zogenetic assays of xenoestrogens, and new concepts concerning animal gestation. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- WCG UND NAW: *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser- Abwasser- und Schlammuntersuchung* In: WASSERCHEMISCHE GESELLSCHAFT IN DER GDCH IN GEMEINSCHAFT MIT DEM NORMENAUSSCHUß WASSERWESEN IM DIN 47. Aufl. Weinheim / Berlin: Wiley-VCH ud Beuth
- WEBER, L. W.; GREIM, H.: The toxicity of brominated and mixed-halogenated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: an overview. In: *J Toxicol Environ Health* 50 (1997), Nr. 3, S. 195-215
- WEGENER, G.; PERSIN, J.; RÖRDEN, O.; KARRENBROCK, F.; HÜBNER, I.: Östrogene Substanzen - ein Problemfall für das Trinkwasser?. In: *Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft in Weimar* (29.-31.5.2000)
- WEISS, B.: A risk assessment perspective on the neurobehavioral toxicity of endocrine disruptors. In: *Toxicol Ind Health* 14 (1998), Nr. 1-2, S. 341-359
- WELSCH, F.: Hormonähnliche Stoffe in der Umwelt. In: *Mitt. der DDCh-Fachgr. Umweltchem u. Ökotox.* 5 (1999), Nr. 1, S. 4-6
- WERRES, F., Stien, J.; BALSAA, P.; SCHNEIDER, A.; WINTERHALTER, P.; OVERATH, H.: Automatisierte Bestimmung polarer Arzneimittelrückstände in Wässern mit Festphasenmikroextraktion und Derivatisierung. In: *Vom Wasser* 94 (2000), S. 135-147
- WHITE, R.; JOBLING, S.; HOARE, S.A., Sumpter, J.P., Parker, M.G.: Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. In: *Endocrinology* 135 (1994), S. 175-182
- WILCOX, A.J.; BAIRD, D.D.; WEINBERG, C.R.; HORNSBY, P.P.; HERBST, A.L.: Fertility in men exposed prenatally to Diethylstilbestrol. In: *New Engl J. of Med.* 221 (1995), Nr. 21, S. 1411
- WILD, D.; REINHARD, M.: Biotransformation of Octylphenoxyacetic Acid (OP1EC) in an Aquifer Model System. In: *International Scientific Conference on Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland, March 7 - 12, 1999* (1999)
- WILLINGHAM, E.; RHEN, T.; SAKATA, J. T.; CREWS, D.: Embryonic Treatment with Xenobiotics Disrupts Steroid Hormone Profiles in Hatchling Red-Eared Slider Turtles (*Trachemys scripta elegans*). In: *Environ Health Perspect* 108 (2000), Nr. 4, S. 329-332
- WINDLE, R. J.; WOOD, S.; SHANKS, N.; PERKS, P.; CONDE, G. L.; DA COSTA, A. P.; INGRAM, C. D.; LIGHTMAN, S. L.: Endocrine and behavioural responses to noise stress: comparison of virgin and lactating female rats during non-disrupted maternal activity. In: *J Neuroendocrinol* 9 (1997), Nr. 6, S. 407-414
- WITTE, H.: Noch mehr Gift im Klärschlamm?. In: *Korrespondenz Abwasser* 45 (1998), Nr. 5, S. 962
- WOLF, C.J.; LEBLANC, G.A.; OSTBY, J.S.; GRAY, L.E. Jr.: Characterization of the Period of Sensitivity of Fetal Male Sexual Development to Vinclozolin. In: *Toxicol Sci.* 44 (2000), Nr. 1, S. 152-161
- WUTTKE, W.; JARRY, H.; SEIDLOVA, D.: Endokrinologie: Endocrine Disrupters . In: *Reproduktionsmedizin* 15 (1999), Nr. 3, S. 173-178

- YOUNG, M.S.; PHILLIPS, D.J.; ROMANO, J.; KROL, J.: Hormonally active agents in water and food: a solid-phase extraction procedure for LC-MS and GC-MS analysis. In: *American Chemical Society National Meeting, San Francisco* (2000)
- ZACHAREWSKI, T.: Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of in vivo and in vitro assays. . In: *Environ Health Perspect* 105 (1998), Nr. B, S. 577-82
- ZADYMOV, V. V.; SMIRNOV, V. A.: Determination of the purity of industrial samples of diphenylolpropane. In: *Lakokras. Mater. Ikh Primen.* (1988), Nr. 3, S. 50-2
- ZELLER, A.; KALBFUS, W.: Belastung bayerischer Gewässer durch Nonylphenole. In: *Münchner Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie* 50 (1997), S. 55
- ZIETZ, B.; PFEIFFER, H.: Mutagenes Potenzial von Wasser aus Flüssen, Seen und Meeren. In: *gwf - Wasser Abwasser* 141 (2000), S. 164-171
- ZIMMERLI, B.; SCHLATTER, J.: Vorkommen und bedeutung der Isoflavone Genistein und Daidzein in der Säuglingsanfangsnahrung. In: *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 88 (1997), S. 219-232
- ZOELLER, R.T. et al.: Developmental exposure to polychlorinated biphenyls exerts thyroid hormone-like effects on the expression of RC3/neurogranin and myelin basic protein messenger ribonucleic acids in the developing rat brain.. In: *Endocrinology*. 141 (1999), Nr. 1, S. 181-189

## 7.3 Massenspektren und Chromatogramme

### Nonylphenol (als Trimethylsilylether)

Am Massenchromatogramm (FullScan) wurde deutlich, daß NP aus vielen, in der Seitenkette verschieden verzweigten Isomeren besteht. Die beste Trennung und ein guter Response fanden sich auf Massenspur  $m/z$  221. Es war klar, daß durch die Auswahl dieser Masse als Parent Ion oder als Quantifizierungsmasse nicht alle ca. 10 Isomeren berücksichtigt würden, es ist jedoch eine repräsentative Auswahl von 5 Peaks getroffen; vor allen Dingen weil die in den Realproben gefundenen NP-Isomeren in ihrem Muster immer einheitlich erschienen: im konstanten Verhältnis zueinander und mit dem Standard übereinstimmend.

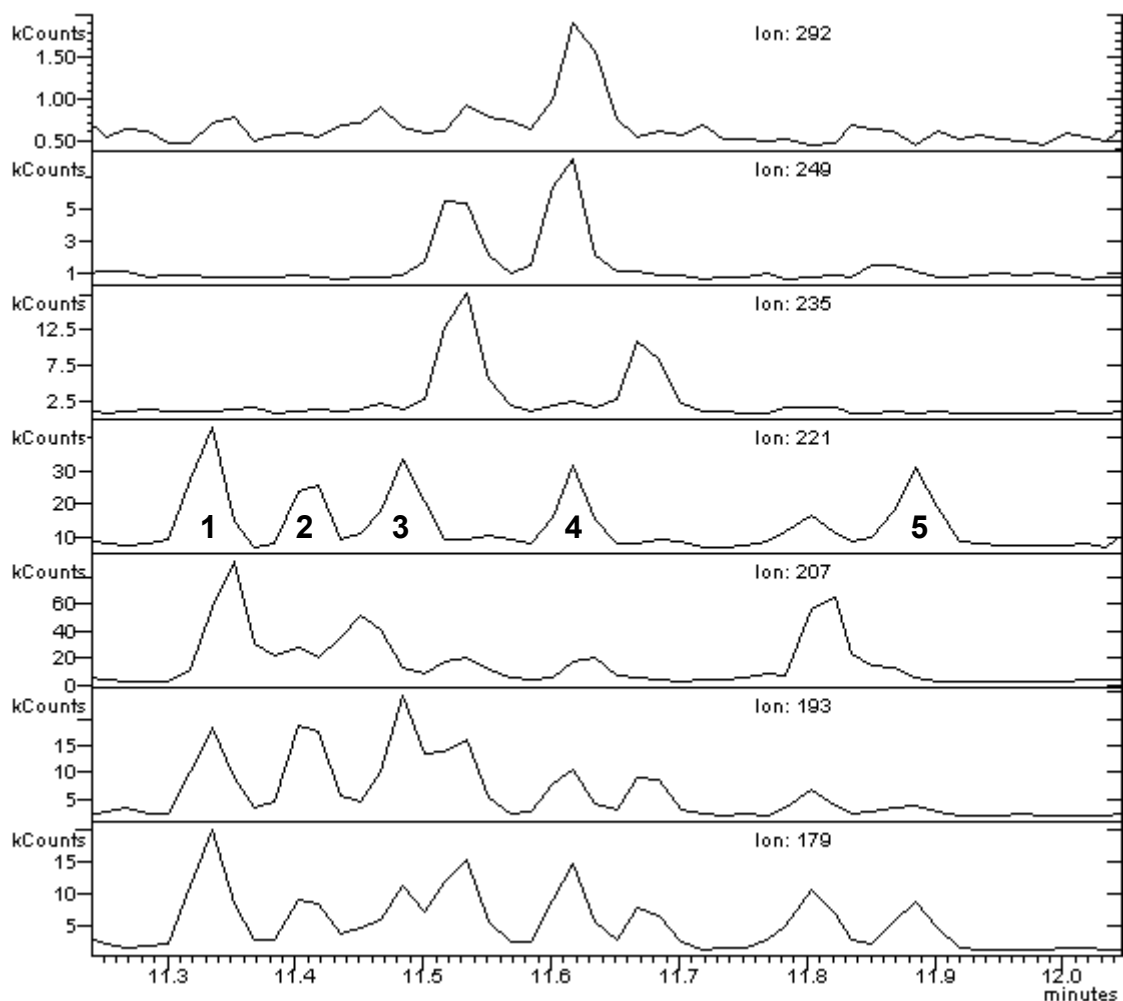
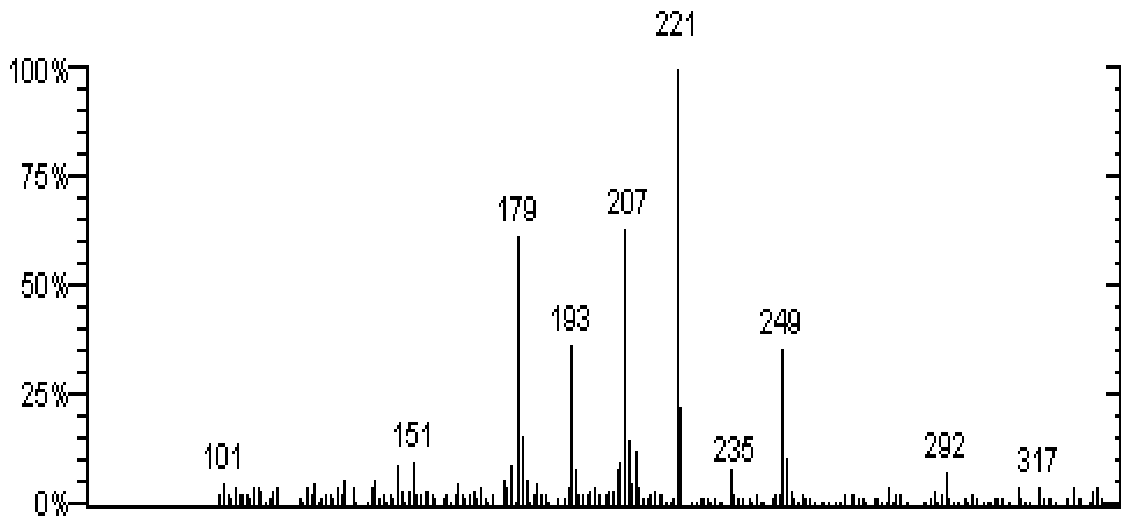


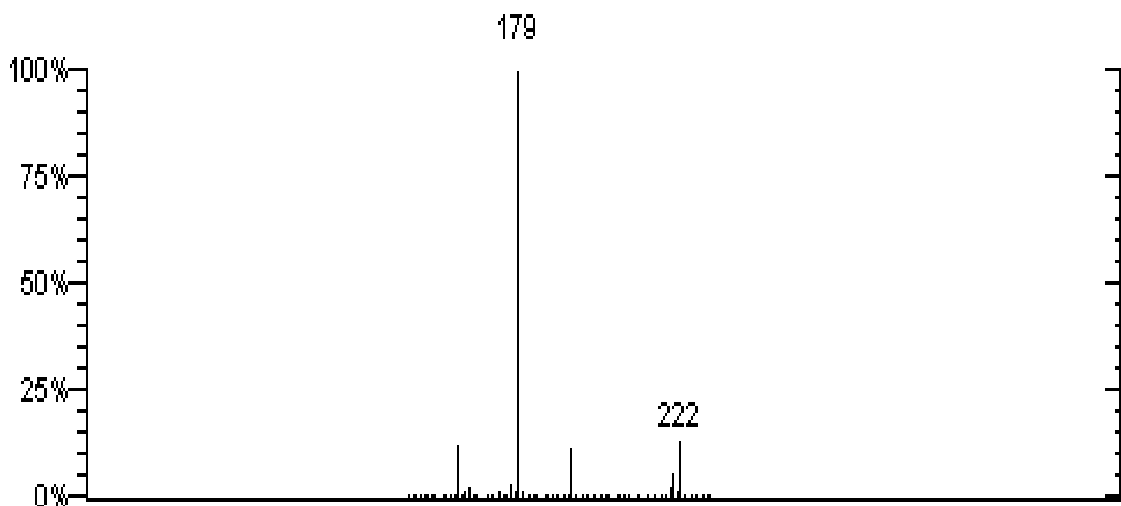
Abbildung 75: Massenchromatogramme TMS-NP Full Scan

Dementsprechend besitzt NP so viele Massenspektren wie Isomeren; als repräsentativ ist hier das von Peak 4 angegeben, weil alle wichtigen Fragmente ( $m/z$  179, 193, 207, 221, 235, 249) gut zu erkennen sind und ausnahmsweise  $M^+$  ( $m/z$  292) zu sehen ist.



**Abbildung 76: Massenspektrum TMS-NP Full Scan (Peak 4)**

Durch die Fragmentierung der  $m/z$  221 von den 5 Peaks entsteht das spezifische Tochtterspektrum mit der Quantifizierungsmasse 179:



**Abbildung 77: Massenspektrum TMS-NP MS/MS**

## Octylphenol (als Trimethylsilylether)

Ähnlich wie NP tritt auch OP mit 2 Isomeren auf. Durch resonante Fragmentierung der Parent mass 207 entsteht das Tochtterspektrum mit der Quantifizierungsmasse 179.

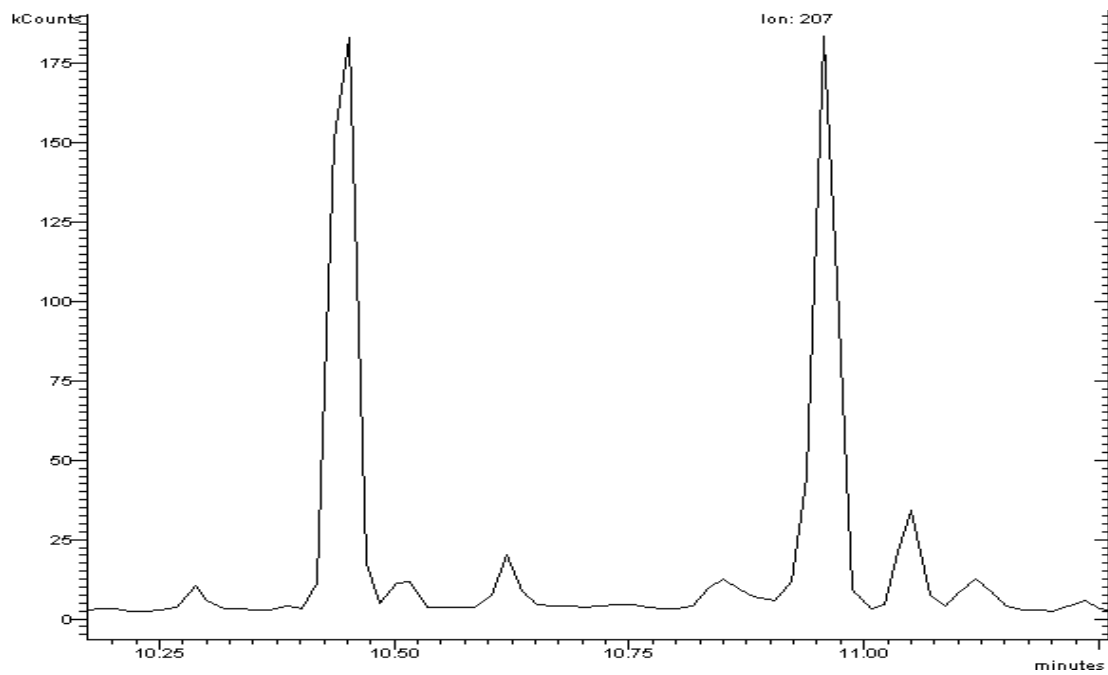


Abbildung 78: Massenchromatogramm TMS-OP auf m/z 207

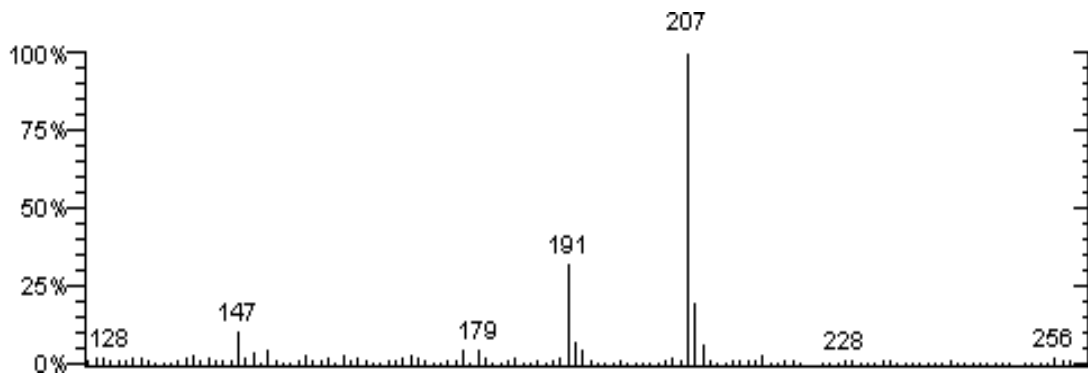


Abbildung 79: Massenspektrum TMS-OP Full Scan

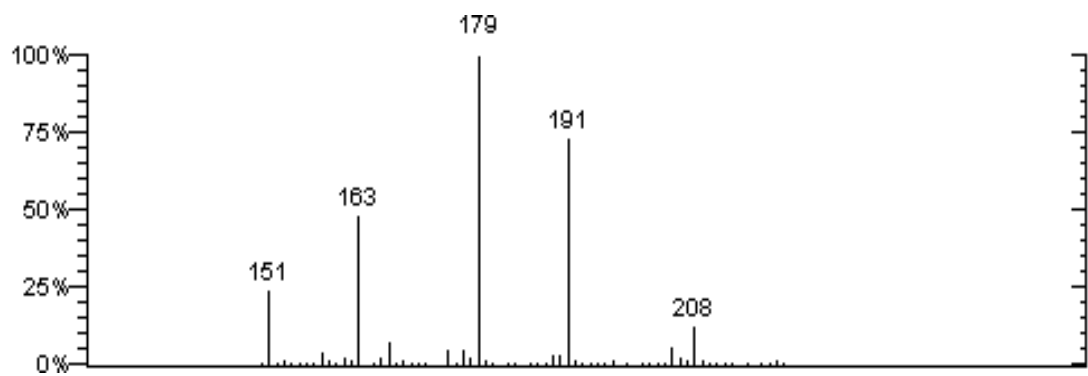
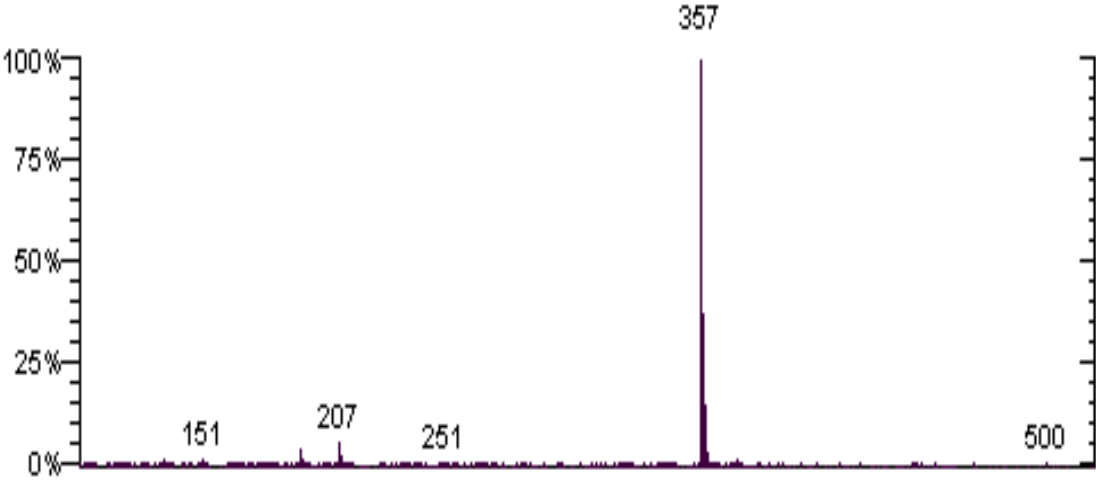
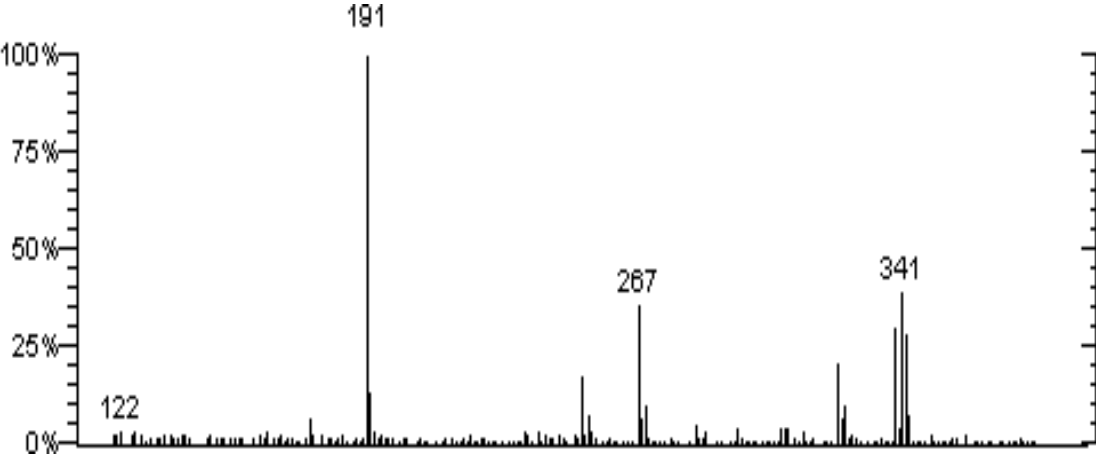


Abbildung 80: Massenspektrum TMS-OP MS/MS

**Bisphenol A (als Trimethylsilylether)**

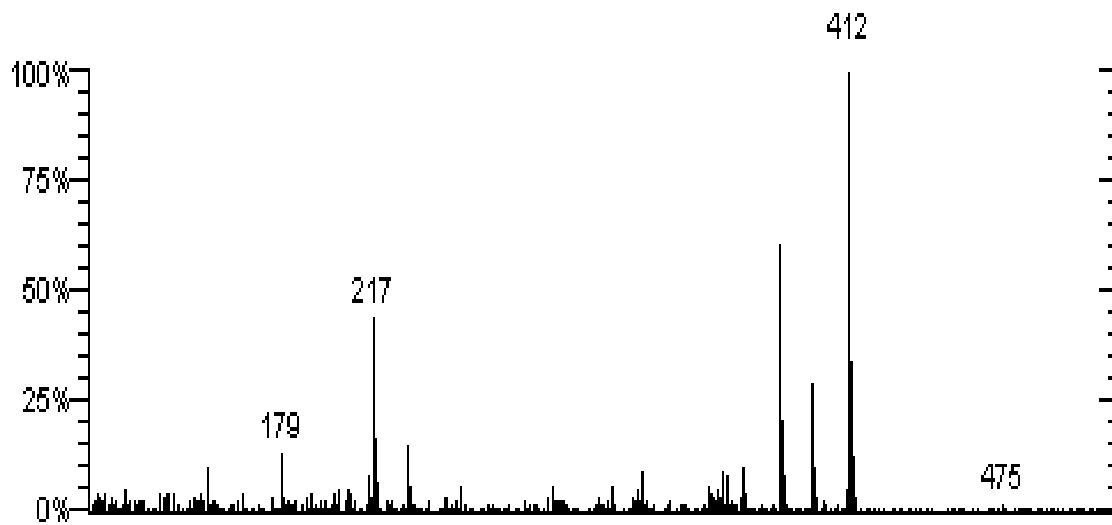


**Abbildung 81: Massenspektrum TMS-BPA Full Scan**

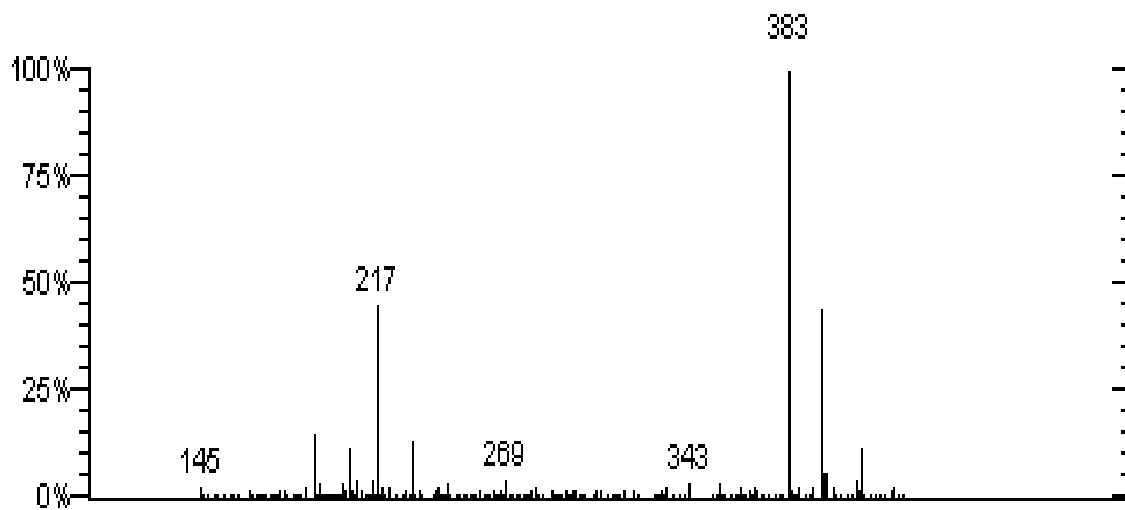


**Abbildung 82: Massenspektrum TMS-BPA MS/MS**

**Diethylstilbestrol (als Trimethylsilylether)**



**Abbildung 83: Massenspektrum TMS-DES Full Scan**



**Abbildung 84: Massenspektrum TMS-DES MS/MS**



## Hexestrol (als Trimethylsilylether)

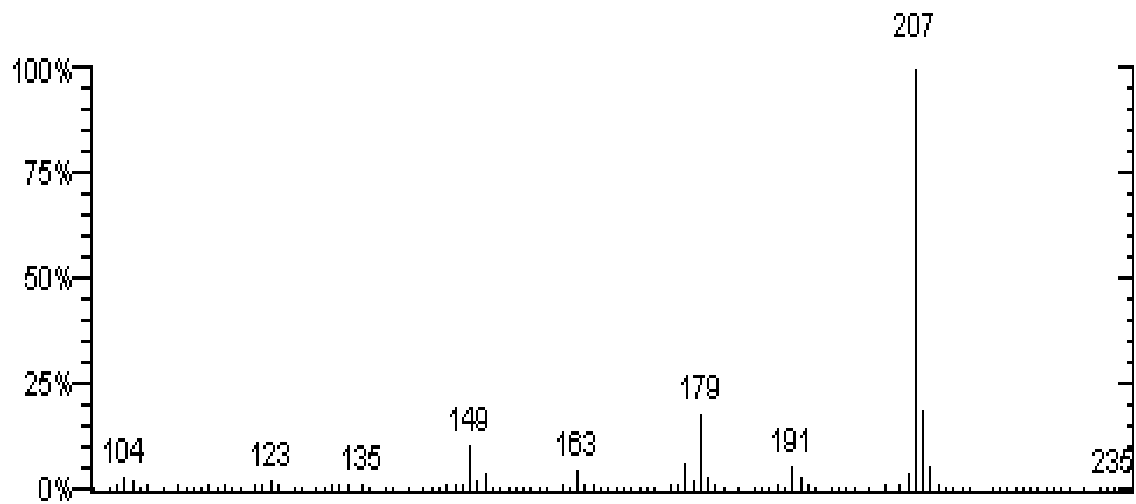


Abbildung 85: Massenspektrum TMS-HEX Full Scan

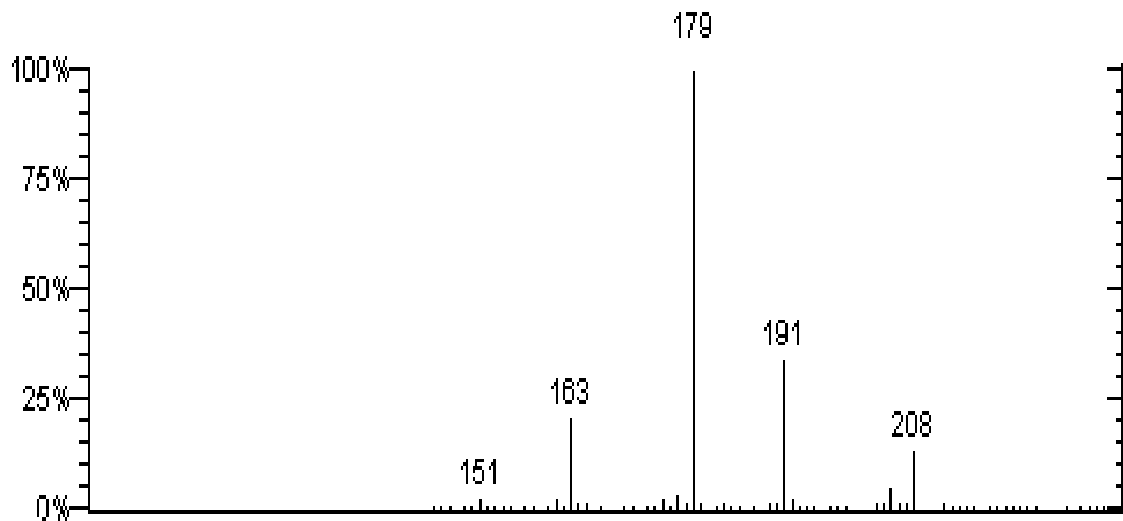
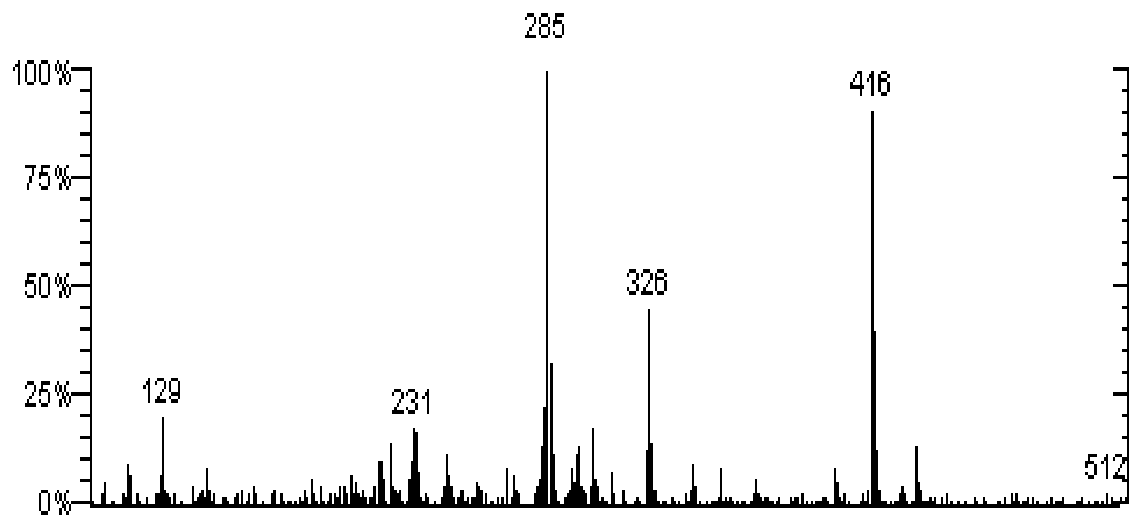
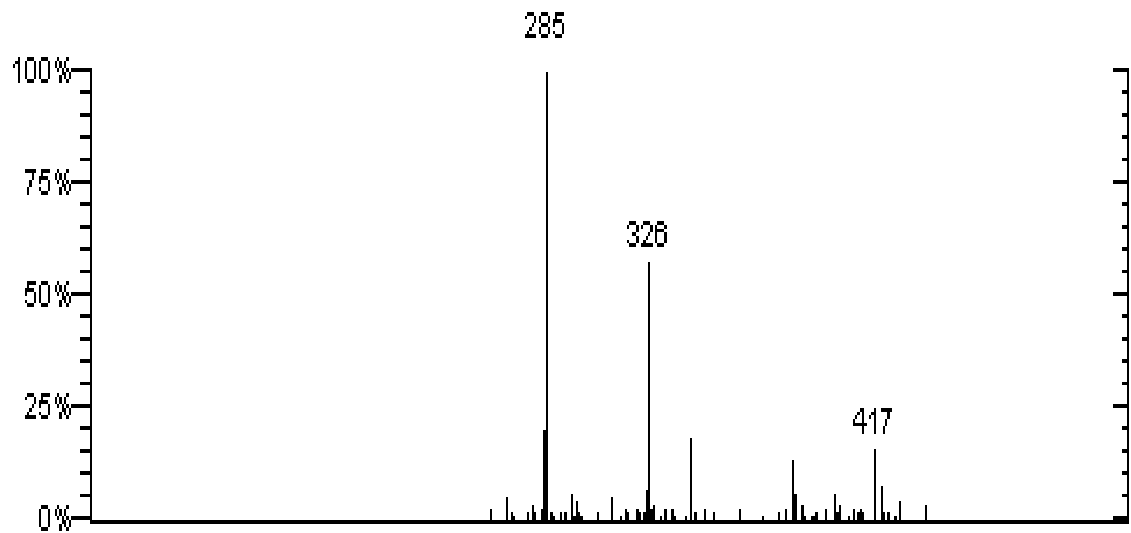


Abbildung 86: Massenspektrum TMS-HEX MS/MS

**Estradiol (als Trimethylsilylether)**

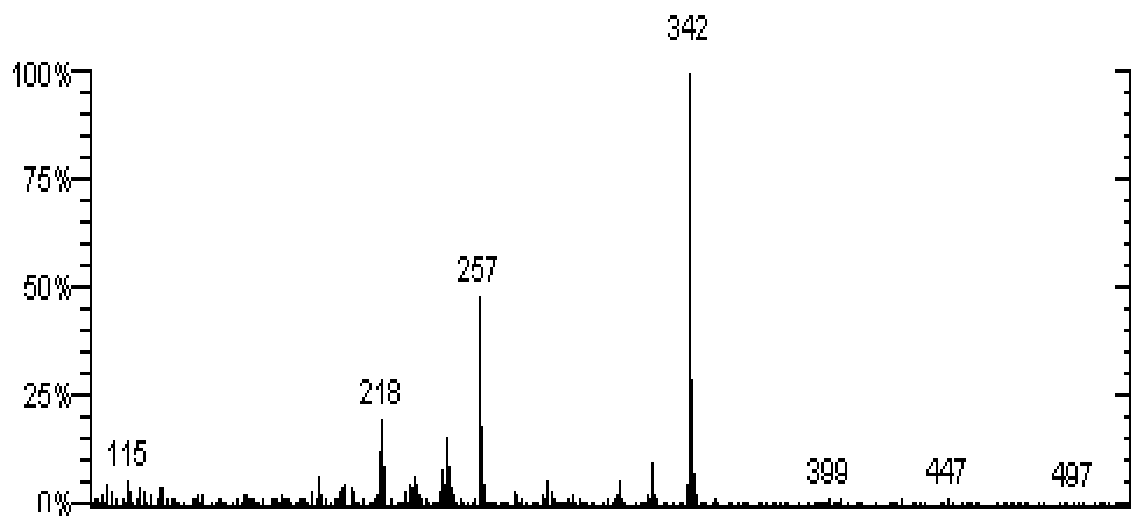


**Abbildung 87: Massenspektrum TMS-EDI Full Scan**

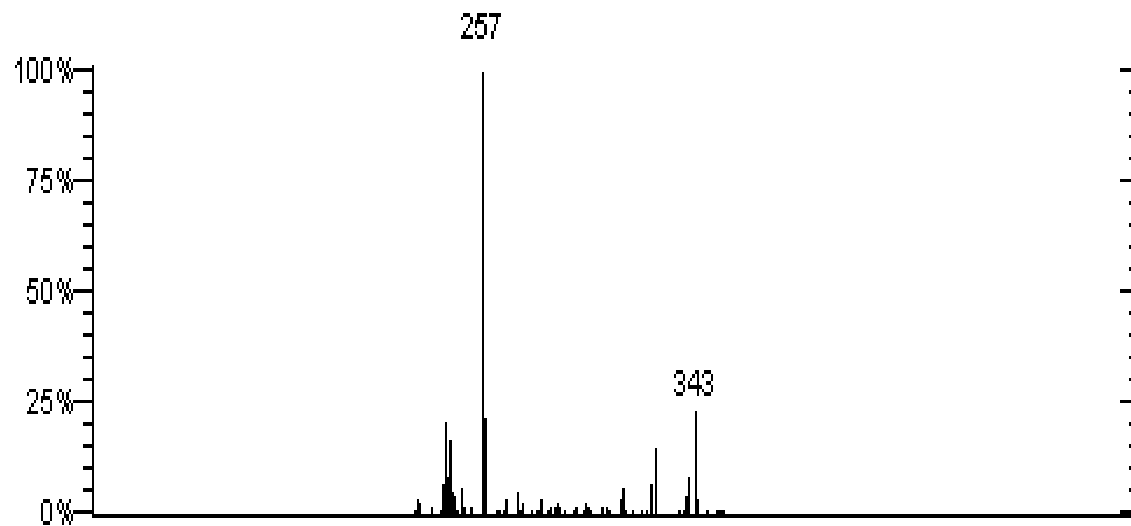


**Abbildung 88: Massenspektrum TMS-EDI MS/MS**

**Estron (als Trimethylsilylether)**

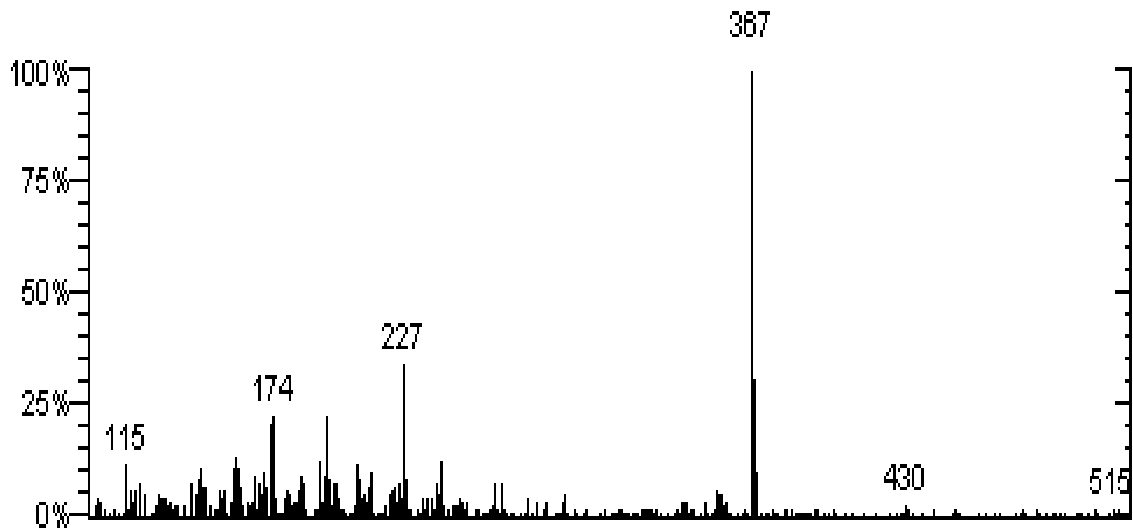


**Abbildung 89: Massenspektrum TMS-EST Full Scan**

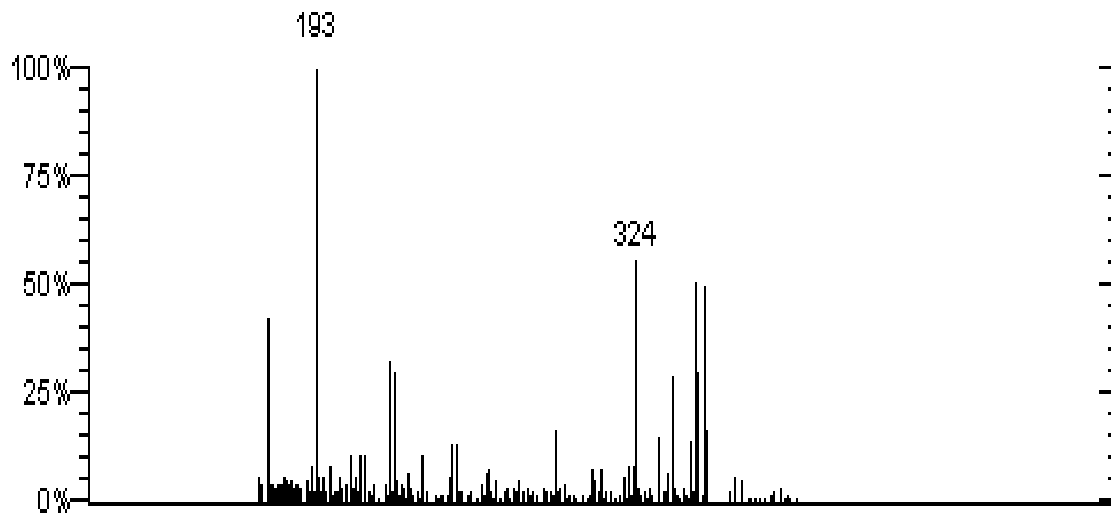


**Abbildung 90: Massenspektrum TMS-EST MS/MS**

**Mestranol (als Trimethylsilylether)**



**Abbildung 91: Massenspektrum TMS-MES Full Scan**



**Abbildung 92: Massenspektrum TMS-MES MS/MS**

### Ethinylestradiol (als Trimethylsilylether)

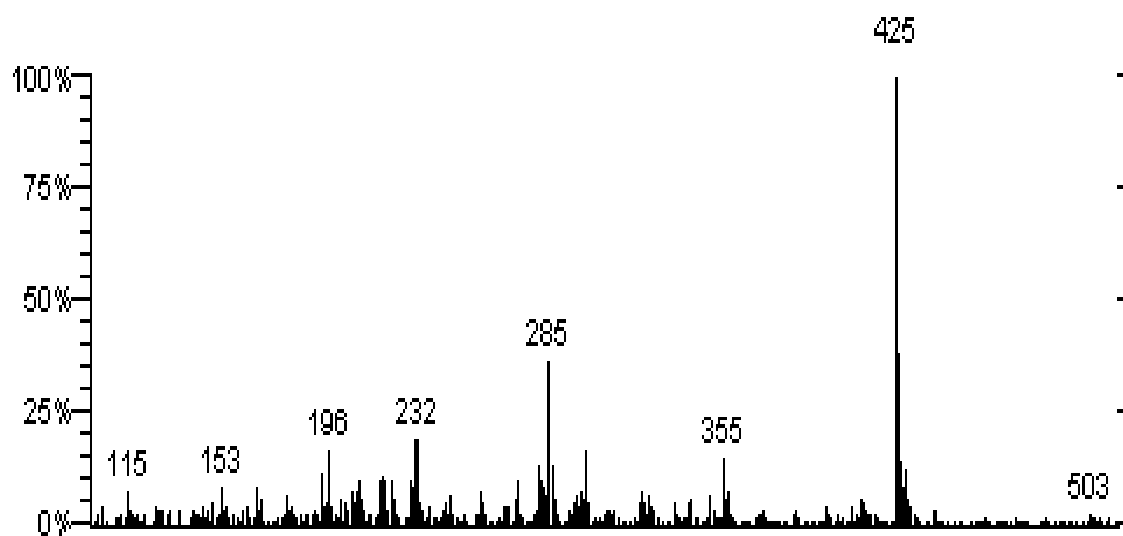


Abbildung 93: Massenspektrum TMS-EED Full Scan

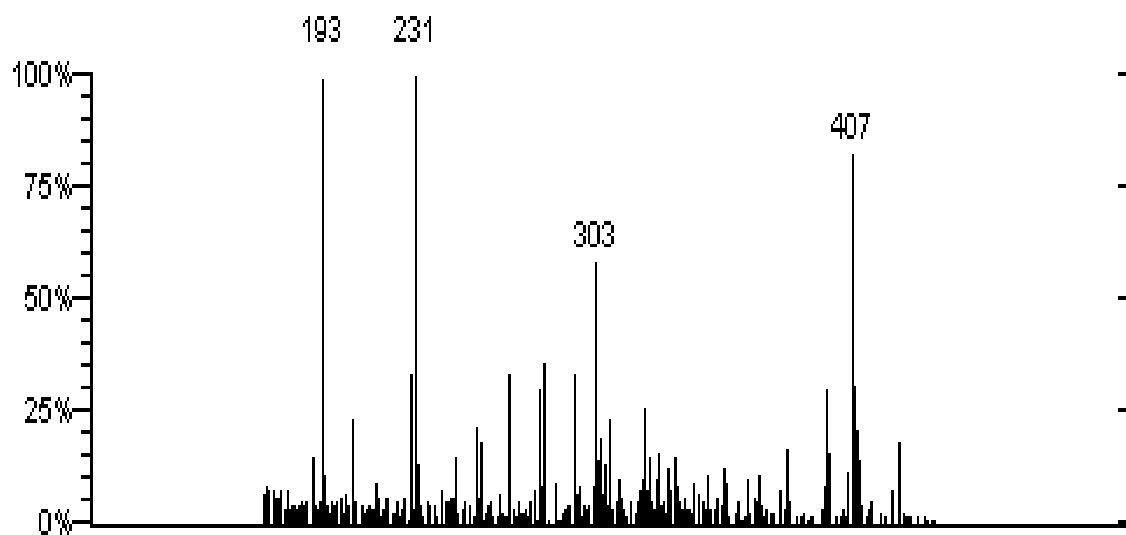


Abbildung 94: Massenspektrum TMS-EED MS/MS

### Androsteron (als Trimethylsilylether)

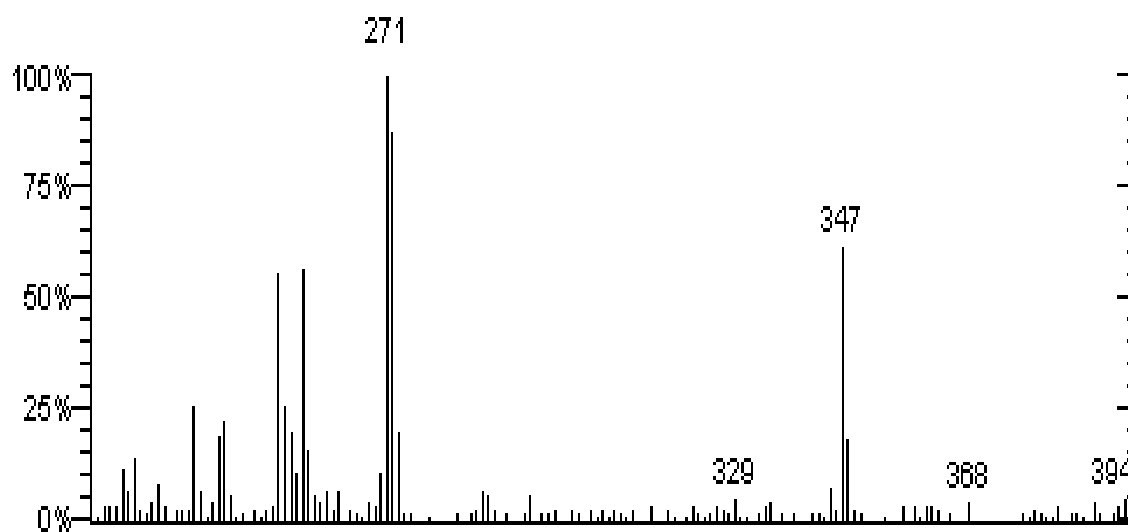


Abbildung 95: Massenspektrum TMS-AND Full Scan

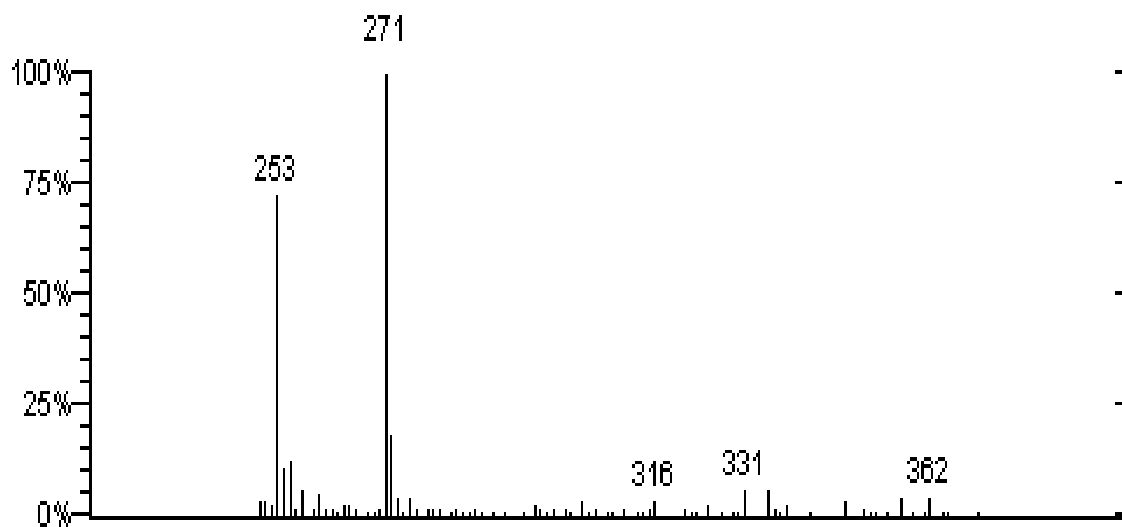
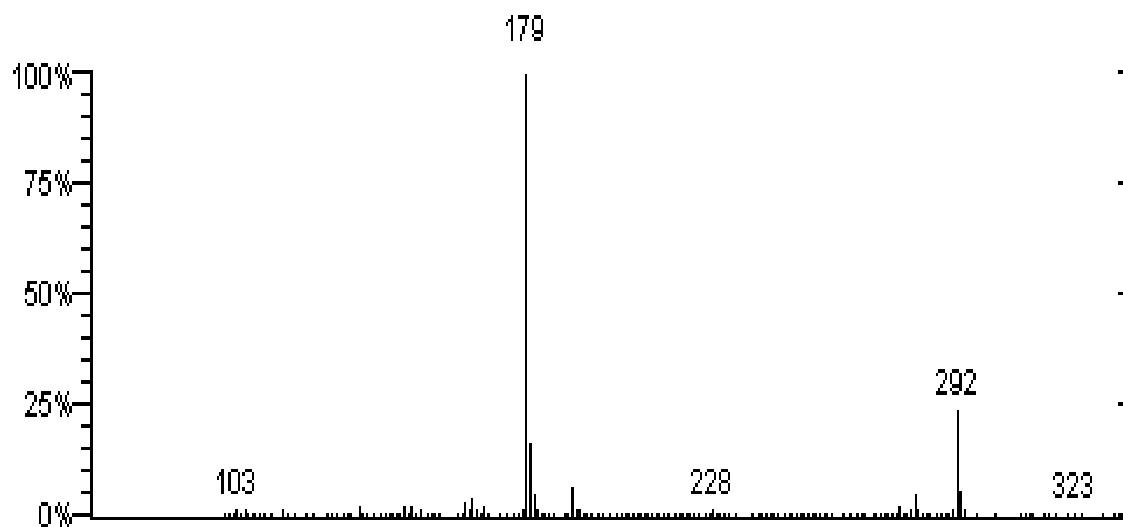
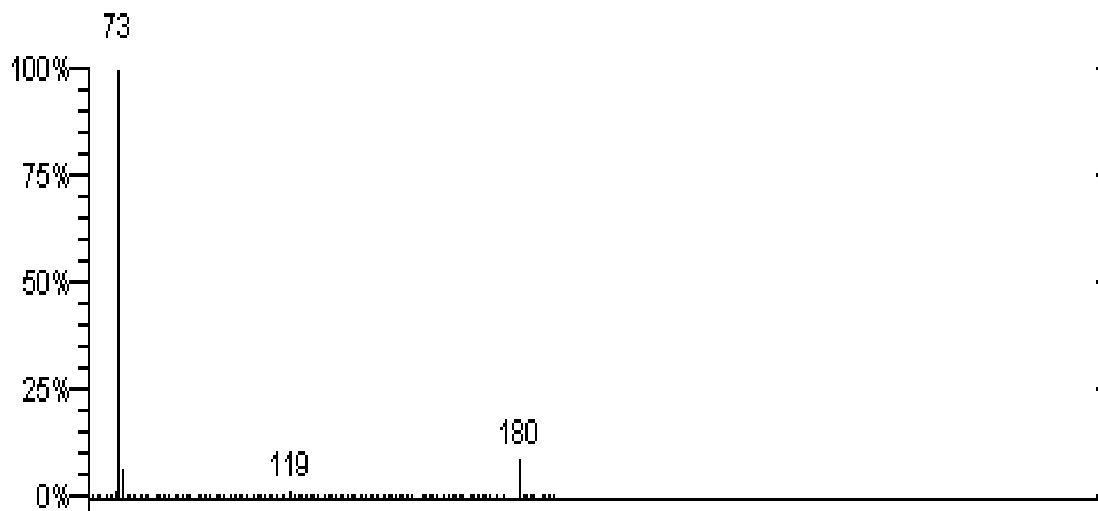


Abbildung 96: Massenspektrum TMS-AND MS/MS

**n-Nonylphenol (als Trimethylsilylether)**



**Abbildung 97: Massenspektrum TMS-n-NP Full Scan**



**Abbildung 98: Massenspektrum TMS-n-NP MS/MS**

## 2-Fluorestradiol (als Trimethylsilylether)

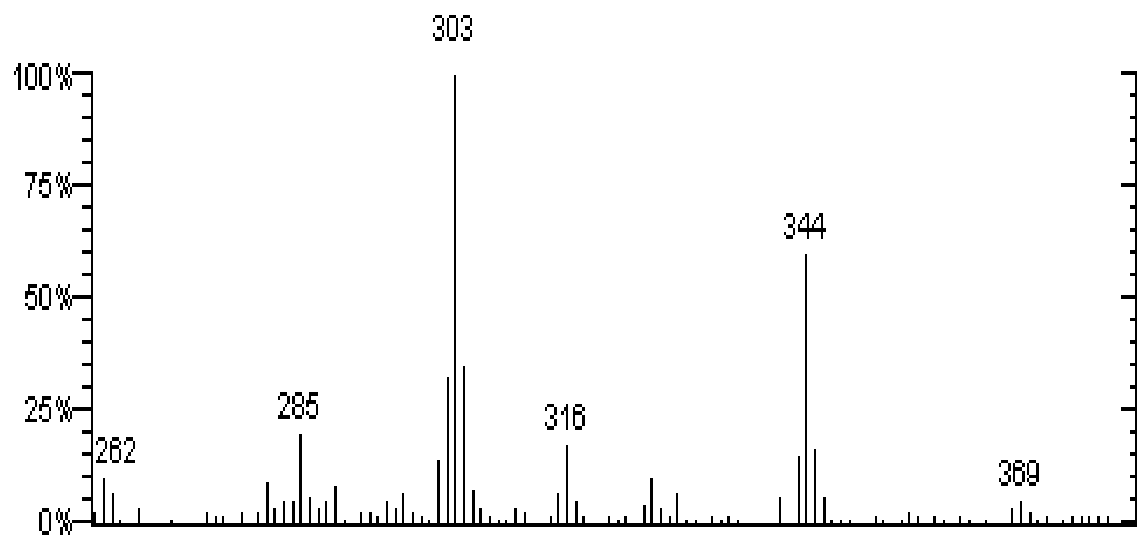


Abbildung 99: Massenspektrum TMS-2-Fluorestradiol Full Scan

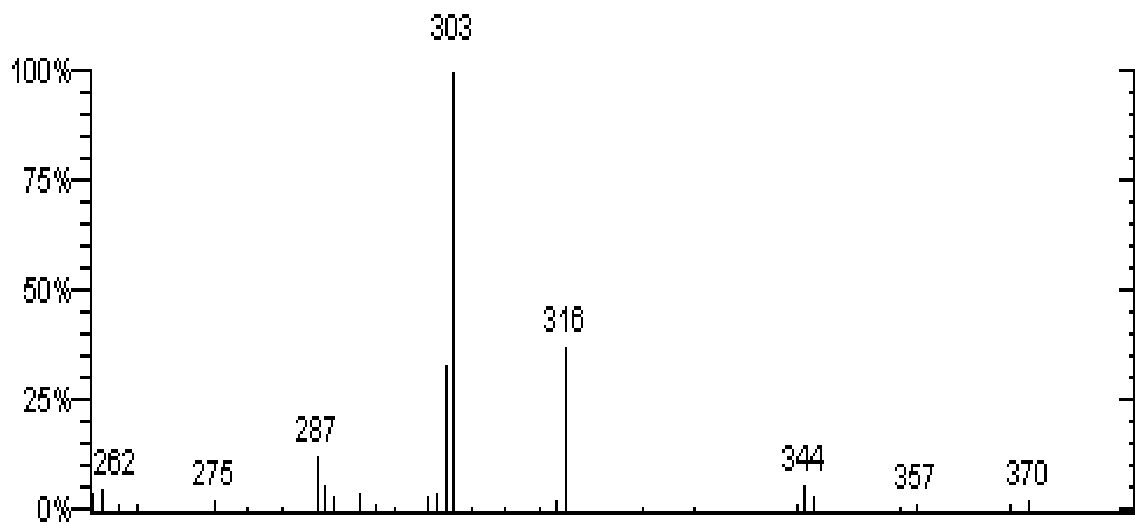


Abbildung 100: Massenspektrum TMS-2-Fluorestradiol MS/MS



## Diethylhexylphthalat

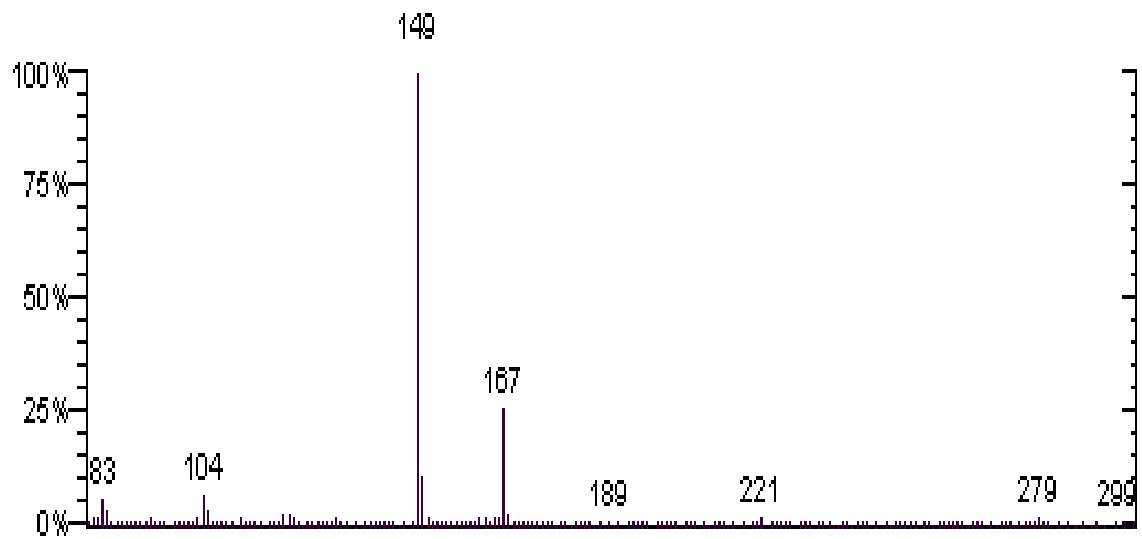


Abbildung 101: Massenspektrum DEHP Full Scan

## Diethylphthalat

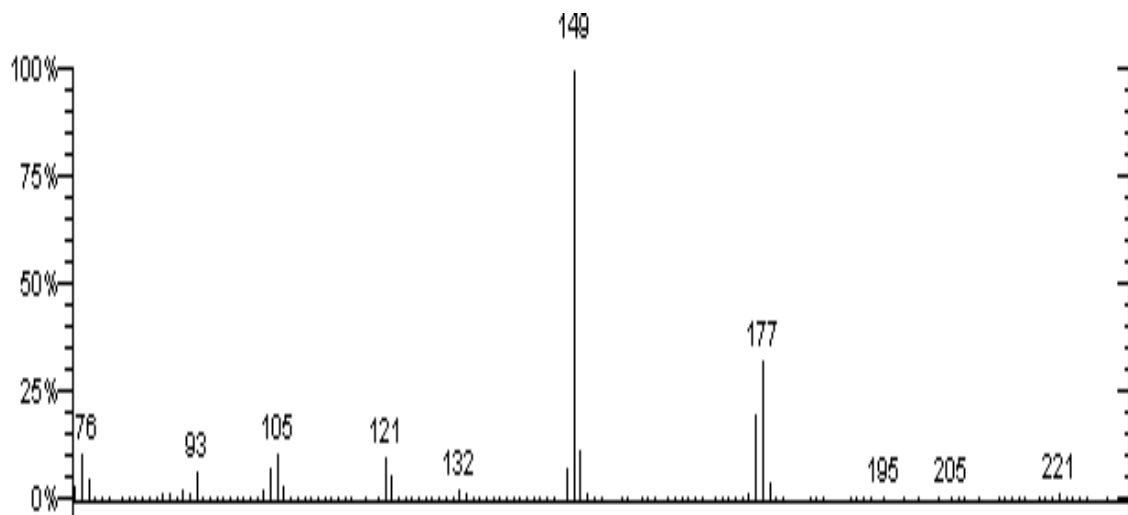


Abbildung 69: Massenspektrum DEP Full Scan

## Dibutylphthalat

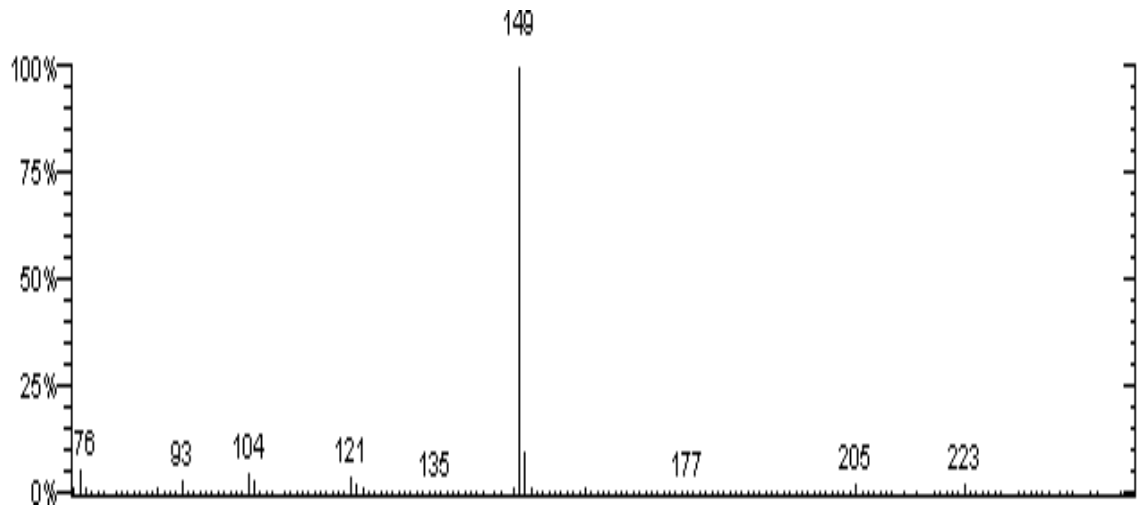


Abbildung 103: Massenspektrum DBP Full Scan

## Benzylbutylphthalat

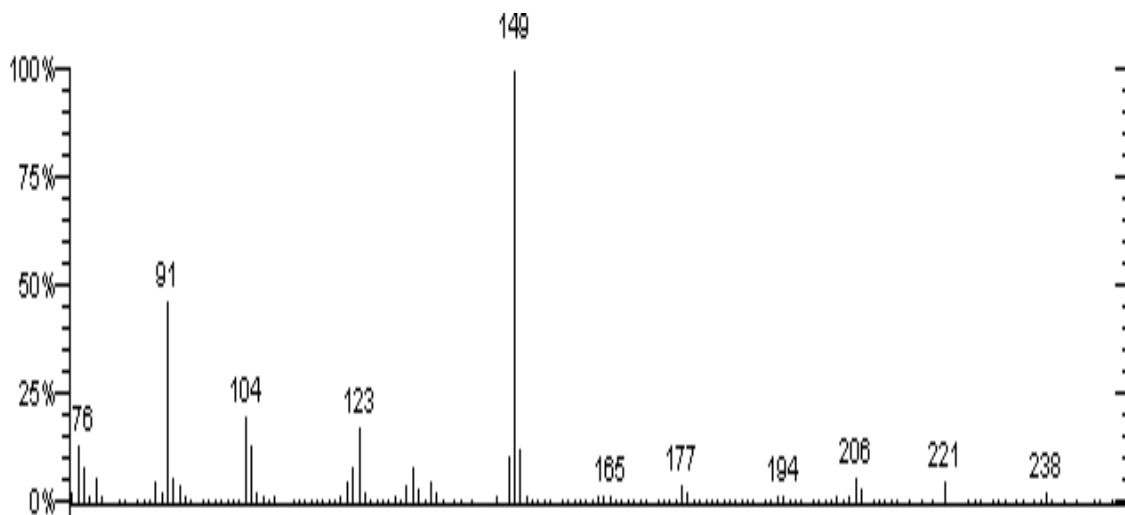


Abbildung 104: Massenspektrum BBP Full Scan

## PCB 28

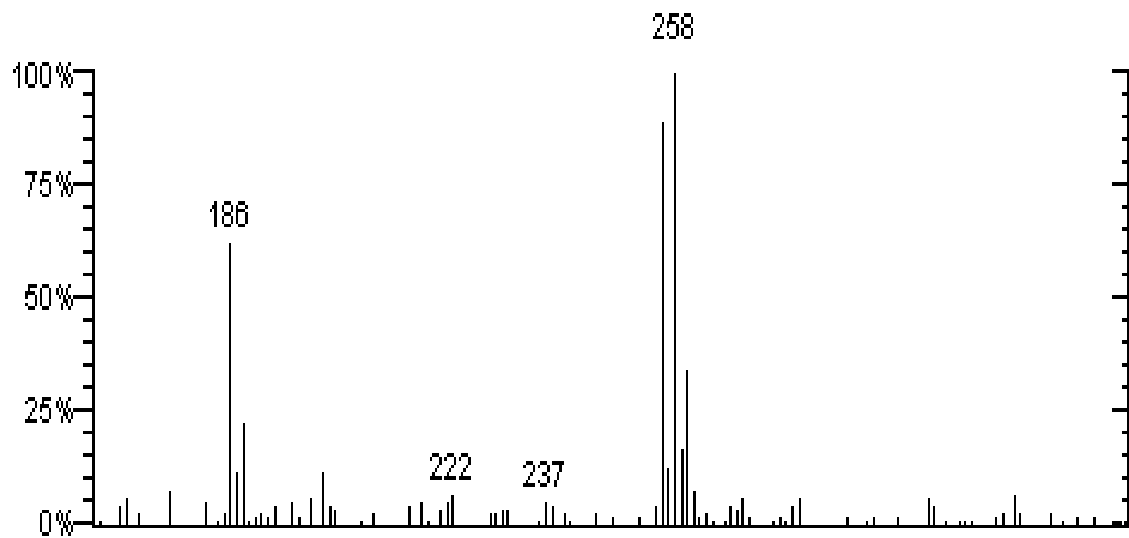


Abbildung 105: Massenspektrum PCB 28 Full Scan

## PCB 52

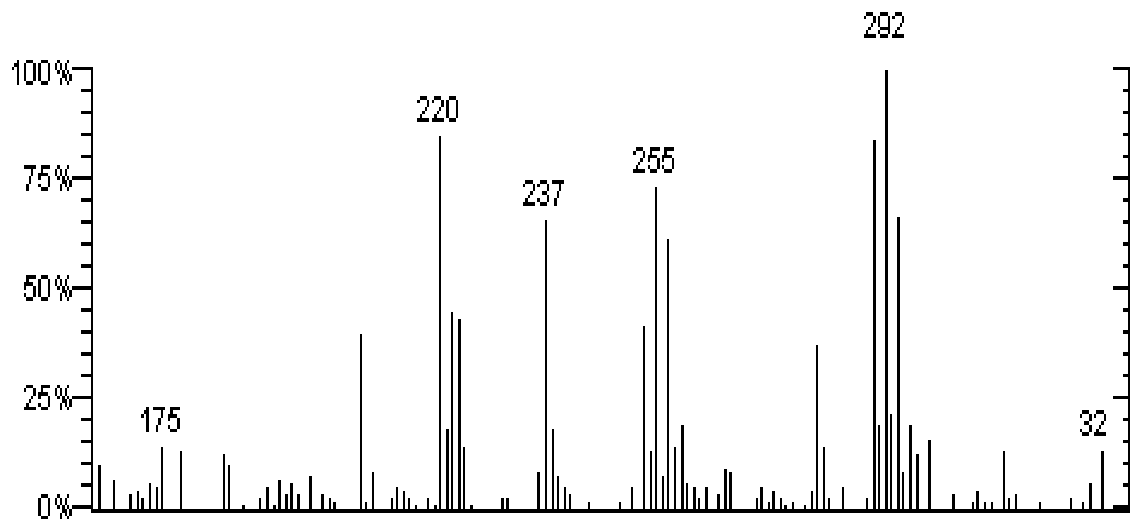


Abbildung 106: Massenspektrum PCB 52 Full Scan

## PCB 101

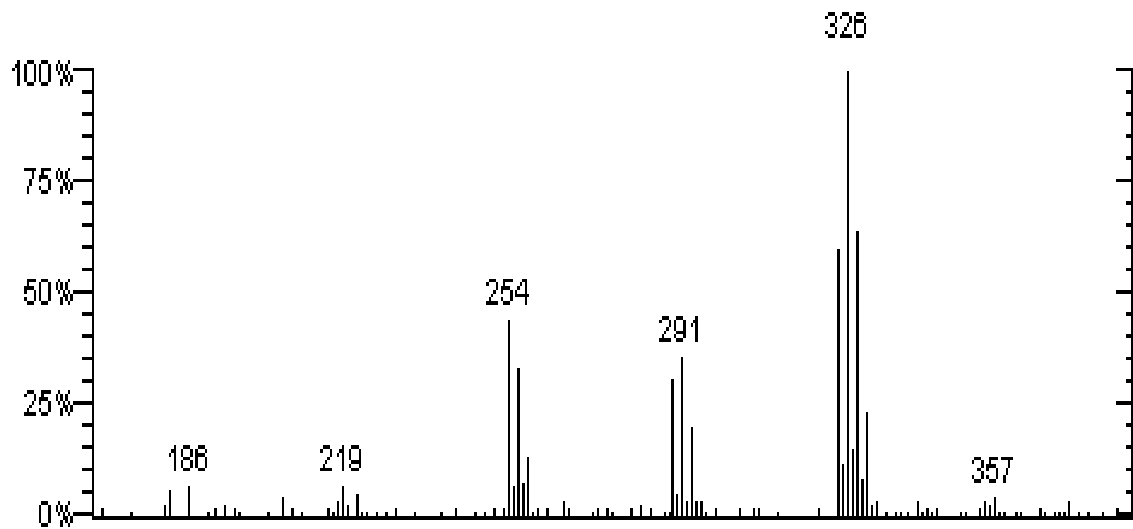


Abbildung 107: Massenspektrum PCB 101 Full Scan

## PCB 138

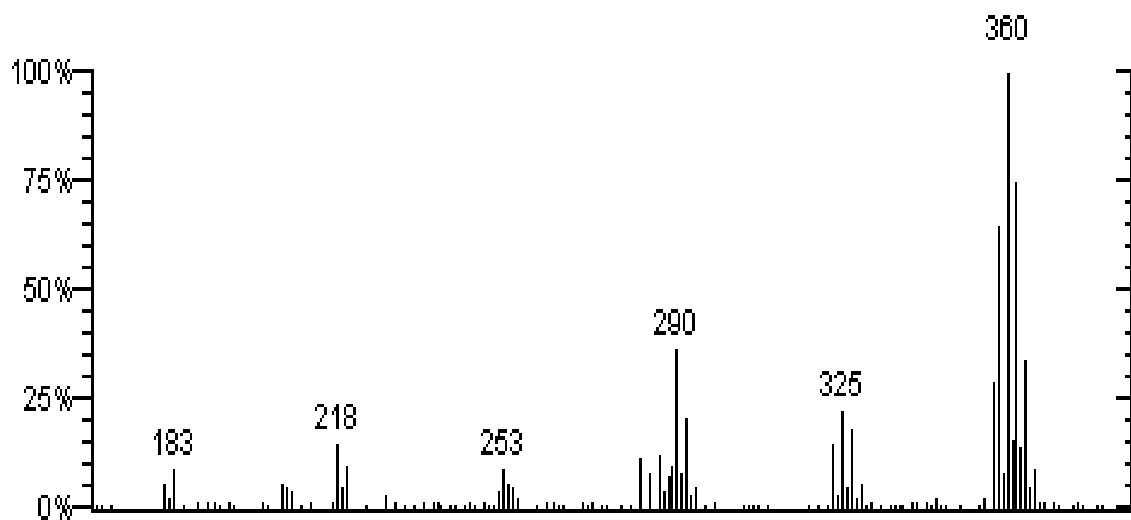


Abbildung 108: Massenspektrum PCB 138 Full Scan

## PCB 153

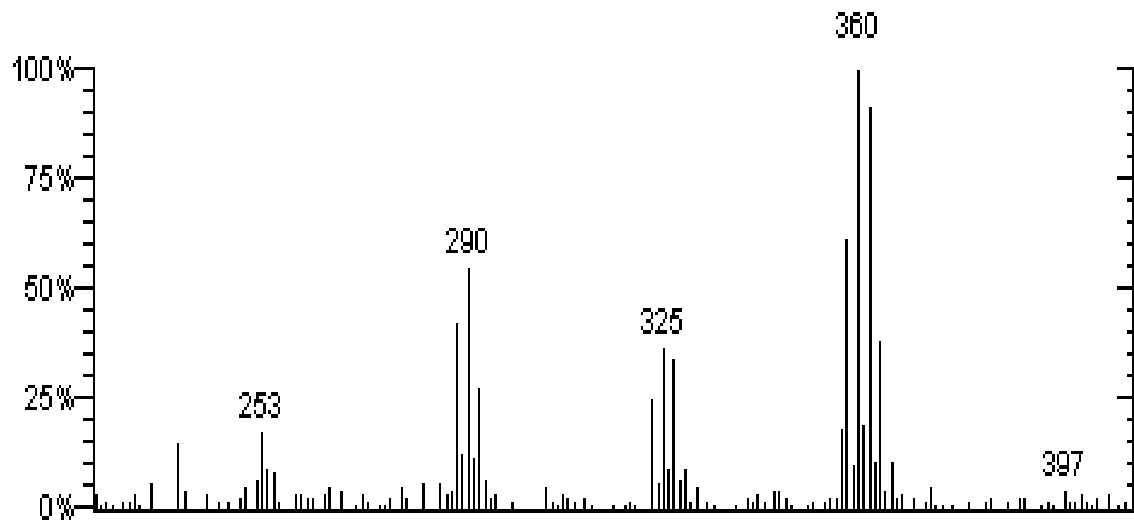


Abbildung 109: Massenspektrum PCB 153 Full Scan

## PCB 180

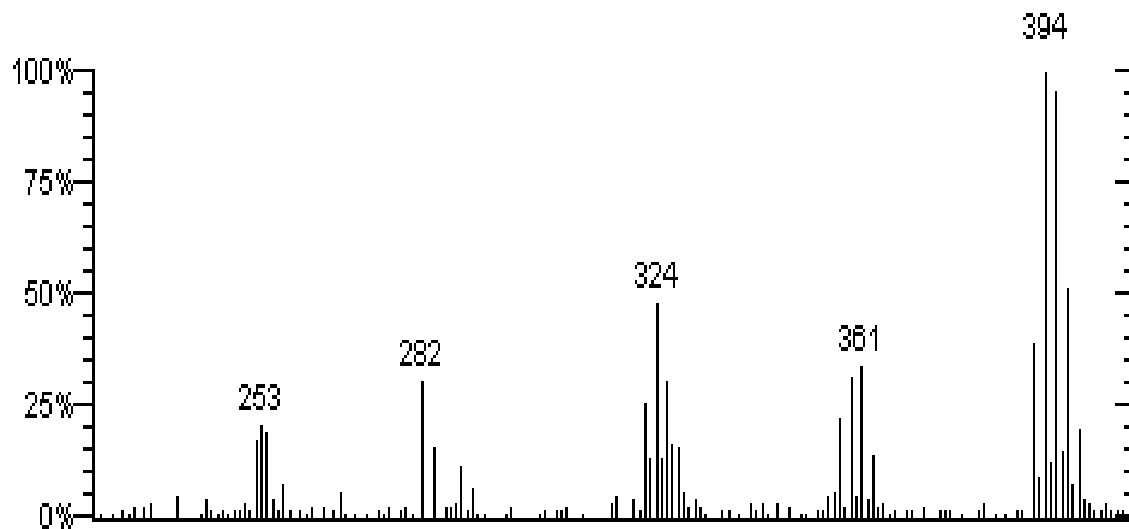


Abbildung 110: Massenspektrum PCB 180 Full Scan

## PCB 194

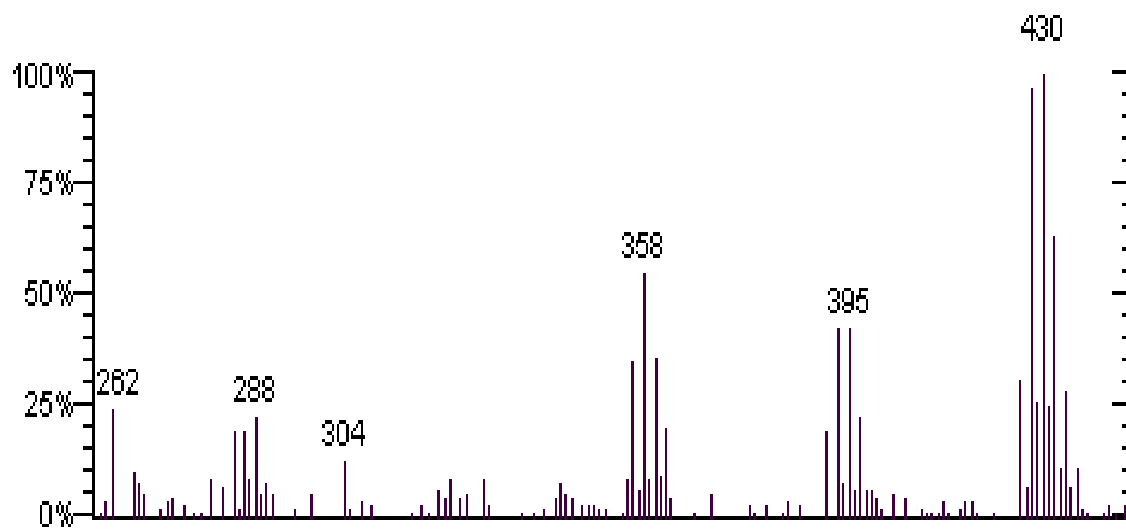


Abbildung 111: Massenspektrum PCB 194 Full Scan

## Atrazin

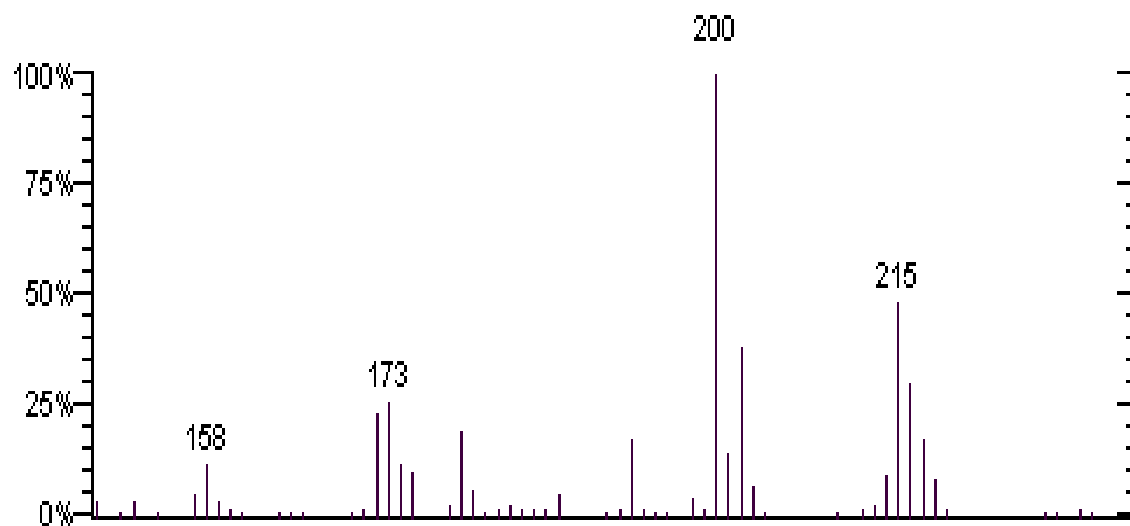


Abbildung 112: Massenspektrum Atrazin Full Scan

## Lindan

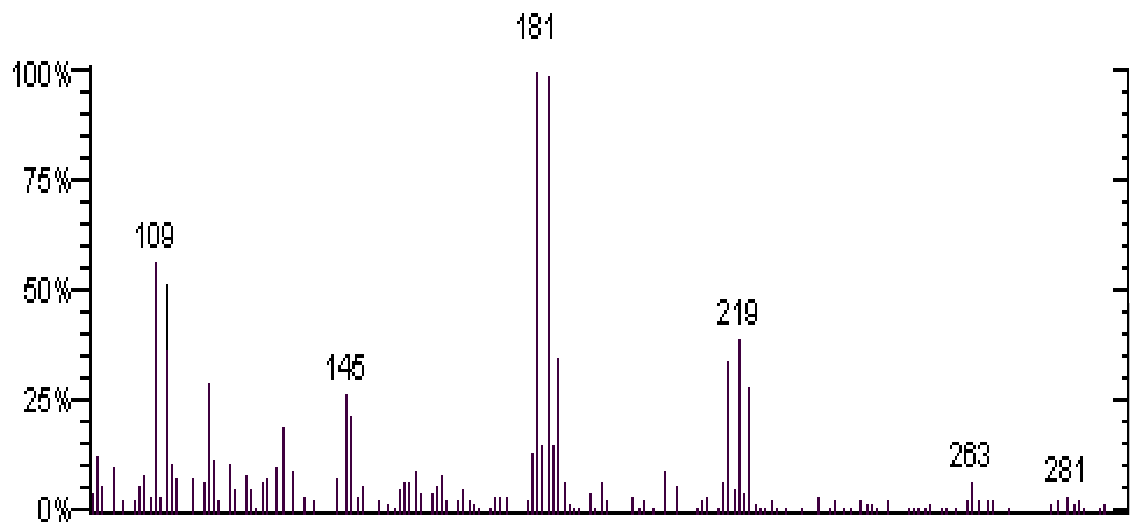


Abbildung 113: Massenspektrum Lindan Full Scan

## Endosulfan ( $\alpha+\beta$ )

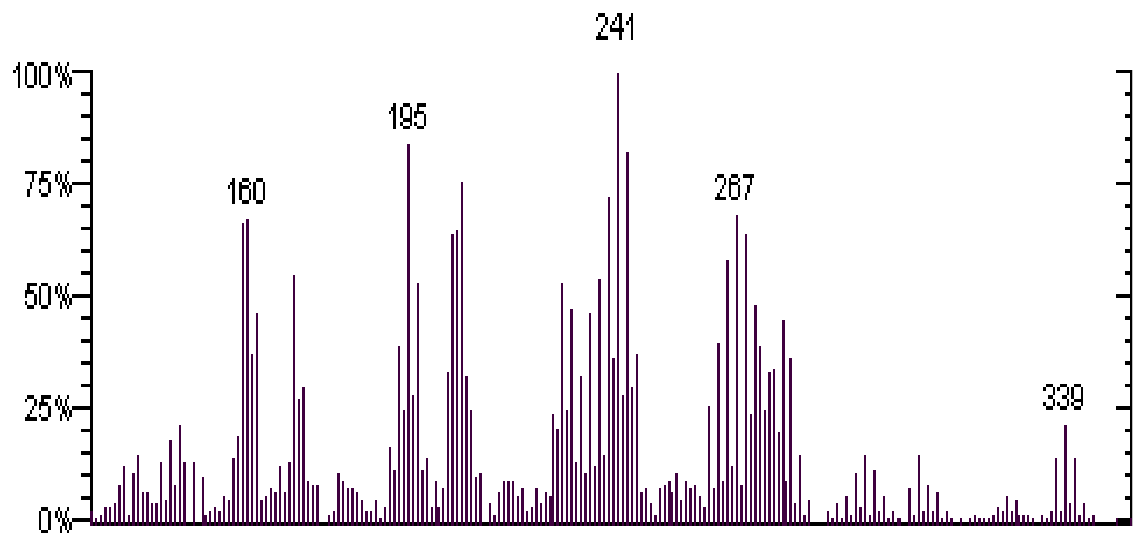


Abbildung 114: Massenspektrum der Endosulfane Full Scan  
(minimale Unterschiede in den Spektren von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Endosulfan)

## Bischlorphenylsulfon

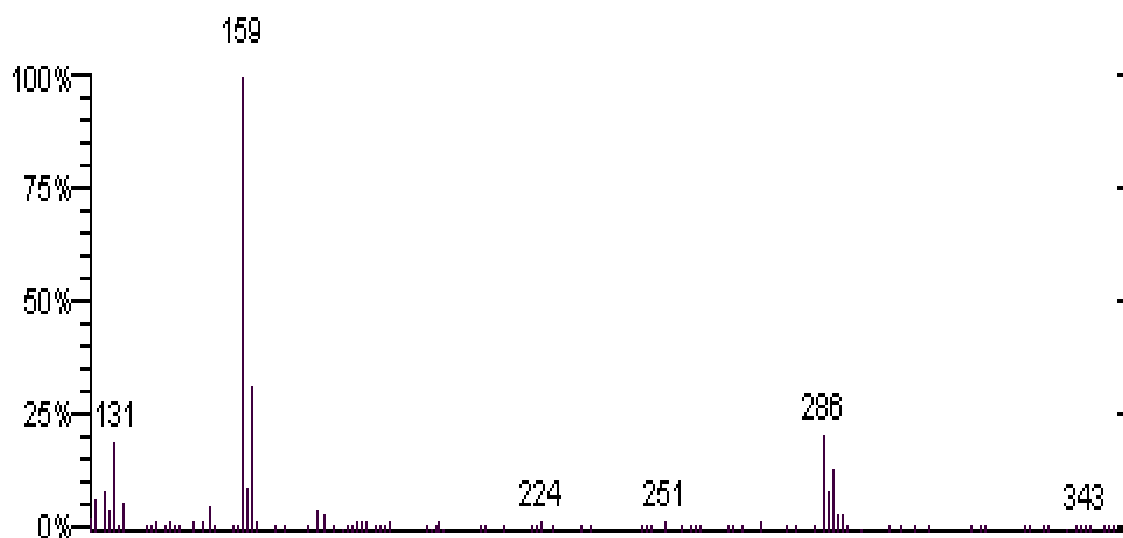


Abbildung 115: Massenspektrum Bischlorphenylsulfon Full Scan

## DDT (o, p' und p, p')

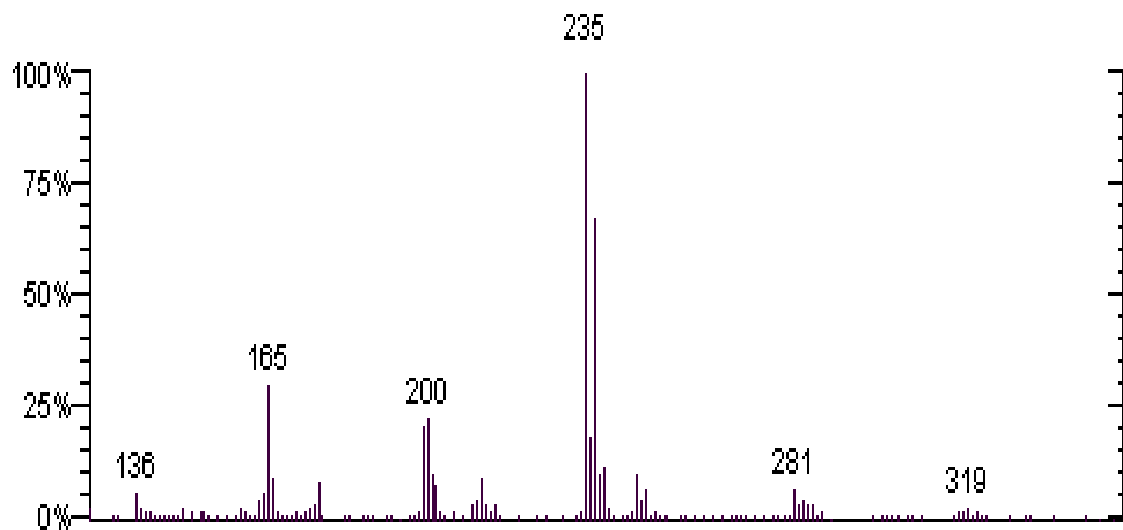
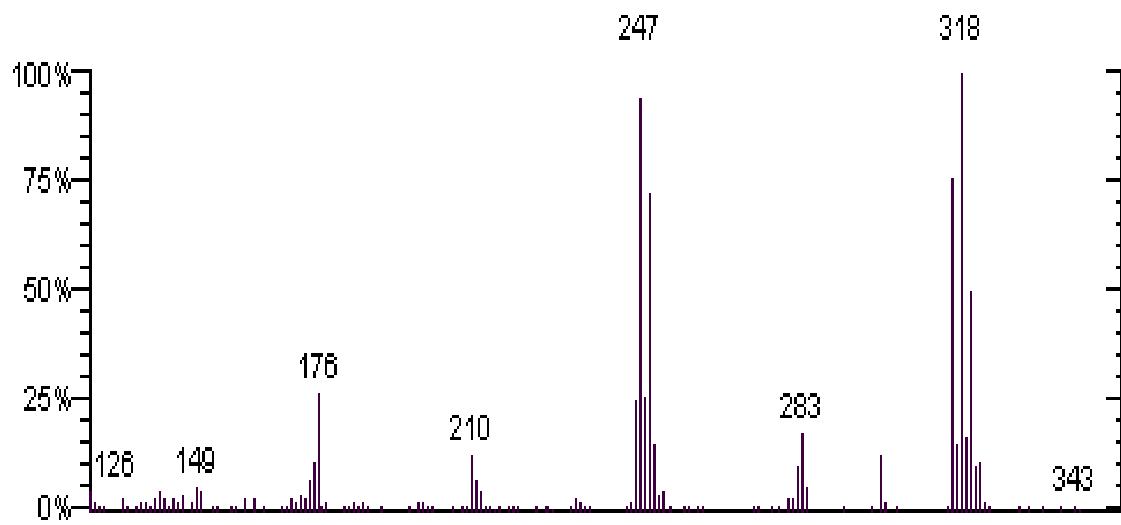


Abbildung 116: Massenspektrum DDT Full Scan



**o,p'-DDE**



**Abbildung 117: Massenspektrum DDE Full Scan**

## 7.4 Tabellen

### WIEDERFINDUNGS-VERSUCHSREIHE NR.1

Dotierung: bidestilliertes Wasser und Kläranlagenauslauf bei verschiedenen pH

WF 1+2	pH2	Quarz-Bidest	5µg/l	Anreicherung=1000	Eluent=EtAc
WF 3+4	pH7	Quarz-Bidest	5µg/l	Anreicherung=1000	Eluent=EtAc
WF 5+6	pH2	KLA-Auslauf	5µg/l	Anreicherung=1000	Eluent=EtAc
WF 7+8	pH7	KLA-Auslauf	5µg/l	Anreicherung=1000	Eluent=EtAc

Kartuschen: Baker RP-18 ec, 2g Füllung  
 Derivatisierung: TMSH/PTV, Standardbedingungen; 100 µl Extrakt + 20 µl TMSH-Lsg  
 0,2 molar,  
 GC-Bedingungen: siehe Kap. 4

**Tabelle 26: Wiederfindung bei verschiedenem pH und in verschiedenen Matrices**

Substanz	WF1	WF2	WF3	WF4	WF5	WF6	WF7	WF8
i-Octylphenol	52	42	74	57	24	24	51	75
Nonylphenol-Summe	53	51	68	58	71	39	69	0
Bisphenol A	75	83	85	76	38	30	82	101
Diethylstilbestrol	107	147	148	117	68	60	101	118
Bis-(chlorphenyl)sulfon	86	96	104	94	68	58	95	105
Ethinylestradiol	53	54	83	67	0	0	27	25

## 7.5 Publikationen/Preis

### 7.5.1 Zeitschriftenbeiträge

HOLTEY-WEBER, R.; FÄRBER, H.A.; SCHÖLER, H.F.: On-Line-Silylierung zur Analytik von endokrin wirksamen Substanzen in Wasser mittels GC-MS/MS. In: *Vom Wasser* 92 (1999), S. 1-9

HOLTEY-WEBER, R.; FÄRBER, H.; SCHÖLER, H.F.: Bestimmung von endokrin wirksamen Substanzen in Oberflächenwasser mit On-Line-Derivatisierung und GC-MS/MS. In: *GIT Spezial Separation* (1999), Nr. 2, S. 78-81

HOLTEY-WEBER, R.; FÄRBER, H.; SCHÖLER, H.F.: Analytik von Xenoestrogenen in Trinkwasser: On-Line-Silylierung für die GC-MS/MS-Analytik. In: *Lebensmittelchemie* 53 (1999), S. 20

HOLTEY-WEBER, R.: Zur gesundheitlichen Relevanz von Xenoestrogenen in Wasser und in Lebensmitteln. In: *GIT Labor-Zeitschrift* (2000), Nr. 9, S. 715-716

HOLLERT, H., DÜRR, M., KARAU, U., SIEBERT, I., WINN, N., PAWLOWSKI, S., ISLINGER, M., GRATZER, H., HOLTEY-WEBER, R., AHLF, W., FÄRBER, H., KARRASCH, H., ERDINGER, L., BRAUNBECK, TH.: Identifizierung und Bewertung (öko)toxikologisch belasteter Gewässer in Baden-Württemberg (Ö97004). In: *Statuskolloquium des FZK Karlsruhe, Projektträgerschaft BWPlus im März 1999* (1999)

HOLLERT, H., DÜRR, M., KARAU, U., SIEBERT, I., WINN, N., GRATZER, H., HOLTEY-WEBER, R., OKPARA, J., AHLF, W., FÄRBER, H., BRACK, W., ERDINGER, L. & BRAUNBECK, T.: Interdisziplinäre Untersuchungen des gelösten und partikulär gebundenen Schädigungspotentials von zwölf Fließgewässerstandorten mit In vitro-Toxizitätstests, Fraktionierungstechniken, chemischen Analysen und Aufnahme des Makrozoobenthos. In: GDCH: *Chemisch-biologische Teststrategien und Bewertungskonzepte - Beiträge zur Risikoanalyse komplexer Umweltkontaminationen*. Jena., 1999, S. 55

HOLLERT, H., DÜRR, M., KARAUS, U., SIEBERT, I., WINN, N., ISLINGER, M., GRATZER, H., HOLTEY-WEBER, R., AHLF, W., FÄRBER, H., KARRASCH, H., ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T.: Identifizierung und Bewertung (öko)toxikologisch belasteter Gewässer in Baden-Württemberg. In: F. HORSCH, W.G. Filby, S. Gross and H. Krug: "Ökosystembelastungen durch zivilisationsbedingte Fremdstoffe", *Diskussionskreise beim Statusseminar BWPLUS (Baden-Württemberg Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung, BWPLUS-Berichte.*, 1999, S. 19

HOLLERT, H., DÜRR, M., KARAUS, U., SIEBERT, I., WINN, N., ISLINGER, M., PAWLOWSKI, S., GRATZER, H., HOLTEY-WEBER, R., FÄRBER, H., AHLF, W., BRACK, W., ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T.: Integrated assessment of sediments and surface waters in the Neckar catchment area (Germany) with analysis of in vitro toxicity, chemistry and macrozoobenthos. In: *SETAC (Hrsg.), 20th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Philadelphia, USA* (1999)

HOLLERT, H., KARAUS, U., DÜRR, M., WINN, N., SIEBERT, I., GRATZER, H., HOLTEY-WEBER, R., FÄRBER, H., AHLF, W., KARRASCH, H., ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T.: Integrierte Untersuchungen von Wasser und Sedimenten kleiner Fließgewässer im Einzugsgebiet des Neckars mit Hilfe von In vitro-Biotests zur toxischen, gentoxischen und endokrinen Wirkung, chemischen Analysen und Makrozoobenthosaufnahmen. In: *Mitteilungen der Bundesanstalt für Gewässerkunde: im Druck*

FÄRBER, H.; HOLTEY-WEBER, R.; SCHÖLER, H.F.: Determination of endocrine disrupting compounds (in Vorbereitung)

### **7.5.2 Posterbeiträge**

HOLTEY-WEBER, R.; FÄRBER, H.; SCHÖLER, H.F.: Zum Einsatz einer On-Line-Kopplung von HPLC und GC/MS zur Analytik von organischen Spurenkontaminanten in Wasser. In: *Posterbeitrag zur Jahrestagung der Fachgruppe Wasserchemie der GDCh, Hitzacker 1995*, P 36

HOLTEY-WEBER, R.; FÄRBER, H.; SCHÖLER, H.F.: Zur Analytik von Xenoestrogenen in Wasser. In: *Jahrestagung der Fachgruppe Wasserchemie der GDCh, Lindau*, S. P 30

HOLTEY-WEBER, R.; FÄRBER, H.; SCHÖLER, H.F.: Zur Analytik von Xenoöstrogenen in Wasser. In: *Posterbeitrag zur Jahrestagung der DGHM, Jena 1997*, P 481

HOLTEY-WEBER, R.; FÄRBER, H.; SCHÖLER, H.F.: Analytik von Xenoestrogenen in Wasser: On-Line-Silylierung für die GC/MS. In: *Jahrestagung der Fachgruppe Wasserchemie der GDCh, Lübeck*, P 68

HOLTEY-WEBER, R.; FÄRBER, H.; SCHÖLER, H.F.: On-Line-Derivatisierung zur Analytik von endokrin wirksamen Substanzen in Wasser. In: *Jahrestagung der DGHM, Berlin 1998, Tagungsband*, S. 85

HOLTEY-WEBER, R.; FÄRBER, H.; SCHÖLER, H.F.: Analytik von Xenoestrogenen in Trinkwasser: On-Line-Silylierung für die GC-MS/MS-Analytik. In: *Jahrestagung der Fachgruppe Lebensmittelchemie der GDCh, München (1998)*

HOLTEY-WEBER, R.; FÄRBER, H.; SCHÖLER, H.F.: Spurenanalytik von Xenoestrogenen: eine GC-MS/MS-Multimethode mit On-Line-Derivatisierung. In: *Jahrestagung der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der GDCh Jena 1999*, P 19

HOLTEY-WEBER, R.; FÄRBER, H.; SCHÖLER, H.F.; HOLLERT, H.: Eine GC-MS/MS-Multimethode mit On-Line-Derivatisierung: Analytik von Xenoöstrogenen in Wasser und Sediment. In: *Regionaltagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft in der GDCh, Karlsruhe* P.11 (2000)

HOLLERT, H.; DÜRR, M.; KARAU, U.; SIEBERT, I.; WINN, N.; GRATZER, H.; HOLTEY-WEBER, R.; OKPARA, J.; AHLF, W.; FÄRBER, H.; BRACK, W.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T.: Interdisziplinäre Untersuchungen des gelösten und partikulär gebundenen Schädigungspotentials von zwölf Fließwasserstandorten mit In Vitro-Toxizitätstests, In: *Jahrestagung der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der GDCh Jena 1999*, P 18

DUERR, M., HOLLERT, H., WINN, N., KAISER, P., HOLTEY-WEBER, R., FÄRBER, H., GRATZER, H., AHLF, W., SCHÖLER, H., BRAUNBECK, T.&ERDINGER, L.: Risk Assessment of a flood event, Part 2: Limno-chemical parameters, chemical trace analyses and microbial testsystems, . In: *Posterbeitrag bei der Jahrestagung der Society of Environmental Toxicology and Chemistry - Europe, Leipzig*, (1999)

### **7.5.3 Vorträge**

HOLTEY-WEBER, R.; FÄRBER, H.; SCHÖLER, H.F.: On-Line-Derivatisierung und GC-MS/MS zur Analytik von endokrin wirksamen Verbindungen,  
*INCOM-Symposium Düsseldorf 23.3.1999*

HOLTEY-WEBER, R.; FÄRBER, H.; SCHÖLER, H.F.: On-Line-Derivatisierung und GC-MS/MS zur Analytik von endokrin wirksamen Verbindungen in Wasser,  
*ANAKON, Tagung der Fachgruppe Analytische Chemie der GDCh Konstanz 9.4.1999*

HOLTEY-WEBER, R.; FÄRBER, H.; SCHÖLER, H.F., HOLLERT, H.: Analytik von Bisphenol A und endokrin wirksamen Stoffen in Wasser,  
*Umweltanalytiktag NRW 2000 – neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der Umweltanalytik, Mülheim 19.6.2000*

### **7.5.4 Preis**

HOLTEY-WEBER, R: Chromatographiepreis/Jungforscherpreis der GDCh 1999  
FG Analytische Chemie, AG Chromatographie,  
verliehen bei der Fachgruppentagung ANAKON in Konstanz am 9.4.1999.

## **7.6 Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich diese vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Köln im Juni 2001

Roman Holtey-Weber

## 7.7 Lebenslauf

**Roman Holtey-Weber**

Antwerpener Str. 15  
50672 Köln  
0221-5101575 p  
0179-2416214 m

<u>Geburtsdatum</u>	11.06.1966	in Bonn
<u>persönliche Daten</u>		deutsche Staatsangehörigkeit, ledig
<u>Schulen</u>	1972-1976 1976-1985 1985	Grundschule Troisdorf Gymnasium Troisdorf Abitur: 1,8
<u>Bundeswehr</u>	1985-1986	Übertragungstechniker, Richtfunk
<u>Universität</u>	1987-1989 1990-1992 1992	Grundstudium Chemie Hauptstudium Lebensmittelchemie 1. Staatsexamen: gut
<u>praktisches Berufsjahr</u>	1992-1993 1994	am Chemischen Untersuchungsamt Koblenz 2. Staatsexamen: gut
<u>Berufstätigkeit</u>	1994-1995  1999-2001	Assistent am Hygiene-Institut Bonn: Pestizid-Analytik  Wissenschaftlicher Sachverständiger am Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Institut für Lebensmittelchemie Koblenz
<u>Promotion</u>	1995-2001  Mitte 2001	Am Hygiene-Institut Bonn /Institut für Umweltgeochemie Heidelberg: Analytik von Xenoöstrogenen Promotion komplett
<u>Sprachkenntnisse</u>	Englisch Spanisch Französisch	Konversation gut, Fachliteratur Konversation leicht Verstehen von Fachliteratur
<u>Weiterbildung</u>	Kurs für Wasserfachleute  GC/MS-Isoliertechniken  Betriebliches Konfliktmanagement	beim Institut für Wasser- Boden- und Lufthygiene, Berlin 1996  bei Fa. Varian, Darmstadt 1998  Universität Bonn 1999
<u>Auszeichnung</u>	Preisträger	"Kopplungstechniken in der Gaschromatographie" vom Arbeitskreis Chromatographie in der Fachgruppe Analytische Chemie der Gesellschaft Deutscher Chemiker
<u>Hobbys</u>	Musik machen: Deutscher Schlager und 70er Jahre Disco  Kochen Sport	als Sänger meiner Bands „Roy White und die Sternschnuppen" und „Roy Boogieland and the Disco Dolls"  gesund Karate, Inlineskating