

## **Biotest-geleitete chemische Analyse östrogen wirksamer Substanzen in Oberflächengewässern**

**(Vom Fachbereich Umweltwissenschaften der Universität  
Lüneburg als Dissertation angenommene Arbeit)**

**Autorin:**

***I. Heisterkamp***

**GKSS 2003/36**



**Biotest-geleitete chemische Analyse  
östrogen wirksamer Substanzen  
in Oberflächengewässern**

**(Vom Fachbereich Umweltwissenschaften der Universität  
Lüneburg als Dissertation angenommene Arbeit)**

**Autorin:**

***I. Heisterkamp***

**(Institut für Küstenforschung)**

Die Berichte der GKSS werden kostenlos abgegeben.  
The delivery of the GKSS reports is free of charge.

*Anforderungen/Requests:*

GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH  
Bibliothek/Library  
Postfach 11 60  
D-21494 Geesthacht  
Germany  
Fax.: (49) 04152/871717

Als Manuskript vervielfältigt.  
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor.

ISSN 0344-9629

GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH · Telefon (04152)87-0  
Max-Planck-Straße · D-21502 Geesthacht/Postfach 11 60 · D-21494 Geesthacht

GKSS 2003/36

## Biotest-geleitete chemische Analyse östrogen wirksamer Substanzen in Oberflächengewässern

*(Vom Fachbereich Umweltwissenschaften der Universität Lüneburg als Dissertation angenommene Arbeit)*

Inga Heisterkamp

*115 Seiten mit 30 Abbildungen und 24 Tabellen*

### Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Biotest-geleitete chemische Analytik entwickelt, die einen Hefetest für östrogene Aktivität mit LC-MS-Detektion kombiniert, die einer Flüssig-Extraktion und Fraktionierung mit Gelpermeations-Chromatographie folgen. Fokussiert auf Kläranlagen-Abwässer, zielt der Ansatz darauf ab, solche Substanzen zu charakterisieren, die für östrogene Effekte in aquatischen Systemen verantwortlich sind. Erste Ergebnisse zeigen im Hefetest eine starke Reaktion der Kläranlagen-Abwässer. Bisher wurden Östron, Bisphenol A und Nonylphenol als Substanzen identifiziert, die teilweise für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. Bestätigungsversuche zeigten jedoch, dass das östrogene Potential der Proben nicht vollständig speziellen Verbindungen zugeordnet werden konnte. Daher ist eine weitere Verbesserung der Methode in Bezug auf niedrigere Nachweisgrenzen notwendig, um eine Identifizierung und Quantifizierung von potenten östrogen wirksamen Substanzen bei niedrigen Konzentrationen zu ermöglichen.

### Bioassay-directed chemical analysis of estrogenic substances in surface waters

#### Abstract

In the scope of this thesis a bioassay-directed chemical analysis (BDCA) scheme was developed, combining a yeast screen for estrogenic activity with LC-MS detection after liquid/-liquid extraction and fractionation by size exclusion chromatography. Focusing on sewage treatment plant (STP) effluents, the approach aims at characterizing those substances that are responsible for estrogenic effects in aquatic systems. Initial results show a strong response of STP effluent extracts in the yeast screen. Estrone, Bisphenol A and nonylphenol have been identified as substances being partly responsible for observed estrogenic activities. However, confirmation experiments with synthetic samples revealed that the estrogenic effect potentials of the samples could not yet be completely assigned to specific compounds. Further improvement of the analytical scheme is needed in terms of lower limits of detection, to enable identification and quantification of potent estrogenic compounds at low concentrations.

*Manuskripteingang in TDB: 16. Dezember 2003*



# INHALTSVERZEICHNIS

## Abbildungsverzeichnis

## Tabellenverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Problemstellung</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>13</b>
2.1	Biotest-geleitete chemische Analyse	13
2.2	Hormone und Östrogene	15
2.3	Mögliche Auswirkungen endokrin wirksamer Substanzen	16
2.4	Chemisch-analytische Verfahren für östrogen wirksame Substanzen	18
2.5	Übersicht über Biotest-Systeme zur Ermittlung östrogenen Potenzials	21
<b>3</b>	<b>Durchführung und Herangehensweise</b>	<b>23</b>
3.1	Konkretisierung der Aufgabenstellung	23
3.2	Auswahl der Analyten	24
3.3	Probennahmeorte	25
3.4	Chemische Analyse	27
3.4.1	Probenvorbereitung	27
3.4.2	Kopplung von Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie	28
3.4.2.1	Theoretische Grundlagen LC-MS	28
3.4.2.2	Durchführung LC-MS	32
3.5	Hefetest	35
3.5.1	Theoretische Grundlagen	35
3.5.2	Durchführung und Auswertung des Hefetests	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>43</b>
4.1	Methodenentwicklung	43
4.1.1	Optimierung des Extraktionsverfahrens	43
4.1.2	Matrix und Wiederfindung	45
4.1.3	Vergleich der Wiederfindung mit und ohne GPC-Cleanup	47
4.2	Leistungsparameter des chemisch-analytischen Verfahrens	48
4.2.1	Identifizierung	48
4.2.2	Quantifizierung	49
4.2.2.1	Externe Kalibrierung	49
4.2.2.2	Standardadditionsverfahren	50
4.2.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	51

4.3	Adaptation des Hefetests	52
4.3.1	Vergleich der Lösungsmittel Ethanol und Methanol	52
4.3.2	Untersuchungen zur Probenaufgabe	53
4.3.3	Nachweisgrenzen im Hefetest	54
4.3.4	Dosis-Wirkungs-Kurven	55
4.3.5	Antiöstrogene Wirkung	57
4.4	Realproben	59
4.4.1	Untersuchte Proben und Messunsicherheit der Ergebnisse	59
4.4.2	Proben von einem Kläranlagen-Ablauf	61
4.4.3	Einleiternahe Oberflächengewässer-Proben	67
4.4.3.1	Gewässerprobe aus der Bilina	68
4.4.3.2	Gewässerprobe aus der Elbe	71
4.4.4	Zusammenfassende Diskussion der Realproben-Ergebnisse	72
<b>5</b>	<b>Vergleich zweier <i>in vitro</i>-Biotests</b>	<b>75</b>
5.1	Prinzip eines <i>in vitro</i> -Leberzelltests für östrogene Substanzen	75
5.2	Ergebnisse des Vergleichs	77
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>87</b>
7.1	Verwendete Geräte	87
7.2	Verwendete analytische Standards	87
7.3	Verwendete Chemikalien	88
7.4	Verwendetes Verbrauchsmaterial	89
7.5	Verwendete Software	89
7.6	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	89
7.6.1	AAV 1: Methode der Flüssig-Flüssig-Extraktion	89
7.6.2	AAV 2: Gel-Permeations-Chromatographie	90
7.6.3	AAV 3: Hefetest	91
7.6.3.1	Allgemeine Arbeitshinweise	91
7.6.3.2	Vorbereitung und Lagerung der Hefezellen	91
7.6.3.3	Vorschriften zum Ansetzen der Nährlösungen	91
7.6.3.4	Testdurchführung	93
7.6.4	AAV 4: Hochleistungsflüssigchromatographie	94
7.6.5	AAV 5: Massenspektrometrie	95
7.6.6	AAV 6: Reinigung der Glasgeräte	98
7.6.7	AAV 7: Herstellung von Standardlösungen	98
7.7	Übersicht über Probenbehandlung	98
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	<b>99</b>



Anhang	105
Anhang 1 Konzentrationen der Stammlösungen	105
Anhang 2 Kontrollkarte über den EC <sub>50</sub> -Wert von 17β-Östradiol im Hefetest	106
Anhang 3 Chromatogramme	107
A Chromatogramm für eine Standardlösung	107
B Chromatogramm für die Kläranlagen-Probe vom 06.09.2001	108
C Chromatogramm für die 2. Fraktion der Kläranlagen-Probe vom 06.09.2001	109
D Chromatogramm für die Bilina-Probe vom 22.08.2001	110
E Chromatogramm für die 2. Fraktion der Bilina-Probe vom 22.08.2001	111
F Chromatogramm für die Synthesia Probe vom 22.09.2001	112
G Chromatogramm für die 2. Fraktion der Synthesia Probe vom 22.09.2001	113
Danksagung	115

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1:	Schema einer Biotest-geleiteten chemischen Analyse	14
Abbildung 3.1:	Geographische Darstellung der Elbe mit Eintragung der Probennahmeorte	27
Abbildung 3.2:	Prinzip der Elektrospray-Ionisierung am Beispiel des 'Turboionspray' der Fa. Applied Biosystems / PE Sciex (abgewandelt nach [PE BIOSYSTEMS])	30
Abbildung 3.3:	Prinzip einer APCI-Ionenquelle, am Beispiel des 'Heated Nebulizer' der Fa. Applied Biosystems / PE Sciex (abgewandelt nach [PE BIOSYSTEMS])	31
Abbildung 3.4:	Schema zur Ermittlung des Matrixeffekts und der Wiederfindung innerhalb des Gesamtverfahrens	34
Abbildung 3.5:	Schematische Darstellung des Hefetests für östrogenartige Substanzen (abgeändert nach [ROUTLEDGE UND SUMPTER 1996])	37
Abbildung 3.6:	Reaktion des Indikators CPRG mit dem Enzym $\beta$ -Galactosidase	38
Abbildung 3.7:	Beispiel für eine Mikrotiterplatte im Hefetest, auf der linken Seite ist die Positivkontrolle $17\beta$ -Östradiol und auf der rechten Seite Mestranol als Analyt zu sehen	40
Abbildung 3.8:	Beispiel zur Ermittlung der $EC_{50}$ - und $EC_{20}$ -Werte	41
Abbildung 4.1:	Einfluss des pH-Werts auf die Extraktionsausbeute bei einer sequentiellen Extraktion	44
Abbildung 4.2:	Wiederfindung über das Gesamtverfahren mit und ohne "vorgeschaltete" GPC-Reinigung im Vergleich	47
Abbildung 4.3:	Kalibriergerade einer externen Kalibrierung, am Beispiel Bisphenol A	49
Abbildung 4.4:	Kalibriergerade für das Standardadditionsverfahren, am Beispiel des Östron	51
Abbildung 4.5:	Einfluss des Lösungsmittels im Hefetest am Beispiel der Substanzen $17\beta$ -Östradiol und $17\alpha$ -Ethinylestradiol	53
Abbildung 4.6:	Darstellung der Wirkung von Glycerin als 'Keeper' im Hefetest	54
Abbildung 4.7:	Dosis-Wirkungs-Kurven für die im Hefetest untersuchten Analyte; die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen bei $n = 4$	56
Abbildung 4.8:	Einfluss von Tamoxifen auf die Wirkung von $17\beta$ -Östradiol im Hefetest	59
Abbildung 4.9:	Ergebnisse des Hefetests für den Kläranlagen-Extrakt vom 12. Februar 2001 (rote Säulen) im Vergleich zu der Bestätigung im Hefetest mit einer synthetischen Probe (blaue Säulen).	62
Abbildung 4.10:	Ergebnisse des Hefetests der Kläranlagen-Probe vom 6. September 2001	64
Abbildung 4.11:	Die Kläranlagen-Probe im Hefetest; verglichen wird die natürliche Probe sowie deren 2. Fraktion mit in Methanol gelösten, synthetischen Proben (mit und ohne Huminsäure als Matrix). Das kleine Diagramm oben rechts stellt die Ergebnisse des Ursprungextrakts dar, das große Diagramm unten die der zweiten Fraktion	66
Abbildung 4.12:	Ergebnisse des Hefetests der Bilina-Probe	69

Abbildung 4.13:	Die Bilina-Probe im Hefetest; verglichen wird die natürliche Probe sowie deren 2. Fraktion mit in Methanol gelösten, synthetischen Proben (mit und ohne Huminsäure als Matrix). Das kleine Diagramm oben rechts stellt die Ergebnisse des Ursprungextrakts dar, das große Diagramm unten die der zweiten Fraktion.	70
Abbildung 4.14:	Ergebnisse des Hefetests der Synthesia-Probe	72
Abbildung 5.1:	Schematische Darstellung des ELISA zur Quantifizierung des Vitellogenin	76
Abbildung 5.2:	Vergleich zwischen dem Hefetest und dem kanadischen Leberzelltest anhand der Positivkontrolle $17\beta$ -Östradiol	77
Abbildung 5.3:	Vergleich zwischen dem Hefetest und dem kanadischen Leberzelltest anhand des synthetischen Östrogens $17\alpha$ -Ethinylestradiol	78
Abbildung 5.4:	Vergleich des Hefetests und des kanadischen Leberzelltests anhand eines Kläranlagen-Abwasser-Extrakts aus dem Jahr 2000	79
Abbildung 5.5:	Vergleich zwischen dem Hefetest und dem kanadischen Leberzelltest anhand einer Kläranlagen-Probe vom 17. Juli 2001; der Hefetest wurde in Methanol als Lösungsmittel durchgeführt und der Leberzelltest in Ethanol.	80
Abbildung 5.6:	Vergleich des Hefetests und des kanadischen Leberzelltests anhand des Abwasser-Extrakts einer Zellstoff-Fabrik	81
Abbildung 7.1:	Beispiel für die Verteilung von Positivkontrolle, Negativkontrollen und Probe auf der Mikrotiterplatte, (a) bei Vorversuchen, wenn ausreichend Platz zur Verfügung steht, (b) wenn ein hoher Probendurchsatz bewältigt werden muss.	94

# TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1:	Strukturen der untersuchten Analyte	25
Tabelle 4.1:	Vergleich der Extraktionsmittel Dichlormethan und Chloroform anhand der Wiederfindung in reinem Wasser	43
Tabelle 4.2:	Matrixeffekte und Wiederfindung in reinem Wasser, analysiert mit ESI-LC-MS/MS (Fehlerangabe: Abweichung vom Mittelwert für zwei Parallelproben).	45
Tabelle 4.3:	Vergleich von Matrixeffekten und Wiederfindungen in Wasser aus dem Kläranlagen-Ablauf, gemessen mit ESI-LC-MS/MS und APCI-LC-MS/MS (Fehlerangabe: Abweichung vom Mittelwert zweier Parallelproben)	46
Tabelle 4.4:	Tabellarische Zusammenfassung der in Abbildung 4.2 dargestellten Ergebnisse	48
Tabelle 4.5:	Darstellung der Linearität bei externer Kalibrierung	50
Tabelle 4.6:	Darstellung der Linearität beim Standardadditionsverfahren in Kläranlagen-Abwasser	51
Tabelle 4.7:	Nachweis- (S/N = 3) und Bestimmungsgrenzen (S/N = 10) mit ESI-LC-MS/MS aus Standard-Lösung (instrumentelle Grenzen) und aus aufgestockten Kläranlagen-Proben (für das gesamte Verfahren, ohne GPC)	52
Tabelle 4.8:	Die Nachweisgrenzen im Hefetest in der Übersicht	55
Tabelle 4.9:	Potenz der Analyte im Hefetest; angegeben sind sowohl die EC <sub>20</sub> -Werte als auch die EC <sub>50</sub> -Werte der Analyte und die Verhältnisse aus den EC-Werten von 17β-Östradiol und dem der Testsubstanz (EEF)	56
Tabelle 4.10:	Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten EC <sub>50</sub> -Werte mit denen von WENZEL UND SCHMITZ (1998)	57
Tabelle 4.11:	Ergebnisse aus den ESI-LC-MS/MS-Analysen des Kläranlagen-Ablaufes	61
Tabelle 4.12:	Ergebnisse aus den LC-MS/MS-Analysen des Kläranlagen-Ablaufes vom 6. September 2001 in ng/L	63
Tabelle 4.13:	EC <sub>20</sub> -Werte der Kläranlagenproben, die dazugehörigen EC <sub>20</sub> -Werte für 17β-Östradiol und die entsprechenden Östradioläquivalente	67
Tabelle 4.14:	Ergebnisse aus den LC-MS/MS-Analysen der Bilina-Probe vom 22.08.2001 in ng/L	68
Tabelle 4.15:	EC <sub>20</sub> -Werte der Bilina-Probe, die dazugehörigen EC <sub>20</sub> -Werte für 17β-Östradiol und die entsprechenden Östradioläquivalente	71
Tabelle 4.16:	Ergebnisse aus den LC-MS/MS-Analysen der Synthesia-Probe in ng/L	71
Tabelle 4.17:	Gegenüberstellung der in dieser Arbeit in Kläranlagen quantifizierten Konzentration und Literaturwerte	73
Tabelle 7.1:	Fraktionen in der GPC	90
Tabelle 7.2:	Retentionszeiten für die Analyte	94
Tabelle 7.3:	Parameter für den 'Heated Nebulizer', die sich von Turboionspray-Ionenquelle unterscheiden	96
Tabelle 7.4:	Verhältnis der Ionenübergänge zueinander	96
Tabelle 7.5:	Einstellung der Parameter am API 3000 für die Turboionspray-Ionenquelle	97
Tabelle 7.6:	Behandlung der verschiedenen Proben	98

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
amu	Atommasseneinheiten
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
BDCA	Bioassay-Directed Chemical Analysis (Biotest-geleitete Chemische Analyse)
CPRG	Chlorphenolrot- $\beta$ -D-Galactopyranosid
cps	'counts per second' (Zähler pro Sekunde)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E	Absorption
EC	'Effect Concentration' (Effektkonzentration)
EEF	'Estradiol equivalency factor' (Östradiol-Äquivalenz-Faktor)
EEQ	Östradioläquivalent
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERE	'Estrogen Responsive Element' (Östrogenrezeptor-bindendes DNA-Element)
ESI	Elektrospray-Ionisation
GC	Gaschromatographie
GenTG	Gentechnikgesetz
GenTSV	Gentechnik-Sicherheitsverordnung
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
hER	'human Estrogen Receptor' (menschlicher Östrogenrezeptor)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
$\lambda$	Wellenlänge
LC <sub>50</sub>	'Lethal Concentration' (Konzentration, bei der 50 % Mortalität auftritt)
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC-MS/MS	'Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry' (Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie)
M	Molare Masse
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
<i>n</i>	Anzahl
n.b.	nicht bestimmt; unterhalb der Bestimmungsgrenze
n.n.	nicht nachgewiesen; unterhalb der Nachweisgrenze
RP	Reversed Phase (umgekehrte Phase)
S/N	'Signal to Noise-Ratio' (Signal-Rausch-Verhältnis)
SPMD	Semi-Permeable Membrane Device
2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo[1,4]dioxin
TEF	Toxizitätsfaktoren
TEQ	Toxizitätsäquivalente
TMCS	Trimethylchlorsilan
upm	Umdrehungen pro Minute



# 1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

In der Umweltanalytik steht die Analyse von potenziellen Schadstoffen im Vordergrund. Häufig ist die negative Wirkungsweise dieser Schadstoffe auf Organismen und Umweltkompartimente bekannt. Dennoch kommt es vor, dass Organismen in einem Ökosystem geschädigt werden, ohne dass dies auf eine bekannte Ursache zurückgeführt werden kann.

Der Ansatz der wirkungsspezifischen Analyse greift an diesem Punkt an, da er mit Hilfe von chemisch-analytischen Verfahren die Identifizierung von Schadstoffen mit der Erkenntnis über deren potenzielle Wirkungen auf Organismen mittels Biotests kombiniert.

SCHUETZLE UND LEWTAS (1986) stellten fest, dass die Nutzung von Biotests in Verbindung mit analytischen Messungen einen leistungsfähigen Ansatz zur Identifizierung von Umweltschadstoffen darstellt. Sie prägten den Begriff '*Bioassay-Directed Chemical Analysis*' (BDCA). Dieses Konzept der "Biotest-geleiteten chemischen Analyse", oder auch "Wirkungsspezifische Analyse" genannt, dient folglich der Identifizierung von toxischen Verbindungen in Umweltproben. Es ist verwandt mit dem dreistufigen Konzept '*Toxicity Identification and Evaluation*' (TIE) (Toxizität, Identifizierung und Beurteilung), das Ende der 80er Jahre von der amerikanischen Umweltbehörde US-EPA eingeführt wurde.

Sowohl chemisch-analytische Verfahren als auch biologisch-ökotoxikologische Tests haben Vor- und Nachteile für die Beurteilung von toxischen Substanzen in der Umwelt. Mit der chemischen Analyse werden die Schadstoffkonzentrationen einzelner Substanzen oder die von Summenparametern bestimmt. Dadurch werden Expositionsdaten ermittelt, jedoch keine Informationen über die toxische Wirkung der Substanzen erhalten. Darüber hinaus wird nur eine begrenzte Anzahl von Verbindungen untersucht. Biotests für sich allein genommen liefern Aussagen über die toxische Wirkung von Proben, sie geben jedoch keine Auskunft über die stofflichen Ursachen dieser Effekte [NEUMANN UND FRANCKE 2001]. Werden diese beiden Ansätze miteinander gekoppelt (BDCA), ergänzen sich die erhaltenen Informationen. Bei der chemischen Analyse wird dazu ein 'non-target screening' (nicht zielgerichtete Überprüfung) angewandt, d.h. es wird nicht nach vorher bekannten Substanzen gesucht, sondern das Vorgehen ist offen, damit unbekannte Stoffe mit einer toxischen Wirkung gefunden werden können.

In der Abteilung organische Spurenanalytik des GKSS-Forschungszentrums wurde die BDCA bisher für Sedimentproben aus diversen Fließgewässern und Hafenbecken eingesetzt [SCHMIDT 1999]. Als toxikologischer Endpunkt diente dabei u.a. die Abnahme der natürlichen Lichtemission des Leuchtbakteriums *Vibrio fischeri* bei Einwirkung toxischer Substanzen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte innerhalb der Arbeitsgruppe die BDCA auf endokrin wirkende Substanzen erweitert werden.

Seit mehreren Jahren ist die endokrine Wirkung von Industriechemikalien ein viel diskutiertes Thema. Viele Verbindungen stehen unter dem Verdacht, in Organismen hormonähnliche

Wirkungen auszulösen und damit eine gestörte Entwicklung z.B. von Tieren herbeizuführen. Ein Beispiel für antiöstrogene bzw. androgene Wirkung im Tierreich war das vermehrte Auftreten von Imposex bei Meeresschnecken, das durch Tributylzinn verursacht wurde [KENT 1998]. Am häufigsten wurden jedoch Erscheinungen der Verweiblichung von Tieren, z.B. von Fischen beobachtet. In der Diskussion sind östrogen wirksame Substanzen wie z.B. Alkylphenole, polychlorierte Biphenyle, Bisphenol A und Pflanzenschutzmittel wie DDT und Dicofol. Von einigen Autoren wurden ebenfalls Auswirkungen von hormonähnlich wirkenden Umweltchemikalien auf den Menschen diskutiert, wie die Verminderung der Spermienzahl und vermehrtes Auftreten von Brustkrebs [GREIM 1998, MATTHIESSEN 2000, COLBORN ET AL. 1993].

In dieser Arbeit sollte die BDCA eingesetzt werden, um Wasserinhaltsstoffe im Hinblick auf ihr östrogenes Potenzial zu untersuchen. Dazu sollte ein geeigneter Biotest neu etabliert und validiert werden. Dieser Biotest sollte von der Durchführung und der Handhabung in die Infrastruktur einer chemisch-analytisch ausgerichteten Arbeitsgruppe passen.

Weiterhin sollte ein chemisch-analytisches Verfahren zur Analyse östrogen wirksamer Substanzen in Wasserproben entwickelt und optimiert werden. Über eine geeignete Probenvorbereitung sollte die Verknüpfung von Biotest und chemischer Analyse ermöglicht werden. Das analytische Verfahren sollte sowohl in der Anreicherung und Fraktionierung als auch in der Detektions-Methode von universalem Charakter sein, um das Gesamtziel eines 'non-target screenings' zu verfolgen.



## 2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

### 2.1 Biotest-geleitete chemische Analyse

Im folgenden Abschnitt wird auf das Konzept der "Biotest-geleiteten chemischen Analyse" (BDCA) näher eingegangen.

Die BDCA kombiniert chemische Analyse und Biotests, um die Vorteile beider Ansätze zu nutzen und die jeweiligen Nachteile zu kompensieren. SCHUETZLE UND LEWTAS (1986) beschrieben diesen Ansatz zur Identifizierung von chemischen Substanzen, die für eine bestimmte toxische Wirkung in Umweltkompartimenten verantwortlich sind. Durch chemisch-analytische Verfahren werden Chemikalien in einer Probe identifiziert, ohne dass Informationen über die toxische Wirksamkeit der Substanz geliefert werden. Solche Daten ergeben dagegen Biotests, die ihrerseits keinen Aufschluss über die Identität von Substanzen geben. Die BDCA, die diese Ansätze kombiniert, ist verwandt mit dem TIE-Konzept ('Toxicity Identification Evaluation') der US-EPA. Dieses manipuliert in Phase 1 eine Probe auf verschiedene Art und Weise, z.B. durch Komplexierung von Metallionen, Austreiben flüchtiger Substanzen oder Adsorption organischer Verbindungen. Je nach Manipulation und der daraus resultierenden Effektänderung lassen sich Rückschlüsse auf die Art der verursachenden Substanzen ziehen [MOUNT UND ANDERSON-CARNAHAN 1988 a]. In Phase 2 wird die verantwortliche Stoffklasse eingegrenzt und chemisch analysiert [MOUNT UND ANDERSON-CARNAHAN 1988 b]. Schließlich erfolgt in Phase 3 eine Rückbestätigung durch die Untersuchung der Reinsubstanz in den Biotests [MOUNT UND ANDERSON-CARNAHAN 1988 c].

Verschiedene Autoren führten eine BDCA in verschiedenen Probenmatrices und mit diversen toxikologischen Endpunkten durch. Im Folgenden werden einige Beispiele in Kürze vorgestellt.

CASELLAS ET AL. (1995) nutzten die BDCA, um gentoxisch wirkende Komponenten in Luftpartikeln in Barcelona (Spanien) zu identifizieren. Vergleichbares führten HANNIGAN ET AL. (1998) an Luftpartikeln im Raum Los Angeles (USA) durch. Mit einer Kombination aus GC/MS und den Leuchtbakterien *Vibrio fischeri* als Indikatoren für akute Toxizität und Mutagenität untersuchte SCHMIDT Sedimente aus mittel- bis hochbelasteten Gewässern [NEUMANN<sup>1</sup> UND FRANCKE 2001, SCHMIDT, 1999]. BRACK ET AL. (1999) untersuchten akute Toxizität in Flusssedimenten in der Industrieregion Bitterfeld und setzten für ihre BDCA eine Batterie aus Biotests ein: Sie nutzten ebenfalls die Bakterien *Vibrio fischeri*, weiterhin die Wasserflöhe *Daphnia magna* und einen Algenwachstumstest mit *Scenedesmus vacuolatus*. Der Ansatz der BDCA wurde von FIEHN (1997) und von REEMTSMA ET AL. (1999) erfolgreich auf Industrie-Abwässer, z.B. von Gerbereien angewandt.

---

<sup>1</sup> Neumann B., geb. Schmidt B.

In Zusammenhang mit östrogen wirksamen Substanzen lassen sich nur wenige Arbeiten in der Literatur finden. DESBROW ET AL. (1996 und 1998) untersuchten diese Substanzen in Kläranlagen-Abläufen, charakterisierten sie mit Hilfe eines Hefetests für östrogen wirksame Substanzen (vgl. Abschnitte 2.4 und 3.5.1) und identifizierten sie mit GC/MS. SHEAHAN ET AL. (2002) untersuchten Kläranlagenproben hinsichtlich der östrogenen Wirksamkeit von Alkylphenolen. Sie arbeiteten ebenfalls mit der Kombination aus GC-MS und dem später beschriebenen Hefetest. SNYDER ET AL. (1999 und 2001) untersuchten gleichfalls Proben aus Klärwerken. Für die chemische Analyse nutzten sie Flüssigchromatographie mit Fluoreszenz-Detektion und Radioimmuno-Assays; als Biotest-Systeme verwendeten sie MVLN-Zellen (modifizierte MCF 7-Zelllinie; wird in Abschnitt 2.5 näher erläutert). Eine weitere BDCA Studie mit Hilfe des Hefetests und GC-MS, jedoch mit dem Ziel der Untersuchung von Flusswasser, wurde von THOMAS ET AL. (2001) durchgeführt.

In anderen Arbeiten wurden chemische Analyse und Biotests für östrogene Wirksamkeit voneinander unabhängig an denselben Proben durchgeführt und kein BDCA-Ansatz verfolgt. SPENGLER ET AL. (2001) und KÖRNER ET AL. (2001) verwendeten GC-MS, um Kläranlagenproben, die durch Silylierung derivatisiert wurden, zu analysieren. Die gleichen Proben wurden einer Untersuchung mit dem E-Screen (Abschnitt 2.5) unterzogen. SHEN ET AL. (2001) untersuchten Wasserproben aus einem See in China auf unterschiedliche toxikologische Endpunkte hin; die Untersuchung der östrogenen Wirksamkeit wurde mit verschiedenen Brustkrebszelllinien durchgeführt. Die Östrogene wurden mit HPLC und elektrochemischen Detektor analysiert.

In Abbildung 2.1 ist ein allgemeines Schema einer Biotest-geleiteten chemischen Analyse dargestellt.

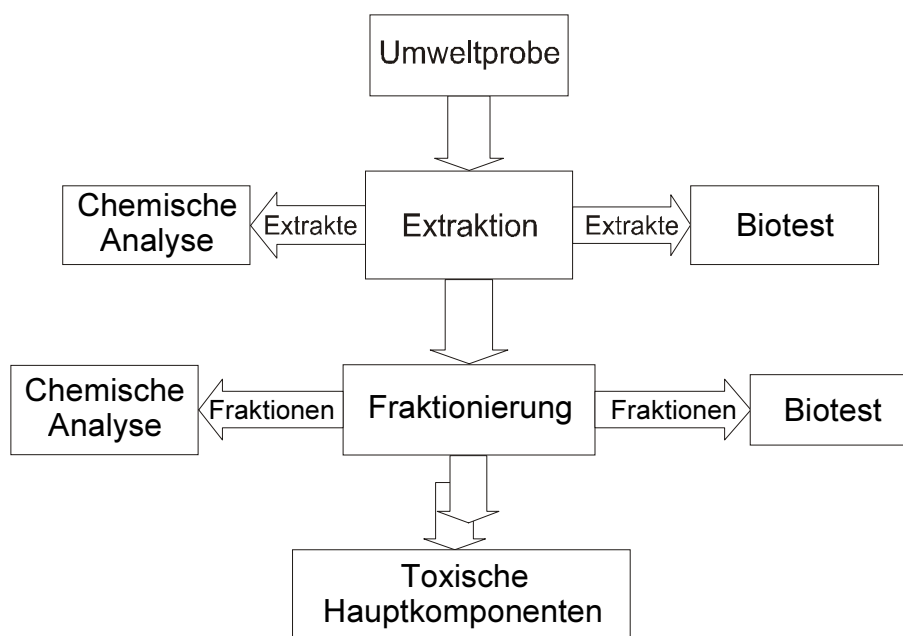


Abbildung 2.1: Schema einer Biotest-geleiteten chemischen Analyse.

## 2.2 Hormone und Östrogene

Im menschlichen und tierischen Organismus sind drei regulative Systeme vorhanden: das Nerven-, das Immun- und das endokrine System. Die Kommunikation des Nervensystems funktioniert über Neurotransmitter, die des Immunsystems über Interleukine und die des endokrinen Systems über Hormone. Der aus dem Griechischen stammende Begriff *endokrin* bedeutet "nach innen absondernd" bzw. "mit innerer Sekretion". Zu dem endokrinen System gehören die endokrinen Drüsen (Hirnanhangdrüse, Schilddrüse, Bauchspeicheldrüse, Nebennierendrüse sowie die männlichen und weiblichen Keimdrüsen), die die Hormone absondern. Hormone sind chemische Signalstoffe, die in spezialisierten Zellen gebildet werden und nach einem Transport über die Blutbahn auf die Zellen ihrer Zielorgane wirken. Dort erfüllen sie nach einer Kopplung an Rezeptoren bestimmte physiologische und biochemische Regulationsfunktionen [KARLSON ET AL. 1994, CRISP ET AL. 1998]; und steuern die Funktion der verschiedenen Körperorgane. Eine spezielle Gruppe der Hormone sind die Geschlechtshormone.

Die Wirkung geschlechtsspezifischer Hormone wird differenziert in östrogene, antiöstrogene, androgene und antiandrogene Wirkung. Die weiblichen Sexualhormone wirken östrogen und die männlichen androgen. Antiöstrogen bzw. antiandrogen wirken Substanzen, wenn sie die jeweilige Wirkung unterdrücken bzw. hemmen. Diese Arbeit beschäftigte sich hauptsächlich mit der östrogenen Wirkung. Der Begriff *östrogen* wird über die wesentliche Eigenschaft definiert, die mitotische<sup>2</sup> Aktivität im Gewebe des weiblichen Genitaltrakts zu stimulieren [GREIM 1998].

Viele Umweltchemikalien besitzen ein endokrines Potenzial, d.h., dass sie in die hormonelle Regulation im Körper von Menschen und Tieren eingreifen können. Sie sind in der Lage durch ihre Bindung an die Hormonrezeptoren der Zelle als Agonisten zu wirken und so die gleichen Wirkungen auszulösen wie körpereigene Hormone. Ein anderer Wirkmechanismus ist der eines Antagonisten, der an den Rezeptor bindet, ohne dabei eine Wirkung auszulösen. Dadurch blockiert er den Rezeptor, verhindert die Bindung eines körpereigenen Hormons und vermindert so die Wirkung dieser Hormone [SEIBERT 1996, GÜLDEN ET AL. 1997].

Die Wirkungsstärke von Hormonen hängt jedoch nicht allein von ihrer Konzentration ab, sondern ebenso von der Konzentration der Hormonrezeptoren in den Zielorganen. Diese kann gleichfalls von Chemikalien beeinträchtigt werden, woraus dann eine indirekte z.B. östrogene Wirkung erfolgen kann. Weitere Möglichkeiten für indirekte hormonelle Wirkungen sind einerseits das Einwirken von Umweltchemikalien auf den Abbau der Hormone in der Leber und andererseits ihr Wirken auf Regulationszentren wie Hypothalamus und Hypophyse [GÜLDEN ET AL. 1997]. Darüber hinaus existieren im Blut östrogen-bindende Plasma-Proteine, die die Menge des körpereigenen Östrogens begrenzen, das in die

---

<sup>2</sup> Mitose: indirekte Kernteilung mit der qualitativ und quantitativ gleichbleibenden Weitergabe des Chromosomensatzes.

Körperzellen gelangen kann. Künstliche östrogen-wirkende Substanzen können oft an den Rezeptor binden, jedoch nicht an die östrogen-bindenden Plasma-Proteine. Das führt dazu, dass sie im Gegensatz zu körpereigenen Hormonen verstärkt in die Zellen eindringen können und so indirekt eine höhere Wirksamkeit erlangen [COLBORN ET AL. 1993].

Natürliche Östrogene wie z.B. Östron und  $17\beta$ -Östradiol werden im Organismus mit Hilfe des Enzyms Aromatase aus den Androgenen Androstendion und Testosteron gebildet. Aus diesem Grund haben Substanzen, die das Enzym Aromatase hemmen, eine antiöstrogene bzw. eine androgene Wirkung, da die Bildung von Östrogenen vermindert und somit die Konzentration der Androgene erhöht wird [GÜLDEN ET AL. 1997].

Das östrogene Potenzial einer Chemikalie zeigt sich durch die Fähigkeit, in einem Organismus, einem Organ, im Gewebe oder in einer Zelle Wirkungen auszulösen, die für natürliche Östrogene spezifisch sind. Dagegen wird die östrogene Potenz durch die Konzentrationsabhängigkeit gekennzeichnet: Je geringer die zur Auslösung der östrogenen Wirkung erforderlichen Konzentration, desto größer ist die östrogene Potenz der Substanz [GÜLDEN ET AL. 1997]. Östrogenes oder allgemein endokrines Potenzial kann nicht an der chemischen Struktur einer Substanz festgemacht werden. Einerseits können Substanzen, die als östrogen wirksam bekannt sind, in ihrer chemischen Struktur sehr differieren, andererseits können aus einer Gruppe strukturell verwandter Substanzen nur einige östrogen wirksam sein.  $17\beta$ -Östradiol ist zwar das einzige Steroid, dessen A-Ring aromatisch ist, und viele der östrogen wirksamen Substanzen besitzen ebenfalls eine phenolische Struktur, z.B. die Alkylphenole, Bisphenol A (vgl. Tabelle 3.1) und einige Phytoöstrogene. Dies ist jedoch ebenfalls keine Regel, mit der Xenoöstrogene bereits an der Struktur erkannt werden können. Folglich können das Potenzial und die Potenz einer Substanz, östrogen zu wirken, nur mit biologischen Methoden erfasst werden.

### **2.3 Mögliche Auswirkungen endokrin wirksamer Substanzen**

Durch das Buch "Our Stolen Future" von COLBORN ET AL. (1996) wurde endokrine Wirkung als Umweltproblematik zu einem öffentlich diskutierten Thema. Bereits seit den 1930er Jahren ist jedoch bekannt, dass exogene Substanzen in der Lage sind, das endokrine System zu beeinflussen.

Beobachtete Effekte, die durch endokrin wirkende Stoffe bei Lebewesen ausgelöst werden können, sind z.B.: abnehmende Fruchtbarkeit von Vögeln, Fischen, Schalentieren und Säugetieren, nachlassende Schlupferfolge von Vögeln, Fischen und Schildkröten, sowie eine Feminisierung von männlichen bzw. Maskulinisierung von weiblichen Tieren und schließlich Veränderungen in den Immunfunktionen von Vögeln und Säugetieren [COLBORN ET AL. 1993].

In Kalifornien und an den Großen Seen in den USA wurde beobachtet, dass eine hohe Belastung der Umwelt durch das Pestizid DDT auf der einen Seite zu einer Verdünnung der

Eierschalen verschiedener Vogelarten führte, die einerseits deren Bruterfolge erheblich minderte, und auf der anderen Seite zu einer Verweiblichung der Tiere [VACK 1996; FRY UND TOONE 1981].

Nach einem Industrieunfall in Florida, bei dem große Mengen des Insektizids Dicofol in einen See gelangten, wurden bei Alligatormännchen verkleinerte äußere Geschlechtsorgane beobachtet. Dies führte dazu, dass die Alligatoreier meistens unbefruchtet blieben. Bei Fischen und Vögeln, die in und an diesem See lebten, wurden vermehrt weibliche Nachkommen beobachtet [GREIM 1998; COLBORN ET AL. 1996].

Eine der wenigen bekannten Beeinflussungen von weiblichen Tieren ist das Auftreten von Imposex bei marinen Schnecken, d.h., dass weibliche Tiere männliche Geschlechtsorgane ausbilden - eine Tatsache, die zur Sterilität der Tiere führt. Dies wurde für Organozinnverbindungen nachgewiesen, die sich in Antifouling-Farben für Schiffe befinden [KENT 1998]. Diese Verbindungen blockieren das Enzym Aromatase, das für die Umbildung von Testosteron zu  $17\beta$ -Östradiol verantwortlich ist. Aus der Hemmung des Enzyms resultiert eine Erhöhung des Gehalts an männlichen Hormonen.

Weil in Großbritannien stromabwärts von Kläranlagen ungewöhnlich viele zwittrige Fische gefunden wurden, wurde auf östrogen wirkende Substanzen im Abwasser geschlossen. Daher wurden in englischen Studien Fische in Käfigen im Abwasserstrom von Kläranlagen gehalten [SUMPTER UND JOBLING 1995, PURDOM ET AL. 1994]. Dabei wurde entdeckt, dass der Vitellogenin-Gehalt (vgl. Abschnitt 2.5) im Plasma der Fische stark anstieg. Sogar in männlichen Fischen wurden Konzentration im mg/L-Bereich gefunden [PURDOM ET AL. 1994]. SUMPTER UND JOBLING (1995) zeigten, dass die Vitellogenin-Konzentration während einer einwöchigen Exposition in der Abflussfahne einer Kläranlage in Großbritannien um das 300fache anstieg. Außerdem fanden PURDOM ET AL. (1994) in Laborversuchen, dass  $17\alpha$ -Ethinylestradiol bei einer Konzentration von 25 ng/L innerhalb von 6 Tagen einen logarithmischen Anstieg von Vitellogenin im Blutplasma der Fische bewirkte.

Es werden Debatten geführt, inwieweit bereits gesundheitliche Folgen für Menschen durch endokrin wirksame Substanzen eingetreten sind. Mögliche Auswirkungen können sich bereits in verringerter Spermienzahl und erhöhtem Vorkommen von Hoden- und Brustkrebs zeigen [GREIM 1998, MATTHIESSEN 2000, COLBORN ET AL. 1993]. SAFE dagegen bestreitet, dass Umweltöstrogene ein Risiko für die öffentliche Gesundheit darstellen. Er widerspricht der Aussage, dass Brustkrebs mit dem Vorhandensein von chlorierten organischen Verbindungen korrelierte. Ebenso sei ein signifikantes Sinken der Spermienzahl höchst strittig. Außerdem stellte er fest, dass die Menschen durch hormonelle Medikamente oder durch Phytoöstrogene, die über die Nahrung aufgenommen werden, um ein Vielfaches stärker belastet werden als durch Umweltöstrogene [SAFE 1995; FELDMAN 1995]. MATTHIESSEN (2000) stellte ebenfalls fest, dass zur Zeit noch keine sichere Aussage über die Beeinträchtigungen der Menschen getroffen werden könne. Obwohl zur Zeit mehrere epidemiologische Studien durchgeführt werden, müsse mindestens eine Generation abgewartet werden, um diese Frage beantworten zu können.

Unpolare, meist halogenierte östrogen wirksame Chemikalien haben eine Tendenz zur Bioakkumulation in aquatischen Systemen. Aber auch Nonylphenol kann in Organismen akkumuliert werden. Die Bioakkumulation kann dazu führen, dass Verbindungen, die *in vitro* schwach östrogen wirken, *in vivo* bereits bei bedeutend niedrigeren Konzentrationen im Wasser wirksam werden. Die Wirkung von im Gewebe von Organismen akkumulierten Substanzen ist bisher unbekannt. Möglicherweise sind sie zunächst im Fett physiologisch inaktiv, werden jedoch durch Freisetzung von Fettdepots aktiviert. Dies kommt z.B. in der Reproduktionsphase der Organismen vor [MATTHIESSEN 2000].

Nach FELDMAN (1995) müssen bei der Risikoabschätzung der Gefährdung durch östrogen wirkende Chemikalien folgende Punkte in Betracht gezogen werden:

- Durch Substanzen, deren östrogene Wirksamkeit noch unbekannt ist, könnte eine stärkere Exposition der Bevölkerung vorhanden sein als angenommen.
- Neben den östrogenen Wirkungen könnten andere Mechanismen auftreten, z.B. antiandrogene Wirkung, die einen zusätzlichen negativen Effekt bewirken.
- Mehrere Substanzen, die gemeinsam auftreten, könnten additiv oder sogar synergistisch wirken. Die These der synergistischen Wirkung von Xenoöstrogenen wurde von ARNOLD ET AL. (1996) aufgestellt ; sie wurde jedoch inzwischen widerlegt [ASHBY ET AL. 1997].
- Chemikalien könnten gewebespezifisch sowohl agonistisch als auch antagonistisch wirken.
- Durch genetische Unterschiede könnten manche Organismen sensitiver für endokrine Wirkungen sein als andere.
- Pharmakokinetischen Faktoren, z.B. der Metabolismus der Chemikalie im Organismus, fehlende Bindungsmöglichkeit an Plasma-Proteine oder die Akkumulation im Körper könnten zu erhöhter oder verlängerter Exposition führen. Daher könnte die Wirkung *in vivo* stärker sein als aus *in vitro*-Versuchen hervorgeht, und die Übertragung von *in vitro*-Ergebnissen auf *in vivo*-Situationen könnte erschwert sein.

## 2.4 Chemisch-analytische Verfahren für östrogen wirksame Substanzen

Im folgenden Abschnitt werden Beispiele für chemisch-analytische Verfahren für östrogen wirksame Substanzen genannt. In der Regel werden sie mit einer Kopplung aus Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) untersucht. Dabei ist jeweils ein Derivatisierungsschritt erforderlich, um die Substanzen in die Gasphase zu überführen. In jüngerer Zeit wurde jedoch ebenfalls von Verfahren berichtet, bei denen eine Kopplung aus Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS) eingesetzt wird. Einige Autoren setzten neben chemisch-analytischen Verfahren zusätzlich Biotests ein. Als Analyten wurden natürliche und synthetische Östrogene, verschiedene Xenoöstrogene sowie Phyto- und Mycoöstrogene bestimmt. Es wurden häufig Proben aus Kläranlagen-Abwässern und verschiedenen Fließgewässern untersucht.

## GC-MS

SPENGLER ET AL. (1999 und 2001) untersuchten natürliche und synthetische Östrogene, weiterhin die Phytoöstrogene  $\beta$ -Sitosterol und Genistein sowie verschiedene Xenoöstrogene in diversen Kläranlagen in Baden-Württemberg. Die Ergebnisse dieser instrumentellen Analyse wurden mit der östrogenen Potenz der Abwasserproben im 'E-Screen' verglichen [KÖRNER ET AL. 2001]. Bei diesen Untersuchungen wurde jedoch kein BDCA-Ansatz verfolgt, sondern die Proben wurden zum einen chemisch analysiert und zum anderen dem Biotest unterzogen. Für die Analyse wurde eine Festphasenextraktion mit RP-C<sub>18</sub>-Säulen durchgeführt, zum Teil wurde ein Reinigungsschritt mit Silica-Gel angeschlossen und schließlich mit einer Mischung MSTFA und TMCS derivatisiert [SPENGLER ET AL. 2001].

STUMPF ET AL. (1996) und TERNES ET AL. (1999) analysierten natürliche und synthetische Östrogene in Kläranlagen und in Fließgewässern im Rhein-Main-Gebiet. Einer Festphasenanreicherung (Lichrolut-EN, Merck) folgte als Derivatisierung eine Silylierung und die Analyse mit Hilfe von GC-MS.

DESBROW ET AL. (1996 und 1998) führten in ihrer Untersuchung über östrogene Chemikalien in Kläranlagen-Abwässern in Großbritannien eine BDCA mit einem *in vitro*-Biotest durch. Die chemische Analyse erfolgte mittels GC-MS und die Probenaufbereitung mittels RP-C<sub>18</sub>-Festphasenextraktion. Zur Elution wurden sowohl polare Methanol/Wasser-Gemische als auch unpolare Lösungsmittel wie Hexan eingesetzt. Eine weitere Fraktionierung erfolgte mittels semipräparativer HPLC.

LEE UND PEART (1998) setzten Östrogene mit Pentafluoropropionsäure-Anhydrid um und analysierten sie anschließend ebenfalls mit GC-MS

Zur 'target-Analyse' von endokrinen Substanzen wurde darüber hinaus eine online-Silylierung entwickelt, so dass die Analyte direkt vor der Injektion in ein GC-MS- oder GC-MS/MS-System derivatisiert wurden. Damit entfielen Probenvorbereitungsschritte, die Verlustmöglichkeiten beinhalten können [HOLTEY-WEBER ET AL. 1999].

KÖRNER ET AL. (2000) untersuchten die östrogene Aktivität von Ein- und Ausläufen deutscher Kläranlagen; sie fokussierten dabei auf östrogen wirksame phenolische Chemikalien. Um die östrogene Potenz der Proben festzustellen, wurden mit Hilfe des 'E-Screens' die Östradioläquivalente (vgl. Abschnitt 3.5.2) bestimmt. Zur chemischen Analyse wurde ebenfalls GC-MS verwendet. Vorhergehend wurden die Extrakte mit methanolischem Phenyltrimethyl-ammoniumhydroxid methyliert. Die Ergebnisse zeigten, dass die östrogene Aktivität während der Verweilzeit in der Kläranlage um 90 % reduziert wurde. Offenbar fand ein Abbau der für die östrogene Aktivität verantwortlichen Substanzen statt und keine Adsorption an den Klärschlamm.

## LC-MS

LAGANA ET AL. (2000) entwickelten eine LC-MS-Methode mit einer APCI-Quelle ('atmospheric pressure chemical ionization') für Östron, 17 $\beta$ -Östradiol, Östriol und 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol. Sie benutzten Festphasenextraktion als Probenvorbereitung.

CROLEY ET AL. (2000) führten einen Vergleich zwischen LC-MS und GC-MS für die gleichen Analyte durch wie LAGANÀ ET AL. (2000); im Gegensatz zu diesen benutzten sie jedoch bei der LC-MS/MS-Analyse den negativen Ionisierungs-Modus. Das von ihnen benutzte GC-MS/MS-System stellte sich als empfindlich dar, jedoch war die Probenvorbereitung durch die Derivatisierung mit Pentafluoropropionsäure-Anhydrid aufwendig und nicht immer zuverlässig. Daher war die ebenfalls empfindliche LC-MS/MS-Methode, die ohne viel Probenvorbereitung auskam, am vielversprechendsten.

LC-MS/MS wurde ebenfalls erfolgreich zur Analyse von Phyto- und Mycoöstrogenen angewandt, wobei Bestimmungsgrenzen von 20 ng/L erreicht wurden. Der Vorteil, dass die Analyte ohne vorhergehende Derivatisierung, die bei GC-Methoden notwendig sein kann und teilweise unvollständig verläuft, bestimmt werden konnten, wurde von TERNES ET AL. (1999) hervorgehoben.

## Analyse von Alkylphenolen

Für phenolische Xenoöstrogene wie 4-Octylphenol und Nonylphenol wurde von BOLZ ET AL. (1998 und 2000) eine GC-MS-Analyse entwickelt. Die Nachweisgrenzen dieser Methode erreichten Absolutwerte im Pikogramm-Bereich.

Die Studie von FERGUSON ET AL. (2000) beschreibt eine LC-MS-Methode zur Bestimmung von Alkylphenoethoxylaten und verschiedenen Metaboliten, u.a. Nonylphenol und 4-Octylphenol. Für das Massenspektrometer wurde die Elektroionspray-Ionenquelle eingesetzt und eine negative Ionisierung durchgeführt.

## Analysenergebnisse aus der Literatur

Verschiedene Autoren quantifizierten Östrogene und Xenoöstrogene in Kläranlagen-Abläufen und in Oberflächengewässern. Von 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol wurden in Kläranlagen-Abläufen bis zu 15 ng/L, 17 $\beta$ -Östradiol bis zu 48 ng/L, Bisphenol A bis zu 1  $\mu$ g/L, Mestranol bis zu 2,7 ng/L, Nonylphenol bis zu 2,3  $\mu$ g/L und Östron bis zu 76 ng/L bestimmt [DESBROW ET AL. 1998, SPENGLER ET AL. 2001, LEE UND PEART 1998, TERNES ET AL. 1999, WEGENER ET AL. 1999]. In Oberflächengewässern wurden 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol bis zu 4,3 ng/L, 17 $\beta$ -Östradiol bis zu 5,5 ng/L, Mestranol bis zu 1 ng/L und Östron bis zu 6 ng/L quantifiziert [STUMPF ET AL. 1996, TERNES ET AL. 1999, BELFROID ET AL. 1999, WEGENER ET AL. 1999]. Aufgeführt werden hier nur die in der Literatur angegebenen Maximalwerte.

Steroidhormone wurden ebenso in Trinkwasser untersucht. Die ermittelten Konzentrationen lagen, sofern sie überhaupt nachweisbar waren, in der Nähe der analytischen Nachweisgrenze von 1 ng/L [SCHLETT UND PFEIFER 1996].



## 2.5 Übersicht über Biotest-Systeme zur Ermittlung östrogenen Potenzials

Östrogene Aktivität kann mit unterschiedlichen Biotests untersucht werden. Die grobe Klassifizierung erfolgt in *in vivo*- und *in vitro*-Tests. *In vivo*-Tests basieren auf lebenden Tieren, und *in vitro*-Tests nutzen Zellen, Zellstämme oder Mikroorganismen. Die Anwendung von *in vitro*-Tests bietet aus ethischer und ökonomischer Perspektive einige Vorteile. Je nach Fragestellung ist die Aussagekraft dieser Testsysteme unterschiedlich zu bewerten. Im Folgenden werden Beispiele für *in vivo* und *in vitro*-Testsysteme genannt.

### *In vivo*-Tests

Ein klassischer Test für östrogene Aktivität ist der Allen-Doisy-Test, in dem die Verhornung des Vaginalepithels bei juvenilen oder sterilisierten Mäuse- und Rattenweibchen als Nachweis für östrogene Wirkung verwendet wird.

Darüber hinaus kann bei diesen Mäuse- oder Rattenweibchen die Erhöhung des Uterusgewichts erfasst werden. Weiterhin wird bei Mäusen und Ratten, die kurz nach der Geburt mit Östrogenen behandelt wurden, eine Veränderung und Beschleunigung der sexuellen Reifung beobachtet. Der genannte Test, der ebenfalls auf Reptilien anwendbar ist, ist nicht östrogenspezifisch, sondern eine Wirkung kann genauso von Androgenen ausgelöst werden.

Bei einigen Reptilien wird das Geschlecht des Nachwuchses nicht genetisch festgelegt, sondern über die Inkubationstemperatur beeinflusst. Bei Temperaturen, bei denen sich natürlicherweise nur männliche Tiere entwickeln würden, können sich jedoch durch Applikation von Östrogenen auf die Eierschale ebenfalls Weibchen entwickeln. Bei Vögeln im juvenilen Alter kann durch Futtermittelbeimengungen von Östrogenen eine Erhöhung des Oviduktgewichts (Eileiter) hervorgerufen werden. Werden die östrogen wirkenden Substanzen bereits in die Eier injiziert, kann bei Vögeln eine Feminisierung männlicher Embryonen beobachtet werden [GÜLDEN ET AL. 1997].

Zusammenfassend werden also mit *in vivo*-Testsystemen die Wirkung auf den weiblichen Genitaltrakt und die Geschlechtsentwicklung bei Säugetieren und Vögeln sowie die Geschlechtsdifferenzierung bei Reptilien und Vögeln untersucht.

Für Fische besteht darüber hinaus die Möglichkeit, das Blut auf Vitellogenin zu untersuchen [GÜLDEN ET AL. 1997]. Vitellogenin ist ein Protein, das von eierlegenden Tieren in der Leber produziert wird. Die Produktion dieses Proteins wird durch Östrogene, besonders durch  $17\beta$ -Östradiol, ausgelöst und kontrolliert. Vitellogenin dient der Eierbildung und wird vor allem von weiblichen Tieren produziert, wobei männliche Tiere ebenfalls die Anlagen dazu besitzen. Aus diesem Grund kann Vitellogenin als Biomarker für eine östrogene Kontamination benutzt werden. Diese liegt vor, wenn der Gehalt an Vitellogenin im Blutplasma von männlichen Fischen erhöht ist [SUMPTER UND JOBLING 1995].

### In vitro-Tests

Seit Beginn der 70er Jahre werden östrogensensitive Brustkrebszelllinien, welche ursprünglich der Wachstumskontrolle von Brustkrebs dienten, zur Erforschung des östrogenen Potenzials von Xenobiotika eingesetzt. Bekannte Zelllinien in diesem Zusammenhang sind MCF-7 und ZR-75-1. Anhand solcher Zelllinien können verschiedene Reaktionen auf Östrogene untersucht werden: z.B. die Proliferation (Gewebevermehrung) der Zellen und die Synthese verschiedener Enzyme [GÜLDEN ET AL. 1997].

Aus der MCF-7-Zelllinie stammt der bekannte 'E-screen' [VACK 1996, SOTO ET AL. 1992]. Dieser Test basiert auf der proliferationshemmenden Wirkung von Humanserum auf Zellen, welche durch Östrogene aufgehoben wird.

Als weitere *in vitro*-Methode ist die Verdrängung von radioaktiv markiertem  $17\beta$ -Östradiol vom Östrogenrezeptor durch die zu untersuchende Substanz zu nennen. Allerdings ist allein die Bindung an den Östrogenrezeptor kein Beweis für die östrogene Aktivität einer Substanz, vielmehr kann ebenso eine antiöstrogene Wirkung vorliegen [GÜLDEN ET AL. 1997, JOBLING UND SUMPTER 1993].

Eine wichtige *in vitro*-Methode ist die Stimulierung der Genexpression genetisch veränderter Zellen. Bei diesen Biotests werden Bakterien, Hefen oder Säugetierzellen mit fremden Genen transfiziert. Hierbei handelt es sich um Gene für Östrogenrezeptoren, Reportergene mit Östrogenrezeptor-bindenden DNA-Elementen und Gene für Enzyme, deren Expression zu messen ist [GÜLDEN ET AL. 1997]. Zu dieser Gruppe der Biotests gehört der Hefetest von ROUTLEDGE und SUMPTER (1996), bei dem mit der transfizierten Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gearbeitet wird, in die das Gen für den menschlichen Östrogenrezeptor integriert ist.

Die Stimulierung der Vitellogenin-Synthese, die bereits als *in vivo*-Methode beschrieben wurde, kann gleichfalls in *in vitro*-Tests eingesetzt werden, da isolierte Fischleberzellen noch die Fähigkeit besitzen, Vitellogenin zu synthetisieren [GÜLDEN ET AL. 1997, SCHÄFER ET AL. 1996].

Die Aussagekraft von *in vitro*-Biotests ist nach SCHÄFER ET AL. (1996) eingeschränkt, da Aufnahme, Metabolismus, Eliminierung und Bioverfügbarkeit der Substanzen nicht berücksichtigt werden.

### 3 DURCHFÜHRUNG UND HERANGEHENSWEISE

#### 3.1 Konkretisierung der Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung für die vorliegende Arbeit bestand im Aufbau eines Verfahrens für eine "Biotest-geleitete chemische Analyse" für östrogen wirksame Substanzen in Oberflächen-gewässern.

Von den in Abschnitt 2.5 vorgestellten Biotests für östrogenes Wirkpotenzial fiel die Wahl auf einen Hefetest, in den das Gen für den menschlichen Östrogenrezeptor integriert ist. Die Hefezellen für diesen Test wurden freundlicherweise von Professor J.P. Sumpter, Brunel University, Großbritannien, zur Verfügung gestellt. Dieser Test wurde ausgewählt, weil er einfach zu handhaben ist, und mit den zur Verfügung stehenden Mitteln etabliert werden konnte. Da der Hefetest nach § 8 GenTG [Gentechnikgesetz 1993] anmeldepflichtig ist und ein notwendiges S1-Labor noch nicht zur Verfügung stand, musste ein solches zunächst eingerichtet und zugelassen werden. Komplexere Testsysteme sollten in Kooperation mit anderen Forschungseinrichtungen durchgeführt werden.

Der Hefetest sollte validiert und auf die Einsetzbarkeit im Rahmen der BDCA hin getestet werden. Nach Möglichkeit sollten die Ergebnisse des Hefetests mit anderen Biotests verglichen werden. Zur Validierung des Hefetests sollten natürliche und synthetische Östrogene sowie bekannte Xenooestrogene eingesetzt werden.

Das Gesamtziel einer BDCA für östrogen wirkende Substanzen in Oberflächenwasser sah ein 'non-target screening' vor. Die Entwicklung von Anreicherungs- und Fraktionierungsverfahren, ebenso wie die Wahl der Detektionsmethode sollten dem Rechnung tragen und universell sein. Um eine Überprüfung der Verfahrensentwicklung zu ermöglichen, bestand das Ziel dieser Arbeit, neben einer universellen Probenvorbereitung, zunächst in der Entwicklung einer 'target-Detektion' für ausgewählte, relevante östrogen wirksame Substanzen.

Als universelle Detektionsmethode bot sich die Nutzung einer im Labor vorhandenen LC-MS-Kopplung an, da in diesem Fall keine Derivatisierung notwendig war. Eine Derivatisierung vor einer GC-MS-Analyse birgt die Unsicherheit der Diskriminierung von Substanzen in sich. Für die Probenvorbereitung sollte ebenfalls eine universelle Methode angewandt werden. Daher wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion zur Anreicherung der Analyte ausgewählt. Die Proben sollten derart vorbereitet werden, dass ein Einsatz der Extrakte sowohl im Biotest als auch in der chemischen Analyse möglich ist.

Die Funktionstüchtigkeit des Verfahrens sollte anhand von Wasserproben, in denen eine stärkere Belastung mit östrogen wirksamen Substanzen vermutet werden konnte, wie Kläranlagen-Abläufe und einleiternahe Flusswasserproben, überprüft werden.

### 3.2 Auswahl der Analyten

Als 'target-Analyten' in dem entwickelten chemisch-analytischen Verfahren und zur Validierung des Hefetests wurden insgesamt neun verschiedene, natürliche und synthetische Östrogene sowie Xenoöstrogene ausgewählt. Sie sollen im Folgenden vorgestellt werden (vgl. Tabelle 3.1).

17 $\beta$ -Östradiol ist das natürliche weibliche Sexualhormon. Es kann im Organismus leicht zu Östron und Östriol metabolisiert werden. Vor dem Ausscheiden werden die natürlichen Hormone im Körper zu Östrogenkonjugaten metabolisiert und haben dadurch eine geringere biologische Aktivität; die komplementären Säurereste sind Glucuronide und Sulfate [WEGENER ET AL. 1999]. 17 $\beta$ -Östradiol wird bei einer Anfangskonzentration von 10  $\mu$ g/L in wenigen Tagen abgebaut. Dabei entsteht durch die Oxidation der (17)-Hydroxyl-Funktion Östron als Zwischenprodukt, welches jedoch weiter abgebaut wird [WEGENER ET AL. 1999].

17 $\alpha$ -Ethinylestradiol und Mestranol (17 $\beta$ -Östradiol-3-methyl-ether) sind synthetische Hormone; hierbei handelt es sich um Derivate des 17 $\beta$ -Östradiols, die am C<sub>17</sub>-Atom einen Ethinylrest tragen. Dadurch wird eine höhere Persistenz im Körper erreicht, und die Substanzen können als Bestandteile von Kontrazeptiva eingesetzt werden. Die östrogene Wirkung wird durch die Einführung des Ethinylrests nicht verändert. Da 17 $\beta$ -Östradiol im Körper schnell abgebaut wird, wären hohe Dosen notwendig, um eine kontrazeptive Wirkung zu erzielen. 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol hat eine sehr hohe östrogene Potenz, die etwa 1000 mal höher liegt als die anderer Industriechemikalien. Es wird außerhalb des Körpers nur langsam metabolisiert und besitzt daher höhere Wirksamkeit und bereits in geringen Konzentrationen ökologische Relevanz. Der Abbau erfolgt z.B. innerhalb eines Zeitraumes von 12 Tagen nur um 15 % (Experimentaufbau: in einem verschlossenen 10 L Glasgefäß, im Dunkeln, bei einer Temperatur von 20°C und unter mikro-aeroben Bedingungen) [WEGENER ET AL. 1999]. In Laborversuchen wurde festgestellt, dass 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol mit einer Konzentration von 25 ng/L in Wasser bei Fischen bereits beobachtbare Wirkungen, den Anstieg der Vitellogenin-Produktion bei männlichen Fischen, auslöst. Das synthetische Östrogen Mestranol zeigt in der Umwelt ebenfalls eine hohe Persistenz, denn in einem Zeitraum von 12 Tagen wird kein Abbau festgestellt [WEGENER ET AL. 1999].

17 $\beta$ -Östradiol-glucuronide und 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol-glucuronide sind biologisch inaktive Konjugate, die vom Körper ausgeschieden werden. Sie können leicht gespalten werden; dieser Vorgang läuft während des Kläranlagenprozesses fast vollständig ab und ist spätestens in den Oberflächengewässern abgeschlossen. Daher müssten Östrogene dort hauptsächlich in freier und aktiver Form vorliegen [WEGENER ET AL. 1999].

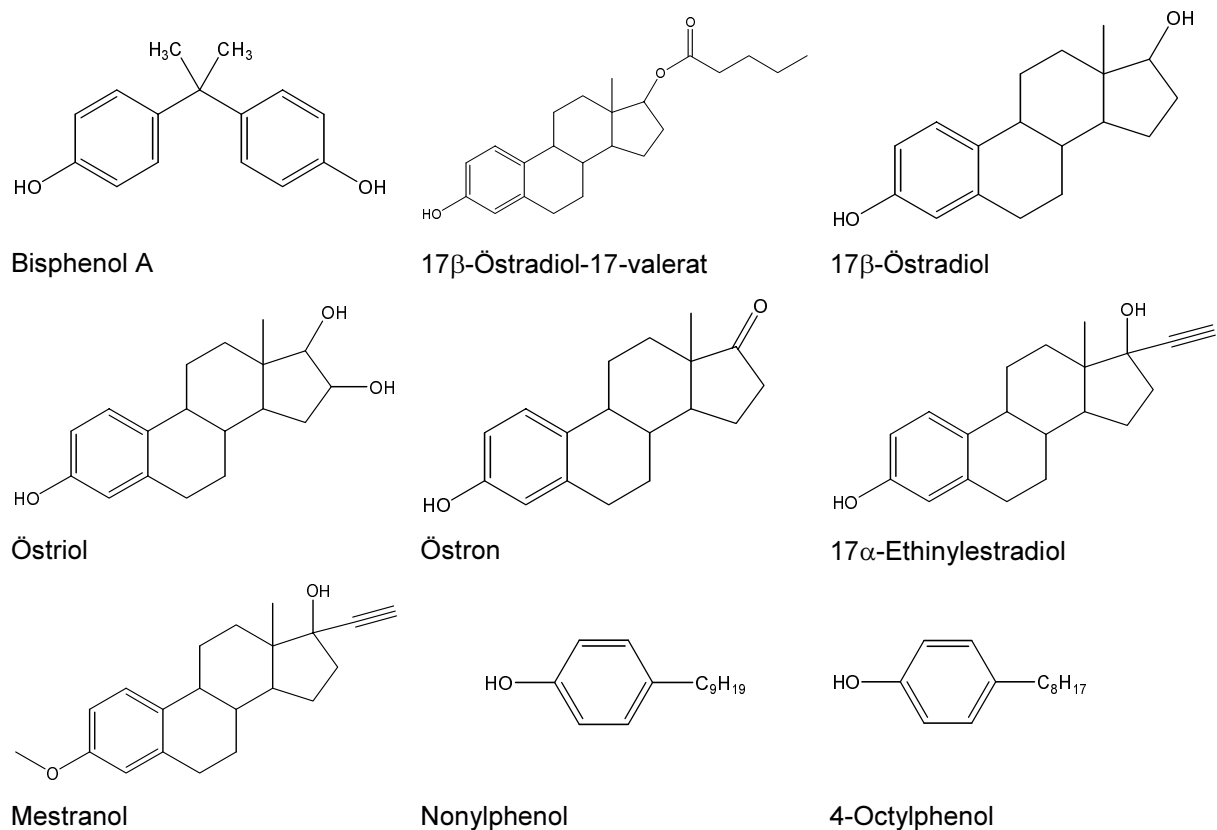
17 $\beta$ -Östradiol-17-valerat ist ein Metabolit von 17 $\beta$ -Östradiol; es wird in Medikamenten gegen klimakterische Beschwerden eingesetzt.

Die Alkylphenole Nonylphenol und 4-Octylphenol sind Industriechemikalien, die zur Herstellung von Alkylphenolpolyethoxylaten (APnEO) eingesetzt werden. APnEO werden als nichtionische Tenside, z.B. in Reinigungsmitteln, Farbstoffen, Kosmetika und Pestiziden verwendet. Durch mikrobiellen Abbau der APnEO gelangen die Alkylphenole in die Umwelt. Darüber hinaus werden Alkylphenole Kunststoffen als Antioxidantien zugesetzt [SCHÄFER ET AL. 1996].

Bisphenol A (2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propan) ist für die Kunststoffherstellung wichtig; es dient zum größten Teil als Monomer zur Herstellung von Polycarbonat und von Epoxidharzen [SCHÄFER ET AL. 1996]. In Untersuchungen wurde festgestellt, dass es aus Kunststoff-Laborutensilien freigesetzt wird und in Spuren Analysen verfälschen kann [FELDMAN 1995].

In Tabelle 3.1 sind die Strukturen der untersuchten Analyte dargestellt.

Tabelle 3.1: Strukturen der untersuchten Analyte.



### 3.3 Probennahmeorte

Für die Probennahme wurden Orte gewählt, bei denen eine hohe Wahrscheinlichkeit für ein östrogenes Potenzial vermutet wurde: das Abwasser einer Kläranlage sowie zwei einleiternahe Flussabschnitte. Die Proben wurden in dem Zeitraum von Februar bis September 2001 genommen.

Die Klärwerksproben entstammten dem Ablauf des Klärwerk-Verbunds Köhlbrandhöft-Dradenau in Hamburg. Neben einer mechanischen Behandlung wird das Abwasser dort in mehreren Stufen biologisch behandelt. In getrennten Klärbecken findet durch unterschiedliche Mikroorganismen eine Zersetzung von Kohlenstoff- und von Stickstoffverbindungen statt. Die Trennung ist notwendig, um beide Prozesse optimal zu gestalten, da sich die auf Stickstoffverbindungen spezialisierten Mikroorganismen sehr viel langsamer vermehren als die auf Kohlenstoffverbindungen spezialisierten. Beim biologischen Abbau von Stickstoffverbindungen findet zunächst eine Nitrifikation statt, bei der Ammonium zu Nitrat umgewandelt wird. Anschließend wird das Nitrat ebenfalls durch Mikroorganismen zu gasförmigen Stickstoff reduziert. In der letzten Stufe wird der bei den Abbauprozessen gebildete Belebtschlamm vom Abwasser abgetrennt. Dieser Schlamm wird zum Teil im Kreis geführt und dem mechanisch vorbehandelten Abwasser zugeführt und zum Teil der Faulung zugeführt [HAMBURGER STADTENTWÄSSERUNG 2000].

Mit den Kläranlagen-Abwasser-Proben, die zu unterschiedlichen Zeiten entnommen wurden, wurden teilweise die Experimente während der Verfahrensentwicklung durchgeführt.

Zwei weitere Proben wurden freundlicherweise von der Povodi Labe<sup>3</sup> in der Tschechischen Republik zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um Flusswasserproben, die aus der Bilina und aus der Elbe, direkt aus der Abwasserfahne der Chemiefabrik Synthesia in Pardubice, stammten (siehe rote Punkte in Abbildung 3.1). Die Bilina ist ein kleiner Nebenfluss der Elbe auf tschechischer Seite, nahe der Grenze zur Bundesrepublik Deutschland, an deren Ufer die Spolchemie AG liegt, die u.a. Epoxidharze herstellt [SCHMIDT 1999].

---

<sup>3</sup> Die Povodi Labe AG mit Sitz in Hradec Králové hat die Verwaltung und den Schutz von Gewässern zur Aufgabe. Der Eigentümer ist das Ministerium für Landwirtschaft der Tschechischen Republik.

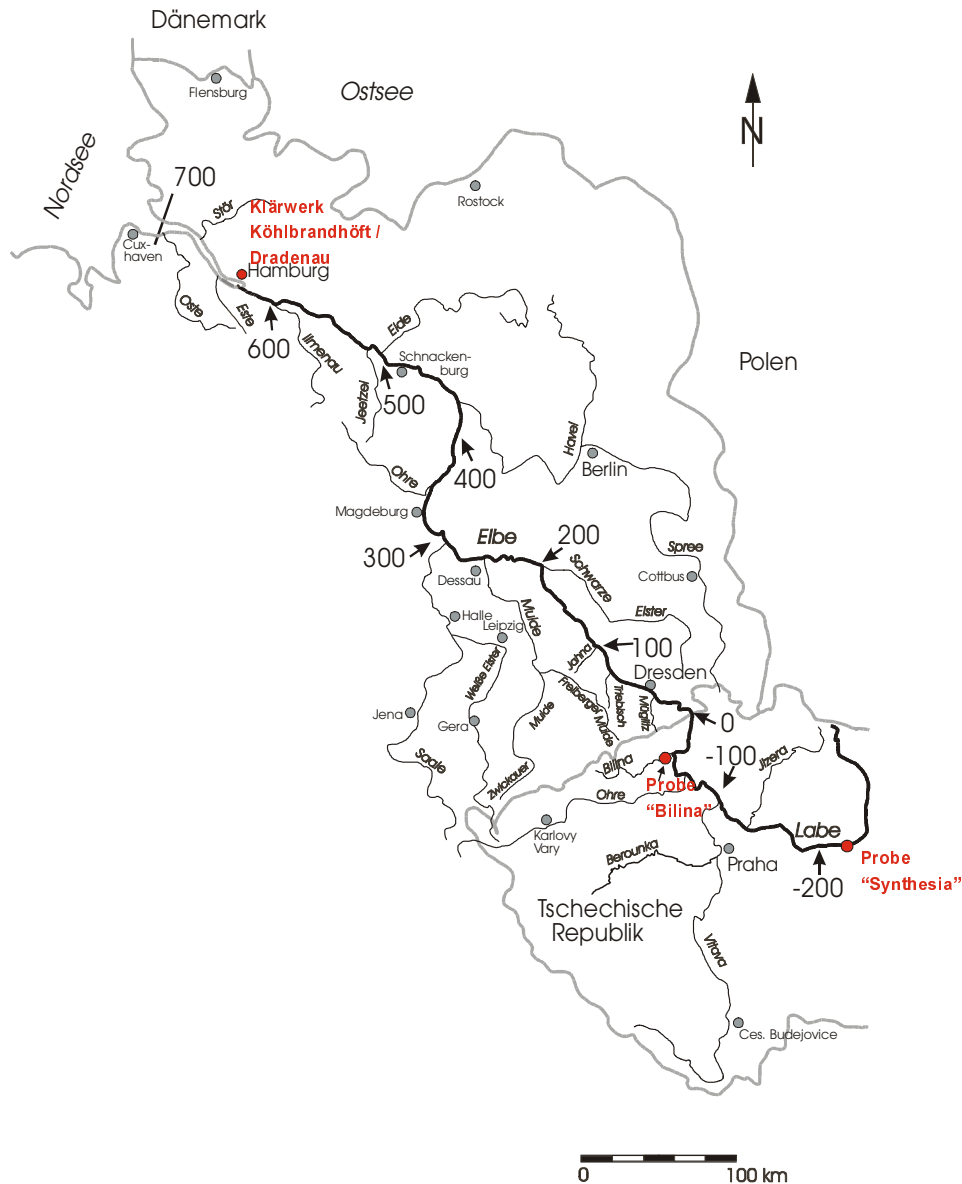


Abbildung 3.1: Geographische Darstellung der Elbe mit Eintragung der Probennahmeorte.

### 3.4 Chemische Analyse

Im folgenden Abschnitt werden die verschiedenen Verfahren der verwendeten chemischen Analyse vorgestellt. Zum einen wird der theoretische Hintergrund dargestellt, und zum anderen wird die konkrete Durchführung erörtert.

#### 3.4.1 Probenvorbereitung

##### Anreicherung

Die Proben wurden mit Dichlormethan nach AAV 1 (vgl. Abschnitt 7.6.1) flüssig-flüssig extrahiert. Im Gegensatz zur Festphasenextraktion ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion als

Probenvorbereitungsmethode zwar aufwendiger, wurde jedoch gewählt, um eine möglichst umfassende Extraktion gewährleisten zu können. Aufgrund des Gesamtziels des 'non-target screenings' der Proben sollte vermieden werden, dass durch die Wahl eines Festphasenmaterials eine Substanzdiskriminierung stattfindet. Aufgrund seines hohen Dipolmoments und seiner Dielektrizitätskonstante wurde Dichlormethan als Lösungsmittel gewählt, da es in der Lage ist, sowohl polare als auch mittelpolare Substanzen zu lösen. DESBROW ET AL. (1996 und 1998) nutzten Dichlormethan für eine Re-Extraktion von östrogen aktiven Substanzen nach einer HPLC-Fraktionierung.

### Reinigung und Fraktionierung

Die Gel-Permeations-Chromatographie (GPC, auch Größenausschlusschromatographie genannt) wurde zu mehreren Zwecken in die Probenvorbereitung integriert. Ein wichtiges Ziel war die Möglichkeit, unerwünschte Matrixkomponenten der Probe von den Analyten abzutrennen, und zum anderen bestand die Möglichkeit, die Probe zu fraktionieren. Diese Fraktionen können im Schema der BDCA eingesetzt werden.

Die feste Phase in der GPC ist ein gelartiges Polymer, das Poren mit unterschiedlichen Durchmessern besitzt. Je nach ihrer Größe können Moleküle unterschiedlich weit in die Poren hinein diffundieren oder sie werden nur an den Poren vorbei transportiert. Weitere Wechselwirkungen bestehen zwischen stationärer Phase und Analyten nicht. Daraus resultiert, dass Moleküle entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und große Moleküle aufgrund ihrer geringen Eindringtiefe in die Poren am schnellsten transportiert werden [MEYER 1999].

In AAV 2 wird die Durchführung der Fraktionierung mit Hilfe der GPC detailliert beschrieben (vgl. Abschnitt 7.6.2). Die dort genannte Säule wurde ausgewählt, da sie mit dem verwendeten Extraktionsmittel Dichlormethan genutzt werden konnte. Um einen weiteren Lösungsmittelwechsel zu vermeiden, war es wünschenswert, Fraktionierung und Extraktion mit Hilfe des gleichen Lösungsmittels durchführen zu können. Die Säule besitzt Porengrößen von 5 nm und ist damit für Molekülgrößen zwischen 100 und 3000 amu geeignet.

## *3.4.2 Kopplung von Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie*

### 3.4.2.1 Theoretische Grundlagen LC-MS

Die Flüssigchromatographie ist eine Trennmethode, die auf den unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Substanzen und der stationären Phase beruht. Bei der Umkehrphasen-Chromatographie wird eine unpolare stationäre Phase und eine relativ polare mobile Phase, wie z.B. Wasser, Methanol, Acetonitril oder Lösungsmittelgemische verwendet.

Die Massenspektrometrie ist eine Methode, in der die Moleküle fragmentiert und anschließend nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis detektiert werden.



Um Analyte mit der Flüssigchromatographie trennen zu können, bedarf es der Voraussetzung, dass die Analyte sich in einem Lösungsmittel lösen lassen. Im Gegensatz zur Gaschromatographie müssen die Substanzen nicht leicht flüchtig sein oder sich bei höheren Temperaturen unzersetzt verdampfen lassen [MEYER 1999]. In ein Massenspektrometer müssen Proben jedoch in ionisierter Form eingeführt werden, wobei das Hochvakuum aufrecht erhalten bleiben muss. Weiterhin muss ein Weg gefunden werden, die Probe ohne thermische Zersetzung der Analyte in die Gasphase zu überführen, da ansonsten der Vorteil der HPLC für polare und thermisch labile Verbindungen gegenüber der Gaschromatographie entfallen würde [OCKELS 1999].

Zwei heutzutage gebräuchliche, sogenannte 'Interfaces' für LC-MS (Verbindungsstück zwischen LC und MS) sind die Elektrospray-Ionisierung (ESI, 'electrospray ionization') und die chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI, 'atmospheric pressure chemical ionization'). Bei der ESI-Ionenquelle findet die Ionisierung in der flüssigen Phase statt, im Gegensatz zur APCI-Ionenquelle, in der die Moleküle in der Gasphase ionisiert werden [NIESSEN 1999]. Bei beiden Methoden wird eine sanfte Ionisierung der Moleküle bei Atmosphärendruck durchgeführt, und die thermische Belastung der Analyte ist relativ gering.

In beiden Ionisierungsformen werden mit den Analyt-Molekülen Addukte gebildet, deren Massen im Detektor aufgezeichnet werden. Im positiven Ionenmodus bildet sich zumeist  $[M+H]^+$  und im negativen Ionenmodus  $[M-H]^-$  [PE BIOSYSTEMS]. Da die Ionisierung sehr sanft ist, findet am Anfang nur eine geringe Fragmentierung statt und es werden im Regelfall die Molekülionen gebildet.

### Elektrospray-Ionisierung

Bei der Elektrospray-Ionisierung wird die mobile Phase aus dem Flüssigchromatographen versprüht und über ein Spannungsgefälle von mehreren Kilovolt in den stufenweise evakuierten Einlass des Massenspektrometers gesogen. In dem Lösungsmittelnebel kondensieren kleine Tröpfchen, die elektrostatisch aufgeladen sind. Das Lösungsmittel verdampft, ohne dass sich die Tröpfchen – aufgrund der elektrischen Abstoßung – vereinigen können, so dass sich ihr Durchmesser so weit verringert bis es schließlich zu einer Coulomb-Explosion kommt. Dabei bleiben einfach oder vielfach geladene Probenmoleküle übrig, restliche Lösungsmittelmoleküle werden vor der Öffnung zum Spektrometer abgepumpt. Die geladenen Probenmoleküle werden von einem System unterschiedlicher Spannungen fokussiert und so zum Massenanalysator transportiert. Da es für das Prinzip dieser Ionenquelle wichtig ist, dass sich bereits in der flüssigen Phase Ionen vorbilden, ist der pH-Wert von besonderer Bedeutung [NIESSEN 1999]. Als Protonierungshilfe sind daher Zugaben von Ammoniumacetat oder organischen Säuren in geringfügiger Konzentration zum Lösungsmittel notwendig. In Abbildung 3.2 wird das Prinzip der Elektrospray-Ionisierung am Beispiel der Turboionspray-Ionenquelle der Firma Applied Biosystems / PE Sciex dargestellt. In dieser Abbildung fehlt das Turbo-Gas, das in Realität im rechten Winkel zum Zerstäuber auf die Probe geblasen wird. Es handelt sich um beheizten Stickstoff, der das Verdampfen des Lösungsmittels beschleunigt, was besonders bei einem hohen Wasseranteil notwendig ist [PE BIOSYSTEMS, NIESSEN 1998].

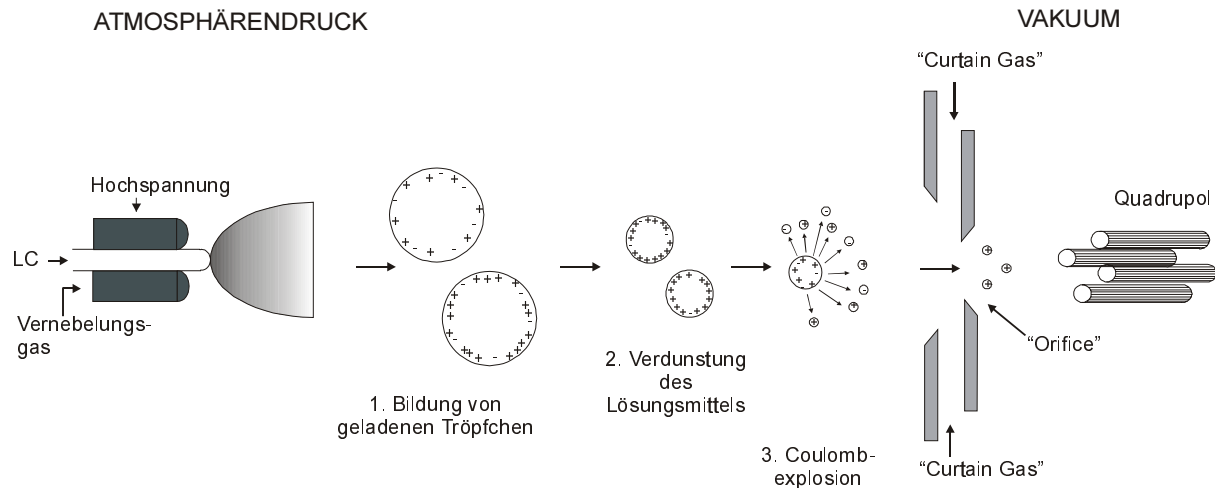


Abbildung 3.2: Prinzip der Elektrospray-Ionisierung am Beispiel des 'Turboionspray' der Fa. Applied Biosystems / PE Sciex (abgewandelt nach [PE BIOSYSTEMS]).

### APCI-Ionenquelle

In der nachfolgend vorgestellten APCI-Ionenquelle (in Abbildung 3.3 am Beispiel des 'Heated Nebulizer' der Fa. Applied Biosystems / PE Sciex dargestellt) erfolgt die Ionisierung in drei Schritten. Zunächst werden die Moleküle des Vernebelungsgases (i.d.R. Stickstoff) durch eine Corona-Entladung an einer Entladungs-Nadel mittels Hochspannung geladen. Dabei entstehen Primärionen, die sofort mit den Lösungsmittel-Molekülen reagieren. Von den so entstandenen Ionen erfolgt ein Protonentransfer zu den Analyt-Molekülen. Aus diesem Grund wird diese Ionisierungsmethode als chemische Ionisierung bezeichnet. Es ist keine Zugabe von Protonierungshilfen notwendig.

Das Eluat wird durch ein beheiztes Quarzrohr geleitet. Auf die Analyte wirkt eine Temperatur von ca. 120 °C. Daher ist bei diesem Interface eine Zersetzung von thermisch labilen Stoffen möglich [PE BIOSYSTEMS].

Welche Ionen schließlich am häufigsten in der Gasphase vorliegen, hängt von der höchsten Protonenaffinität oder der niedrigsten Gasphasen-Acidität der beteiligten Substanzen ab. Wenn im positiven Modus die Analyte eine höhere Protonenaffinität besitzen als die Lösungsmittel-Molekülen, werden sie protoniert; im negativen Modus geschieht dies, wenn die Lösungsmittel-Moleküle eine höhere Gasphasen-Acidität vorweisen als die Analyte [NIESSEN 1999].

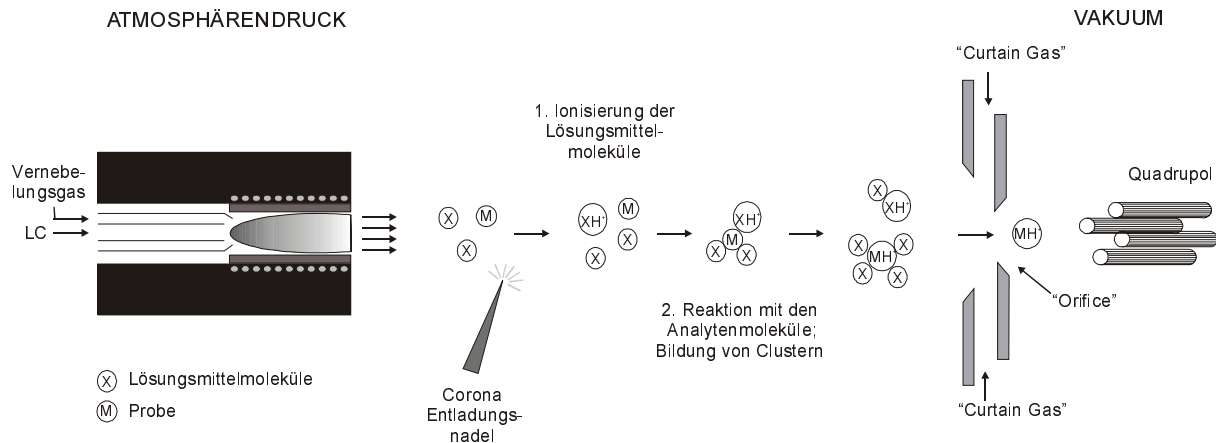


Abbildung 3.3: Prinzip einer APCI-Ionenquelle, am Beispiel des 'Heated Nebulizer' der Fa. Applied Biosystems / PE Sciex (abgewandelt nach [PE BIOSYSTEMS]).

Ein Unterschied zwischen den beiden Ionisierungs-Methoden ist der Einfluss von Matrix-Molekülen auf die Ionisierung. Bei ESI findet ein kompetitiver Prozess um die vorhandenen Protonen und um den Platz an der Außenseite der Tröpfchen statt, wo der Übergang in die Gasphase abläuft. Matrix-Komponenten in der Probe, die durch die eigene Protonierung einen Mangel an Protonen für die Analyte herbeiführen, führen zu einer schlechteren Wiederfindung und einer relativ hohen Standardabweichung bei Wiederholmessungen der gleichen Probe [OCKELS 1999, CHOI ET AL. 2001]. Da bei APCI durch die Corona-Entladung unbegrenzte Protonierungs-Möglichkeiten bestehen, gibt es diesen Wettbewerb um die Protonen nicht und die Wiederfindung in matrixbeladenen Proben ist in der Regel größer als bei ESI [NIESSEN 1999].

Neben den Ionenquellen spielen bei einem Massenspektrometer der Massenanalysator und der Detektor eine wichtige Rolle. Ein Tandem-Massenspektrometer, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, besteht aus drei Quadrupolen, von denen das erste und das dritte als Massenfilter dienen. Dabei wird mit Hilfe des ersten Quadrupols das Spektrum einer Probe aufgenommen. Interessiert aus diesem Spektrum eine oder mehrere Ionensorten besonders, besteht die Möglichkeit, nur Ionen mit den Masse/Ladungs-Verhältnissen dieser sogenannten "Mutterionen" weiterzuleiten und in einer Stoßkammer zu fragmentieren. Durch den Zusammenstoß mit Molekülen eines Kollisionsgases, zumeist Stickstoff, wird die kinetische Energie der Ionen in Vibrationsenergie umgewandelt, die schließlich zur Fragmentierung der Ionen führt. Diese Fragmente werden im zweiten Massenanalysator aufgetrennt und ergeben das Spektrum des Mutterions. Dieses Vorgehen kann zum einen Informationen über die Struktur der Analyte liefern und zum anderen können aufgrund der hohen Spezifität der Analysenmethode sehr geringe Konzentrationen der Analyte nachgewiesen werden, was in der Umweltanalytik von großem Vorteil ist [HESSE ET AL. 1995]. Die Nachweisgrenze ist am niedrigsten, wenn mit dem zweiten Massenanalysator nicht ein ganzes Massenspektrum des Mutterions aufgenommen wird, sondern ein oder mehrere spezifische Tochterionen ausgewählt und nur deren Massen analysiert werden.

### 3.4.2.2 Durchführung LC-MS

In dieser Arbeit wurde das Massenspektrometer API 3000 der Fa. Applied Biosystems / PE Sciex verwendet. Als Ionenquellen standen das 'Turboionspray', eine ESI-Ionenquelle und der 'Heated Nebulizer', eine APCI-Ionenquelle zur Verfügung. Das "Turbo" im Namen der ESI-Ionenquelle steht für die Möglichkeit, die Verdampfung des Lösungsmittels durch einen aufgewärmten Gasstrom zu unterstützen. Das API 3000 arbeitet mit einem dreifachen Quadrupol-System ('triple stage quadrupole').

Für die Analysen in dieser Arbeit wurde vorwiegend das 'Turboionspray' eingesetzt; der 'Heated Nebulizer' wurde nur für Vorversuche angewendet.

Für jeden Ionenübergang müssen die Spannungsparameter im API 3000 optimiert werden. In AAV 5 (vgl. Abschnitt 7.6.5) sind die in dieser Arbeit optimierten Parameter angegeben.

#### Quantifizierung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur Quantifizierung von Analyten: mit externen oder internen Standards oder mit dem Standardadditionsverfahren. Im einfachsten Fall werden Standardlösungen in verschiedenen Verdünnungen vermessen und die Fläche der erhaltenen Peaks über der Konzentration der Standards aufgetragen. Im Idealfall ergibt sich eine Ursprungsgerade. Mit dieser Kalibriergeraden werden anschließend die Gehalte in den Proben quantifiziert. Bei dieser Methode fallen Matrixeffekte ins Gewicht, wenn die Analyten im Standard in einer anderen Umgebung vorliegen, als die in der Probe. Es muss hinterher eine Korrekturrechnung erfolgen, die jedoch schwierig ist, da die Matrixeffekte in der Regel nicht in jeder Probe identisch und reproduzierbar sind.

Bei internen Standards wird die Probe gleich zu Beginn der Probenvorbereitung mit einer definierten Menge von Standardsubstanzen aufgestockt, die nicht in der Probe enthalten sind. Dazu werden häufig deuterierte Standards benutzt. Die Quantifizierung erfolgt durch den Vergleich der Peakflächen zwischen internem Standard und den Analyten. Hierbei unterliegt der interne Standard den gleichen Bedingungen wie die Analyte. Die Nutzung von internen Standards ist sehr kostenaufwendig.

Bei der dritten Methode handelt es sich um die Standardaddition. Dabei wird die Probe mit einer bekannten Menge der zu bestimmenden Komponenten aufgestockt. Es ist von Vorteil, wenn verschiedene Aliquote der Probe mit unterschiedlichen Mengen angereichert werden. Diese Methode ist sehr zeit- und arbeitsintensiv und es muss eine ausreichende Menge der Probe zur Verfügung stehen. Mit der Standardaddition ergibt sich (bei Auftragung der Intensität gegen die Konzentration) eine Kalibriergerade, die realistische Bedingungen widerspiegelt, da alle Störfaktoren mit einbezogen werden. Diese Kalibriergerade ist parallel zur Ordinate verschoben und der Betrag des Abszissenabschnittes entspricht der Analyt-Konzentration in der Probe [SCHWEDT 1995].

In dieser Arbeit wurde die externe Kalibrierung zum Quantifizieren genutzt. Das Standardadditionsverfahren wurde in Erwägung gezogen, konnte jedoch in der Regel wegen zu geringer Probenmengen nicht eingesetzt werden.

### Ermittlung von Wiederfindungsraten und Matrixeffekten im Gesamtverfahren

Um die Wiederfindungsraten und die Matrixeffekte im Gesamtverfahren zu bestimmen, wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt. Im folgenden Abschnitt wird die grundsätzliche Herangehensweise an diese Fragestellung erläutert. Unter Matrixeffekt wird in diesem Zusammenhang der Einfluss von Probenbestandteilen auf das Analyseergebnis verstanden. In diesem Verfahren bestehen vor allem bei der Ionisierung der Analyten vor dem Eintritt in das Massenspektrometer Möglichkeiten, das Ergebnis zu verfälschen (vgl. Abschnitt 3.4.2.1).

Die hier beschriebenen Untersuchungen wurden einmal in reinem<sup>4</sup> Wasser und ein weiteres Mal in Wasser des Kläranlagen-Ablaufes durchgeführt. Für diese Versuche gab es drei Ansätze (vgl. Abbildung 3.4), die jeweils nach AAV 1 extrahiert wurden:

1. das Wasser wurde ohne weitere Behandlung einer Extraktion unterzogen, um die vorhandenen Konzentrationen im Wasser zu ermitteln;
2. das Wasser wurde einer Extraktion unterzogen, und dem Extrakt wurde am Ende der Extraktion und Aufkonzentration eine bekannte Menge Standardlösung zugefügt (Aufstockung);
3. das Wasser wurde vor der Extraktion mit der gleichen bekannten Menge Standardlösung aufgestockt.

---

<sup>4</sup> Mit "reinem" Wasser wird im Folgendem Wasser aus einer Millipore-Anlage bezeichnet.

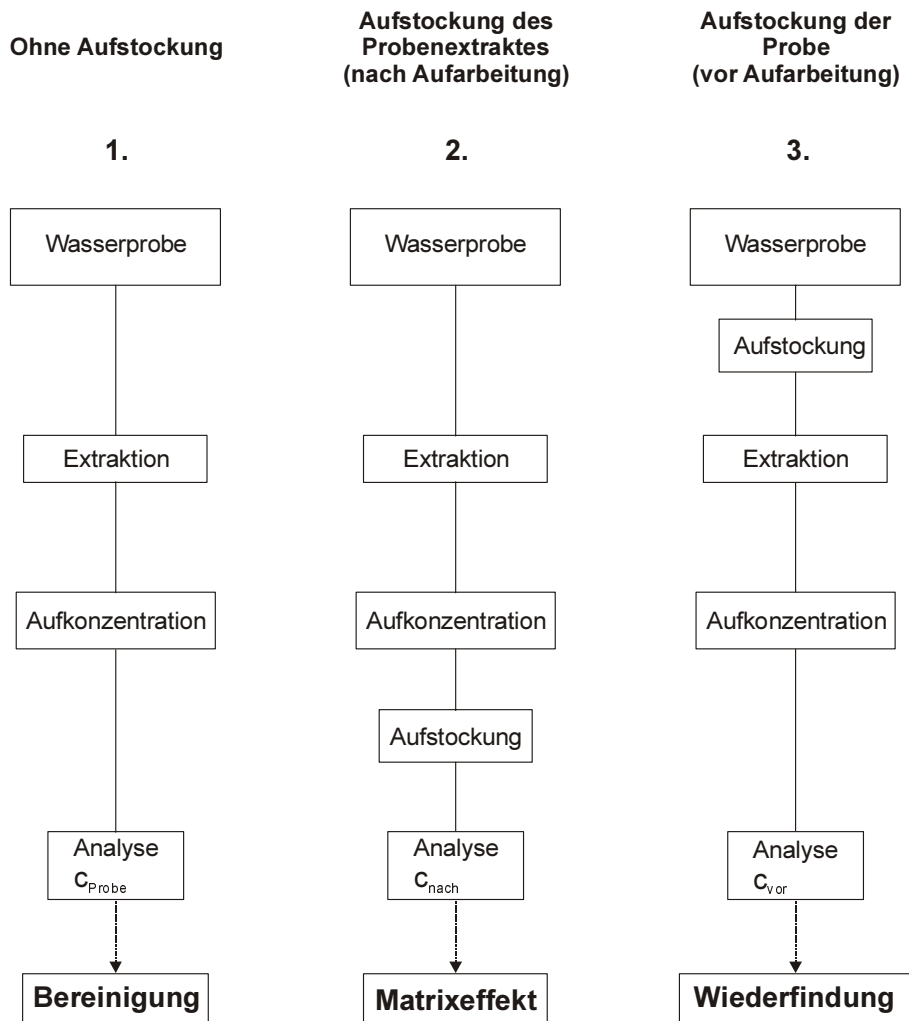


Abbildung 3.4: Schema zur Ermittlung des Matrixeffekts und der Wiederfindung innerhalb des Gesamtverfahrens.

Die Ergebnisse dieser drei Versuchsansätze lieferten im Vergleich miteinander Aussagen über die Wiederfindung innerhalb des Gesamtverfahrens und über den Matrixeffekt.

Die Analysenergebnisse aus Ansatz 1 dienen als Auskunft über die Realkonzentration der Analyten im Wasser. Dieser Wert wurde von den Ergebnissen der Ansätze 2 und 3 abgezogen, um die Berechnung der Wiederfindung der aufgestockten Menge an Analyten zu ermöglichen (vgl. Gleichung 3.1).

$$c_{nach, korrigiert} = c_{nach} - c_{Probe} \quad ; \quad c_{vor, korrigiert} = c_{vor} - c_{Probe} \quad (3.1)$$

Der Matrixeffekt wurde berechnet, um erkennen zu können, inwieweit die Wiederfindung der Analyte während der Detektion im LC-MS/MS verringert wurde. Da der Extrakt erst am Ende der Probenvorbereitung aufgestockt wurde, konnten in diesem Fall nur Vorgänge während der Detektion zu Verlusten in der Wiederfindung beitragen.

Um den Wert für den Matrixeffekt zu erhalten, wurde nach Gleichung 3.2 der prozentuale Anteil berechnet, den das korrigierte Messergebnis von Ansatz 2 ( $c_{nach, korrigiert}$ ) am bekannten Sollwert ( $c_{Aufstockung}$ ) hatte. Dieser Wert gibt die Wiederfindung nach der LC-MS/MS-Detektion an.

$$Matrixeffekt = \frac{c_{nach, korrigiert}}{c_{Aufstockung}} \cdot 100 \% \quad (3.2)$$

Unter der Wiederfindung innerhalb des Gesamtverfahrens wird in diesem Fall der Wert verstanden, der sowohl die Ausbeute über das Probenvorbereitungs-Verfahren als auch die möglichen Verluste während der Detektion berücksichtigt. Dazu wurde das Wasser zu Beginn aufgestockt und die zugesetzte Menge an Analyten wurde dem gesamten Probenvorbereitungs-Verfahren unterzogen. Dieser Wert trifft eine realistische Aussage über die Wiederfindung der Analyte in den Proben am Ende des gesamten Verfahrens, da mögliche Verluste wie mangelnde Ausbeute während der Extraktion, Verluste in Glasgeräten oder Verluste während der Aufkonzentration berücksichtigt werden.

Zur Ermittlung des Werts für die Wiederfindung innerhalb des Gesamtverfahrens, wurde nach Gleichung 3.3 der prozentuale Anteil berechnet, den das korrigierte Messergebnis von Ansatz 3 ( $c_{vor, korrigiert}$ ) am bekannten Sollwert ( $c_{Aufstockung}$ ) hatte.

$$Wiederfindung = \frac{c_{vor, korrigiert}}{c_{Aufstockung}} \cdot 100 \% \quad (3.3)$$

Interessiert dagegen die Ausbeute allein durch den Extraktionsprozess, muss aus der Wiederfindung innerhalb des Gesamtverfahrens der Anteil an Verlusten durch die Detektion, d.h. der Matrixeffekt herausgerechnet werden (vgl. Gleichung 3.4).

$$Ausbeute = \frac{Wiederfindung}{Matrixeffekt} \cdot 100 \% \quad (3.4)$$

## 3.5 Hefetest

### 3.5.1 Theoretische Grundlagen

Als Biotest wurde ein Test mit genetisch veränderten Hefezellen verwendet, der auf die Kopplung einer Substanz an den Östrogenrezeptor reagiert [ROUTLEDGE UND SUMPTER 1996]. Die Durchführung dieses Hefetests unterliegt in Deutschland den Vorschriften des Gentechnik-Gesetzes. Daher sollen im Folgenden in Kürze die betreffenden Regelungen vorgestellt werden.

### Gentechnik-Gesetz

Unter gentechnischem Arbeiten wird laut Gentechnik-Gesetz neben der Erzeugung gentechnisch veränderter Organismen ebenso die Verwendung, Vermehrung, Lagerung, Zerstörung, Entsorgung und der innerbetriebliche Transport gentechnisch veränderter Organismen (GVO) verstanden [§ 3 Nr.2 GenTG, Gentechnikgesetz 1993]. Da der verwendete Hefetest zur Bestimmung des östrogenen Potenzials mit genetisch veränderten Hefezellen arbeitet, bedarf seine Anwendung in Deutschland nach dem Gentechnikgesetz (§ 8 GenTG) einer Anmeldung bei der zuständigen Behörde.

Um eine Anlage betreiben zu können, in der gentechnische Arbeiten durchgeführt werden dürfen, muss der Betreiber sowohl einen Projektleiter als auch einen Beauftragten für die Biologische Sicherheit bestellen. Der Projektleiter führt die Planung, Leitung oder Beaufsichtigung der gentechnischen Arbeit durch [§ 14 GenTSV, Gentechnik-Sicherheitsverordnung 1990]. Der Beauftragte für die Biologische Sicherheit hat die Aufgabe, die Arbeit des Projektleiters in Bezug auf die Sicherheit der gentechnischen Arbeiten zu überwachen (§ 18 GenTSV). Die Sachkunde beider Personen muss nachgewiesen werden durch a) Abschluss eines naturwissenschaftlichen, medizinischen oder tiermedizinischen Hochschulstudiums, b) einer mindestens dreijährigen Tätigkeit auf dem Gebiet der Gentechnik und c) der Teilnahme an einer speziellen Fortbildungsveranstaltung (§§ 15 und 17 GenTSV).

Der Hefetest fällt nach § 9 GenTSV und dem Bescheid des Ministeriums für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein [MUNF 1999] unter die Sicherheitsstufe S1.

Zur Einrichtung des S1-Labors waren Geräte wie Sicherheitswerkbank, Autoklav und Inkubator notwendig. Der Raum musste so eingerichtet sein, dass alle Flächen leicht zu reinigen waren und es keine Möglichkeiten für biologische Kontaminationen gab.

### Prinzip des Testsystems

Für den Hefezelltest wird eine gentechnisch veränderte Form der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm: *S. cerevisiae* TFY 215) benutzt. Bei *Saccharomyces cerevisiae* handelt es sich um die gewöhnliche Bäckerhefe. Hefen sind Eukaryonten, d.h. es sind Organismen, die einen echten Zellkern haben und deren Zellen eine Kernhülle besitzen (im Gegensatz zu den Prokaryonten) und Kernteilungen durchlaufen. Die Firma GlaxoWellcome (Großbritannien) integrierte bei diesem Stamm die DNA-Sequenz für den menschlichen Östrogenrezeptor (hER) stabil in das Chromosom. Darüber hinaus wurden das 'Estrogen Responsive Element' (ERE) (Östrogenrezeptor-bindendes DNA-Element) und das *lac-Z*-Reportergen, welches das Enzym  $\beta$ -Galactosidase kodiert, in Plasmide der Hefezellen integriert. Plasmide sind Besonderheiten von Hefen. Es sind zirkelartige Teile der Hefe-DNA, die in 50 bis 100 Kopien im Hefekern vorkommen können, da sie in der Lage sind, autonom zu replizieren. Diese Plasmide können bis zu 2 % der gesamten DNA einer Hefezelle ausmachen [DINGERMAN 1999]. In Abbildung 3.5 ist schematisch die Funktionsweise des verwendeten Hefetests dargestellt. Die Zahlen in der Abbildung geben die Reihenfolge des im Folgendem beschriebenen Ablaufes wieder.



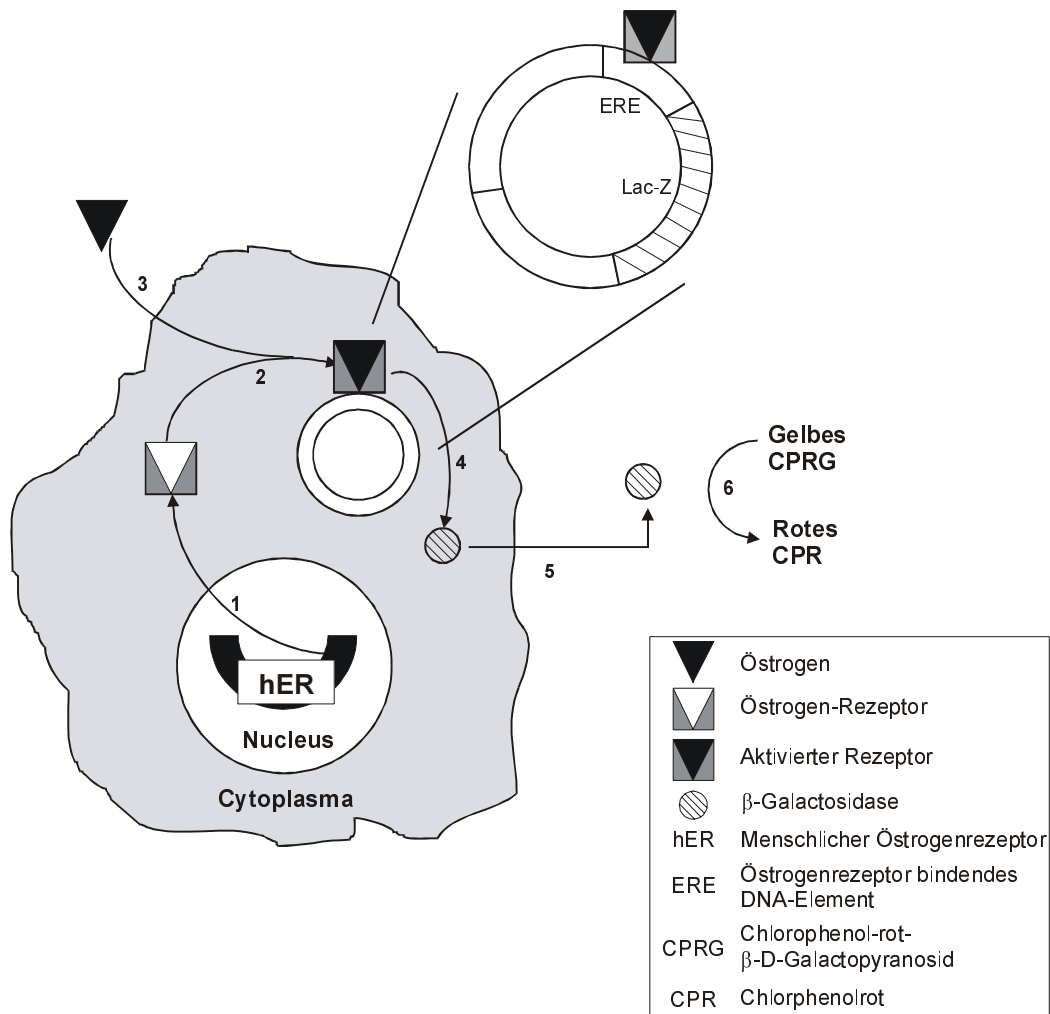


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des Hefetests für östrogenartige Substanzen (abgeändert nach [ROUTLEDGE UND SUMPTER 1996]).

Biologische Rezeptoren sind im engen Sinn Proteine, an denen Botenstoffe binden können. Beim Östrogen-Rezeptor wirken Hormone nach dem Schlüssel / Schloss-Prinzip. Der Östrogenrezeptor befindet sich frei in der Zelle (1). Er wird durch die Bindung von Östrogenen aktiviert (ligandenaktivierter Rezeptor) (2, 3). Ein solchermaßen aktivierter Rezeptor bindet an eine spezifische DNA-Sequenz (ERE) (2). Diese befindet sich in der Regulatorregion bestimmter Gene, deren Transkription der aktivierte Rezeptor veranlassen kann [GÜLDEN ET AL. 1997]. In Abbildung 3.4 ist dargestellt, dass sich das Östrogenrezeptor-bindende DNA-Element (ERE) auf dem Plasmid vor dem *lac-Z*-Reportergen befindet, das das Enzym β-Galactosidase kodiert. Ein Reporter-Gen ist ein Gen, dessen Produkt leicht detektierbar und quantifizierbar ist. In diesem Fall wird das Enzym β-Galactosidase nach der oben beschriebenen Kettenreaktion synthetisiert, wenn eine Substanz an den Östrogenrezeptor bindet (4). β-Galactosidase metabolisiert die gelbe Substanz Chlorophenolrot-β-D-Galactopyranosid (CPRG) in den roten Farbstoff Chlorphenolrot (CPR) (5, 6), dessen Absorption mit einem Photometer gemessen werden kann [ROUTLEDGE UND SUMPTER 1996] (vgl. Abbildung 3.6).



ROUTLEDGE UND SUMPTER (1996) untersuchten mit dem Hefetest verschiedene Klassen von Tensiden und ihre Haupt-Abbauprodukte auf östrogene Aktivität. Dabei fanden sie heraus, dass 4-Octylphenol und Nonylphenol, Abbauprodukte von Alkylphenolpolyethoxylaten, im verwendeten Hefetest schwach östrogen wirksam sind.

SOHONI UND SUMPTER (1998) führten mit zwei Hefetests mit unterschiedlichen Rezeptoren vergleichende Untersuchungen zur Frage durch, ob Substanzen, die östrogen wirksam sind, gleichzeitig ebenso anti-androgen wirken. Der eine Hefetest besaß den menschlichen Östrogenrezeptor und der andere Hefetest den menschlichen Androgenrezeptor. Für Bisphenol A, Butylbenzylphthalat und o,p'-DDT wurde neben der östrogenen Aktivität gleichfalls eine anti-androgene Wirksamkeit festgestellt. p,p'-DDE wirkte ebenso anti-androgen.

ASHBY ET AL. (1997) nutzten den Hefetest zur Absicherung zusammen mit einem *in vivo*-Test mit Ratten, in dem die Erhöhung des Uterusgewichts als Merkmal für östrogene Aktivität einer verabreichten Substanz gewertet wird. Das Ziel dieser Untersuchung war die Bestätigung oder Widerlegung der Behauptung, Benzoessäure und Clofibrat seien östrogen wirksam. Sowohl im *in vivo*-Test mit den Ratten als auch im *in vitro*-Hefetest ergaben die Befunde, dass diese Substanzen nicht östrogen waren.

### 3.5.2 Durchführung und Auswertung des Hefetests

#### Durchführung

Der Hefetest wurde auf 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgeführt. Inklusiv der notwendigen Vorarbeiten wird pro Ansatz eine Woche benötigt. Alle Arbeiten mit den Hefezellen wurden in einem S1-Labor durchgeführt. Die Durchführung des Hefetests wird in AAV 3 (Abschnitt 7.6.3) ausführlich erläutert.

In Abbildung 3.7 ist am Beispiel der Positivkontrolle 17 $\beta$ -Östradiol und des synthetischen Östrogens Mestranol ein Foto einer Mikrotiterplatte abgebildet. Die Abbildung gibt das Aussehen nach Ablauf des Tests am vierten Tag wieder.

#### Auswertung

Entsprechend AAV 3 (vgl. Abschnitt 7.6.3) wurden mit dem Photometer für Mikrotiterplatten die Extinktionen der sich auf den Mikrotiterplatten befindlichen Proben bei 540 nm und 640 nm gemessen. Die Extinktion bei 540 nm ( $E_{540}$ ) gibt die Intensität der Rot-Färbung der Probe an, und die Extinktion bei 640 nm ( $E_{640}$ ) zeigt die Trübung durch die Hefe an. Da die Intensität der Färbung durch den Lichtverlust verstärkt wird, der durch die Trübung ausgelöst wird, musste dieser Wert ( $E_{Färbung}$ ) korrigiert werden (vgl. Gleichung 3.5).

$$E_{Färbung} = E_{540} - E_{640} \quad (3.5)$$

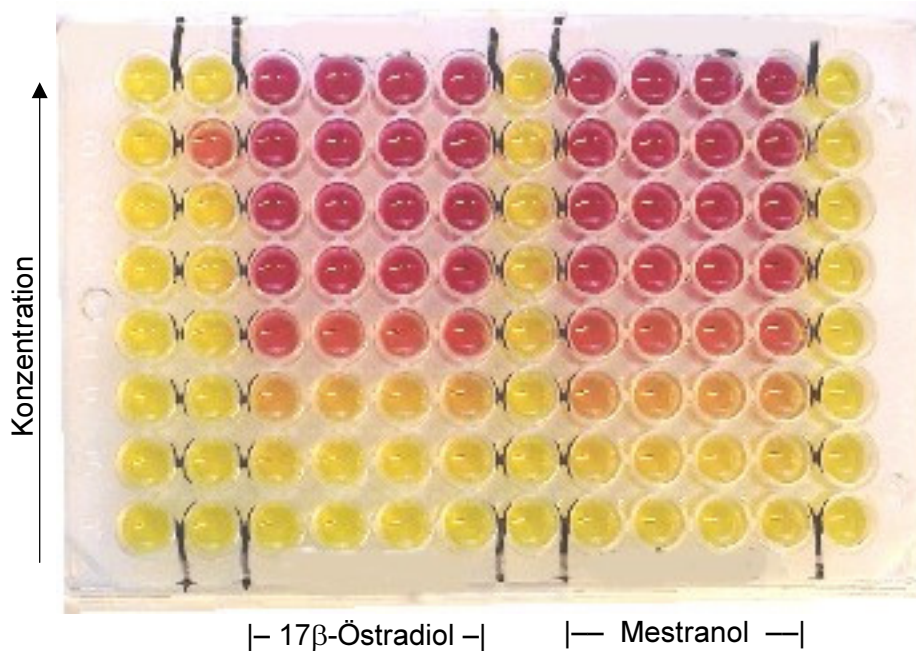


Abbildung 3.7: Beispiel für eine Mikrotiterplatte im Hefetest, auf der linken Seite ist die Positivkontrolle 17 $\beta$ -Östradiol und auf der rechten Seite Mestranol als Analyt zu sehen.

Weiterhin wurde der Mittelwert aller Blindwerte ( $\overline{E_{Bl}}$ , reines Lösungsmittel) von diesen Werten abgezogen, um die Werte bezüglich der möglichen Färbung der Blindprobe zu korrigieren (vgl. Gleichung 3.6).

$$E_{korrigiert} = E_{Färbung} - \overline{E_{Bl}} \quad (3.6)$$

Die Proben bzw. Standardsubstanzen wurden auf den Mikrotiterplatten mit drei bzw. vier Wiederholmessungen untersucht, aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Dieser Wert entsprach der Wirkung, die die Probe bzw. die Standardsubstanz in diesem Hefetest auslöste. Die wirksame Dosis in einer Vertiefung entsprach einem Zwanzigstel der Nominalkonzentration des Standards, da der in 10  $\mu$ L gelöste Standard nach Verdunsten des Lösungsmittels in 200  $\mu$ L Medium aufgenommen wurde. In Abbildung 4.7 werden die Dosis-Wirkungs-Kurven für die in dieser Arbeit untersuchten Analyte dargestellt.

### Dosis-Wirkungs-Kurven

Für die Toxizität von Substanzen ist das von Paracelsus (1493-1541) formulierte Gesetz der Dosisabhängigkeit der toxikologischen Wirkung grundlegend. Diese Abhängigkeit wird durch Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt. Darin wird die prozentuale Häufigkeit einer Wirkung bei einem Organismus gegen den Logarithmus der Dosis aufgetragen. Unter Dosis wird die Konzentration und Einwirkungsdauer einer Substanz verstanden. Dosis-Wirkungs-Kurven von Umweltchemikalien zeigen zumeist einen sigmoiden Verlauf, der signalisiert, dass ein

schädigender Effekt erst nach einer Schwellenkonzentration auftritt. Er steigt dann aber mit zunehmender Konzentration steil an und schließlich strebt die Wirkung asymptotisch der maximalen Wirkung zu. Zur Charakterisierung der Wirkungsstärke oder absoluten Potenz [GÜLDEN ET AL. 1997] von Substanzen wird aus den Dosis-Wirkungs-Kurven der  $EC_{50}$ -Wert ermittelt. Der  $EC_{50}$ -Wert ('Effect Concentration', Effektkonzentration) bezeichnet die Konzentration, die eine halbmaximale Wirkung erzeugt. Im Gegensatz zum  $LC_{50}$ -Wert (Lethal Concentration), der die Konzentration angibt, die bei 50 % der Testorganismen tödlich wirkte, wird der  $EC_{50}$ -Wert in Testsystemen verwendet, die nicht Mortalität als Endpunkt haben, sondern z.B. östrogenes Potenzial [KENT 1998].

Um die  $EC_{50}$ -Werte zu ermitteln, wurde in jedem Test die maximale Wirkung von  $17\beta$ -Östradiol aus dem entsprechenden Test als 100 % gesetzt. Anschließend wurde der Prozentsatz der anderen Verdünnungen von  $17\beta$ -Östradiol und von der Testsubstanz, bezogen auf diese höchste korrigierte Extinktion von  $17\beta$ -Östradiol, berechnet. Diese Prozentwerte wurden gegen die Konzentrationen aufgetragen und bei 50 % der Wirkung von  $17\beta$ -Östradiol wurde die Konzentration des  $EC_{50}$ -Werts abgelesen. Ebenso wurde bei dieser 50%-Marke der  $EC_{50}$ -Wert für die Testsubstanz ermittelt (vgl. Abbildung 3.8). Zusätzlich zu den  $EC_{50}$ -Werten wurden  $EC_{20}$ -Werte ermittelt. Da bei manchen Substanzen die Dosis-Wirkungs-Kurve nicht bis zur gleichen Extinktion reichte, wie die maximale Wirkung von  $17\beta$ -Östradiol, eignete sich eine niedrigere Effektkonzentration besser als Vergleichswert.

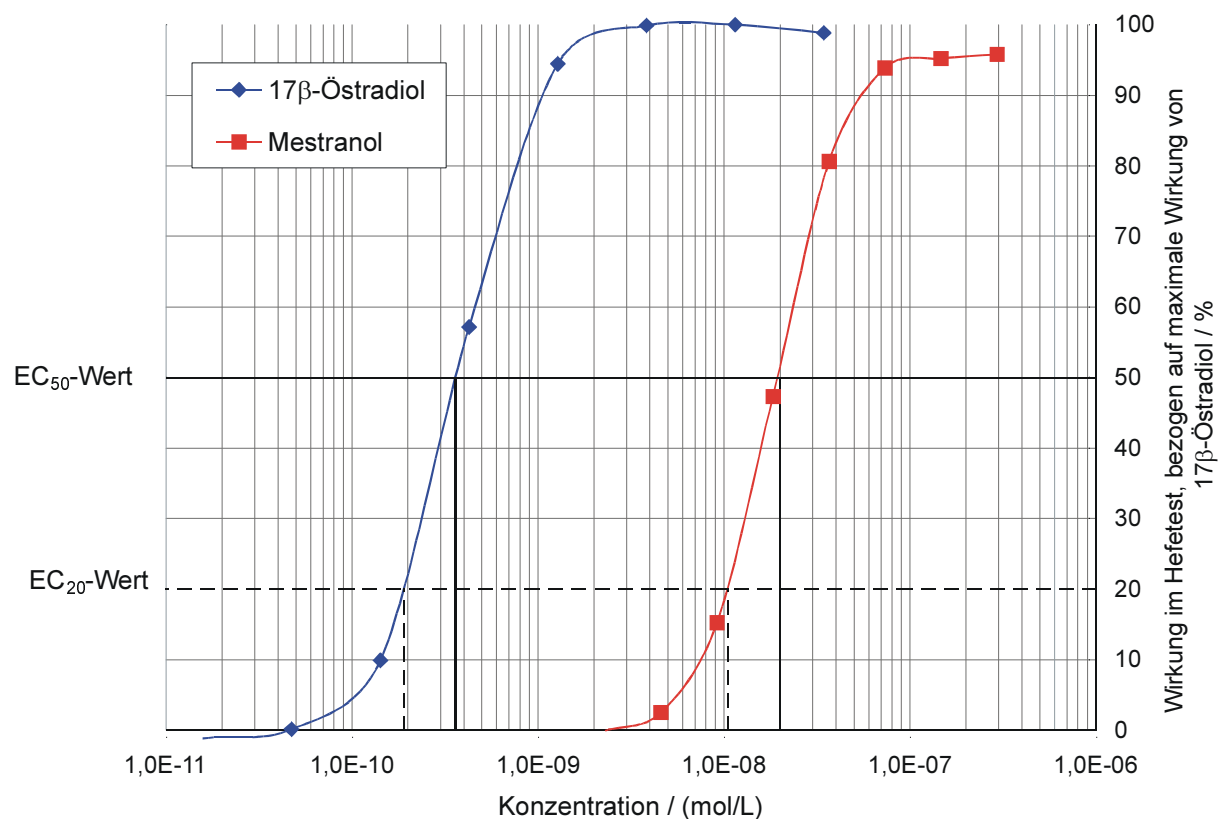


Abbildung 3.8: Beispiel zur Ermittlung der  $EC_{50}$ - und  $EC_{20}$ -Werte.

### Berechnung von EEF und EEQ

Um verschiedene Einzelsubstanzen miteinander vergleichen zu können, werden Östradiol-Äquivalenz-Faktoren (EEF, 'estradiol equivalency factor') nach KÖRNER ET AL. (2001) berechnet. Die dimensionslosen Östradiol-Äquivalenz-Faktoren geben die jeweilige östrogene Wirksamkeit, d.h. eine relative östrogene Potenz [GÜLDEN ET AL. 1997], im Vergleich zu 17 $\beta$ -Östradiol an (vgl. Gleichung 3.7).

$$EEF = \frac{EC_{50} (17\beta\text{-Östradiol})}{EC_{50} (Testsubstanz)} \quad (3.7)$$

Um die Wirkung von Probenextrakten in einem Biotest für östrogen wirksame Substanzen quantitativ angeben zu können, werden entsprechend KÖRNER ET AL. (2001) Östradioläquivalente (EEQ, 'estradiol equivalent concentration') aus dem Hefetest (EEQ<sub>H</sub>) bestimmt. Der EEQ-Wert umfasst die gesamte Menge östrogen aktiver Verbindungen in einer flüssigen Probe. Er gibt die Konzentration von 17 $\beta$ -Östradiol an, die dieselbe östrogene Wirkung im Testsystem auslösen würde wie die Probe. Zu beachten ist, dass der EC<sub>50</sub>- oder EC<sub>20</sub>-Wert der Probe dabei einen dimensionslosen Verdünnungsfaktor des Extrakts darstellt (vgl. Gleichung 3.8).

$$EEQ_H = EC_{50} (17\beta\text{-Östradiol}) \cdot EC_{50} (Probe) \quad (3.8)$$

Zur Ermittlung der effektiven Konzentration der Probe wird von der Extinktion ausgegangen, bei der 17 $\beta$ -Östradiol 50 % bzw. 20 % Wirkung erreicht (vergleiche dazu Abbildung 3.7, anstelle des Mestranols in diesem Beispiel wird die Wirkung der unbekannt Probe eingesetzt). Der Verdünnungsfaktor wird mit dem EC<sub>50</sub>-Wert (EC<sub>20</sub>-Wert) von 17 $\beta$ -Östradiol aus dem entsprechenden Versuch multipliziert, um die Konzentration der gesamten Menge an östrogen aktiven Substanzen in der Probe zu erhalten. Dabei wird die Konzentration an 17 $\beta$ -Östradiol angegeben, die diese Wirkung auslösen würde. Der Verdünnungsfaktor wurde auf ein Äquivalent von einem Liter Probe berechnet.

Weiterhin gibt es die Möglichkeit, Östradiol-Äquivalente aus der chemischen Analyse zu ermitteln. Dazu wird die Konzentration der bestimmten Analyte mit dem jeweiligen Östradiol-Äquivalenz-Faktor (EEF), der im Hefetest ermittelt wurde, multipliziert. Diese einzelnen Östradiol-Äquivalente der Substanzen einer Probe werden aufsummiert, und die Summe dieser EEQs (EEQ<sub>A</sub>) wird mit dem EEQ<sub>H</sub>, der aus dem Hefetest ermittelt wurde, verglichen. Der EEQ<sub>A</sub> stellt einen Wert dar, der die theoretische Wirkung im Hefetest entsprechend der Analytikergebnisse widerspiegelt. Dieser Wert gibt ebenfalls die Konzentration von 17 $\beta$ -Östradiol an, die eine entsprechende Wirkung im Hefetest auslösen würde.

Die Konzepte von den Östradiol-Äquivalenz-Faktoren und den Östradioläquivalenten sind analog denen der entsprechenden Toxizitätsfaktoren (TEF) und Toxizitätsäquivalenten (TEQ) aufgebaut, die für die akute Toxizität gelten und in Beziehung zu der Referenzsubstanz 2,3,7,8-TCDD (Dioxin) gesetzt werden [SAFE 1990, ZABEL ET AL. 1995].

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In diesem Kapitel werden die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse vorgestellt. Sie beziehen sich zum einen auf die Entwicklung und die daraus resultierenden Leistungsparameter des chemisch-analytischen Verfahrens, auf die Adaptation des Hefetests an die BDCA sowie die Ergebnisse seiner Validierung und schließlich auf die Untersuchung einiger realer Wasserproben.

### 4.1 Methodenentwicklung

Für das chemisch-analytische Verfahren wurde wie nachfolgend beschrieben die Methode der Flüssig-Flüssig-Extraktion optimiert. Für die LC-MS-Detektion wurde die LC-Methode entwickelt und optimiert, sowie die gesamten Parameter für das API 3000 für die verschiedenen Ionenübergänge ermittelt und die Empfindlichkeit optimiert.

#### 4.1.1 Optimierung des Extraktionsverfahrens

##### Auswahl des Extraktionsmittels

Dichlormethan als Extraktionsmittel wurde mit dem verwandten Chloroform auf seine Eigenschaften als Extraktionsmittel verglichen. Dazu wurden die Wiederfindungen für die Analyte in reinem Wasser bestimmt, die in Tabelle 4.1. aufgelistet sind. Die Extraktion wurde nach AAV 1 (vgl. Abschnitt 7.6.1) ausgeführt.

Tabelle 4.1: Vergleich der Extraktionsmittel Dichlormethan und Chloroform anhand der Wiederfindung in reinem Wasser.

	Wiederfindung / % ESI-LC-MS/MS		Wiederfindung / % APCI-LC-MS/MS	
	Dichlormethan	Chloroform	Dichlormethan	Chloroform
Bisphenol A	72	27	93	32
17 $\beta$ -Östradiol-17-valerat	34	38	46	46
17 $\beta$ -Östradiol	45	45	56	52
Östriol	3	1	3	1
Östron	44	46	57	53
17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	44	45	54	50
Mestranol	60	59	58	52
Nonylphenol	49	55	63	63
4-Octylphenol	42	46	46	49

Diese Wiederfindungen beziehen sich auf das gesamte Verfahren. Zwischen den beiden Extraktionsmitteln Dichlormethan und Chloroform waren keine großen Unterschiede bezüglich der Ausbeute zu erkennen. Nur Bisphenol A war eine Ausnahme, denn hier war die Wiederfindung bei der Extraktion mit Dichlormethan mehr als doppelt so groß. Die

Wiederfindungen sind bei APCI-LC-MS/MS in der Regel größer als bei ESI-LC-MS/MS, was auf den geringeren Einfluss von Matrixbestandteilen auf die Ionisierung zurückzuführen ist. Da Chloroform mit einem MAK-Wert von 2,5 mg/m<sup>3</sup> und der Einstufung in den Schweizer Giftklassen in Klasse 1\* (sehr starkes Gift) giftiger ist als Dichlormethan mit einem MAK-Wert von 350 mg/m<sup>3</sup> und Klasse 4 (nicht unbedenklicher Stoff) [MERCK 2001], wurde die Extraktion im Folgenden mit Dichlormethan durchgeführt.

#### Einfluss des pH-Werts auf die Extraktionsausbeute

In einer sequentiellen Extraktion wurde der Einfluss des pH-Werts auf das Extraktionsergebnis ermittelt. Dazu wurden 1,5 L Millipore-Wasser (pH 5<sup>5</sup>) mit einer bekannten Menge eines Standardgemischs aufgestockt (ca. 4 ng/L). Dieses Wasser wurde dreimal in Folge (50 mL, 30 mL, 30 mL Dichlormethan) extrahiert. Anschließend wurde das Wasser mit Natronlauge (c = 6 mol/L) auf pH 11 gebracht und ebenfalls dreimal in Folge extrahiert. Schließlich wurde das Wasser mit Salzsäure (15 % (v/v)) angesäuert und dreimal bei pH 2 extrahiert. Die nach pH-Wert getrennten Dichlormethan-Extrakte wurden jeweils separat weiterverarbeitet, um die anschließenden Analysen-Ergebnisse den Extraktionsausbeuten für den jeweiligen pH-Wert zuordnen zu können.

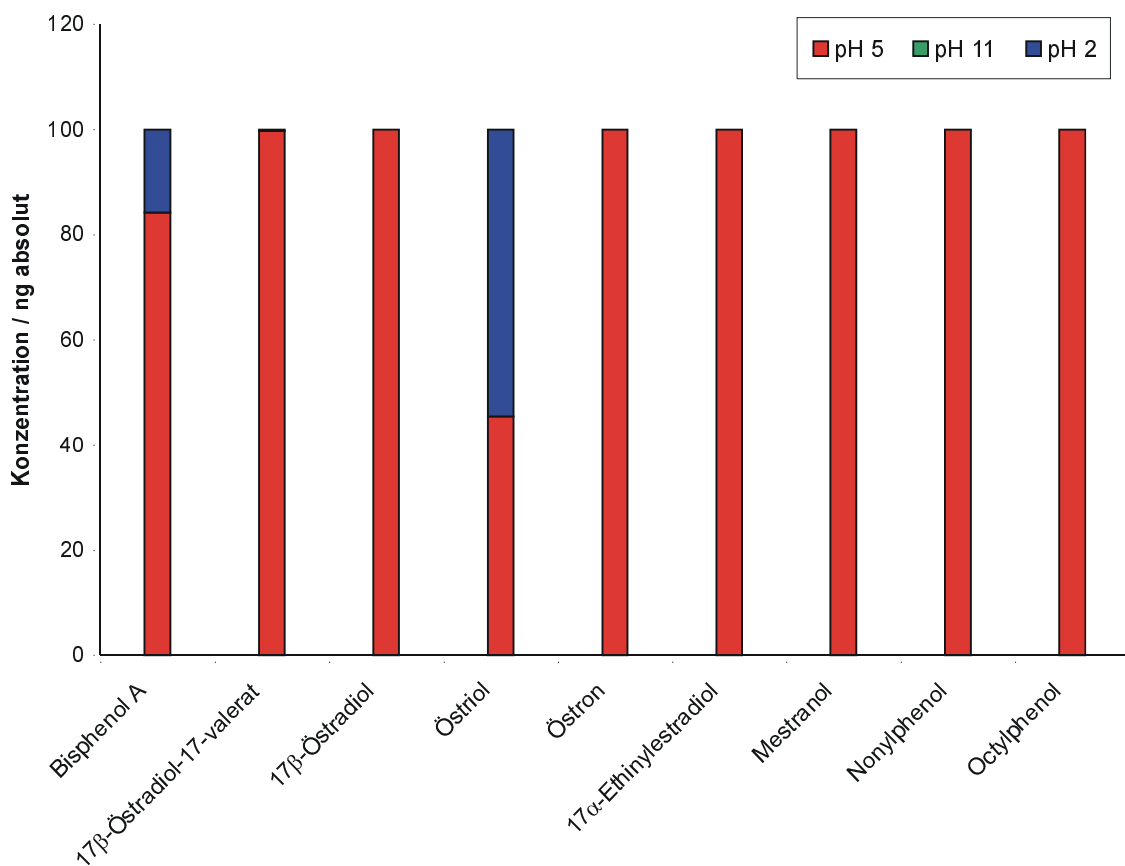


Abbildung 4.1: Einfluss des pH-Werts auf die Extraktionsausbeute bei einer sequentiellen Extraktion.

<sup>5</sup> Die saure Reaktion des Millipore-Wassers (pH 5 anstatt pH 7) weist darauf hin, dass sich im Vorratstank erneut Kohlendioxid gelöst hat.



Das Ergebnis der sequentiellen Extraktion zeigte, dass die Extraktion bei pH 5 nahezu vollständig verlief. Bei pH 11 wurden keine Analyten und bei pH 2 zusätzliche Anteile von Bisphenol A und Östriol extrahiert (vgl. Abbildung 4.1). Daraus resultierte, dass die weiteren Proben entsprechend AAV 1 zunächst ohne Zugabe von Säuren oder Basen und schließlich bei pH 2 sequentiell extrahiert wurden.

#### 4.1.2 Matrix und Wiederfindung

Die Untersuchungen für das in Abschnitt 3.4.2.2 beschriebene Schema zur Ermittlung von Matrixeffekten und Wiederfindungen wurden sowohl mit reinem Wasser als auch mit Wasser aus dem Kläranlagen-Ablauf durchgeführt. Zur Quantifizierung wurden jeweils externe Kalibrierungen durchgeführt.

Tabelle 4.2: Matrixeffekte und Wiederfindung in reinem Wasser, analysiert mit ESI-LC-MS/MS (Fehlerangabe: Abweichung vom Mittelwert für zwei Parallelproben).

	Korrelations- koeffizient R	Wiederfindung / %	
		bei LC-MS-Detektion (Matrixeffekt)	über das Gesamt- verfahren
17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	0,99709	82 $\pm$ 4	45 $\pm$ 2
17 $\beta$ -Östradiol	0,99629	82 $\pm$ 4	46 $\pm$ 6
17 $\beta$ -Östradiol-17- valerat	0,99853	86 $\pm$ 3	47 $\pm$ 9
Bisphenol A	0,99980	180 $\pm$ 2	95 $\pm$ 47
Mestranol	0,99517	108 $\pm$ 3	61 $\pm$ 7
Nonylphenol	0,99859	97 $\pm$ 2	47 $\pm$ 4
4-Octylphenol	0,99880	88 $\pm$ 5	49 $\pm$ 10
Östriol	0,99849	100 $\pm$ 3	7 $\pm$ 9
Östron	0,99893	94 $\pm$ 3	52 $\pm$ 4

Das reine Wasser wurde mit ca. 8 ng/L des jeweiligen Analyten in einem Standardgemisch aufgestockt. Der Matrixeffekt in reinem Wasser war bei vielen der untersuchten Analyten im Vergleich zu realen Proben (s.u.) relativ gering. Bisphenol A hatte jedoch einen Matrixeffekt, der 100 % weit überstieg und nicht erklärt werden konnte. Alle anderen Analyte erreichten in diesem beschriebenen Fall eine Wiederfindung bei LC-MS-Detektion zwischen 80 % und 110 % bezogen auf den aufgestockten Standard. Die Wiederfindung innerhalb des Gesamtverfahrens in reinem Wasser ist jedoch gering. Die Wiederfindung von Östriol erreichte etwa 7 % und die der übrigen Analyte lag im Bereich von 45 % bis 61 %; nur die Wiederfindung innerhalb des Gesamtverfahrens von Bisphenol A lag bei 95 %, was jedoch vermutlich auf einen Matrixeffekt, der das Signal erhöhte, zurückzuführen war (vgl. Tabelle 4.2, Spalte Matrixeffekt) Allerdings wiesen die zwei Parallelproben bei dem Ergebnis für Bisphenol A eine Streuung von annähernd 50 % auf.

Für die Bestimmung der Wiederfindung über das Gesamtverfahren und der Matrixeffekte in Kläranlagen-Abwasser wurde sowohl eine Detektion mit ESI-LC-MS/MS als auch mit APCI-LC-MS/MS durchgeführt. Die Ergebnisse zwischen den beiden Ionisierungen unterschieden sich für die neun Analyte (vgl. Tabelle 4.3). Bei ESI-LC-MS/MS war der Matrixeffekt im Kläranlagen-Wassers generell größer als in reinem Wasser. Er lag zwischen 34 % und 69 %. Bei der Wiederfindung über das Gesamtverfahren stach Östriol mit etwa 3 % mit einem besonders niedrigen Wert heraus. Östriol kann offenbar mit diesem Extraktionsverfahren nicht erfasst werden. Die anderen Wiederfindungen innerhalb des Gesamtverfahrens lagen mit Werten zwischen 27 % und 65 % ebenfalls relativ niedrig. Die Analyse der gleichen Proben mit APCI-LC-MS/MS zeigte ein anderes Extrem. In diesem Fall lagen die Wiederfindungen in der LC-MS-Detektion über 100 %. Sie lagen zwischen 110 % und 181 %. Theoretisch sollte der Matrixeffekt beim 'Heated Nebulizer' geringer sein, da die Analyten nicht mit den Matrixkomponenten um Ladung konkurrieren müssen. In diesem Fall schlug der Matrixeffekt allerdings in die gegenteilige Richtung aus. Die Wiederfindung über das Gesamtverfahren lag mit 16 % für Östriol im Vergleich zu dem Ergebnis von ESI-LC-MS/MS (3 %) sehr hoch; für die anderen Verbindungen lag sie zwischen 86 % und 146 %. Die Wiederfindungen mit dem 'Heated Nebulizer' lagen nah an 100 %, jedoch muss ebenfalls der Matrixeffekt berücksichtigt werden, der in diesem Fall die Ergebnisse erhöhte.

Aus diesem Grund wurden Experimente durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich der Matrixeffekt durch einen Reinigungsschritt mit Hilfe von Gel-Permeations-Chromatographie verringern ließ.

Tabelle 4.3: Vergleich von Matrixeffekten und Wiederfindungen in Wasser aus dem Kläranlagen-Ablauf, gemessen mit ESI-LC-MS/MS und APCI-LC-MS/MS (Fehlerangabe: Abweichung vom Mittelwert zweier Parallelproben).

	ESI-LC-MS/MS			APCI-LC-MS/MS		
	Korrelationskoeffizient R	Wiederfindung / % bei LC-MS-Detektion	Wiederfindung / % über Gesamtverfahren	Korrelationskoeffizient R	Wiederfindung / % bei LC-MS-Detektion	Wiederfindung / % über Gesamtverfahren
17β-Östradiol	0,98754	34 ± 5	27 ± 1	0,99656	181 ± 17	146 ± 28
17β-Östradiol-17-valerat	0,99920	59 ± 6	46 ± 9	0,99976	125 ± 3	96 ± 20
Nonylphenol	0,99604	69 ± 8	59 ± 20	0,99289	110 ± 14	88 ± 22
4-Octylphenol	0,98706	68 ± 14	65 ± 15	0,99723	114 ± 6	92 ± 19
Bisphenol A	0,99938	45 ± 4	29 ± 3	0,99507	119 ± 18	86 ± 8
Mestranol	0,99756	50 ± 9	39 ± 5	0,99835	158 ± 10	109 ± 29
Östriol	0,99921	45 ± 4	3 ± 1	0,99639	146 ± 10	16 ± 2
Östron	0,99616	37 ± 4	28 ± 5	0,99828	113 ± 9	89 ± 21

### 4.1.3 Vergleich der Wiederfindung mit und ohne GPC-Cleanup

Eine Probe des Kläranlagenablaufes wurde in zwei parallelen Ansätzen aufgestockt und extrahiert. Der eine Ansatz wurde entsprechend AAV 1 weiterverarbeitet und analysiert. Bei dem anderen Ansatz wurde eine GPC-Fraktionierung eingefügt (vgl. AAV 2). Beide Ansätze wurden sowohl mit ESI-LC-MS/MS als auch mit APCI-LC-MS/MS analysiert und die Wiederfindungen berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

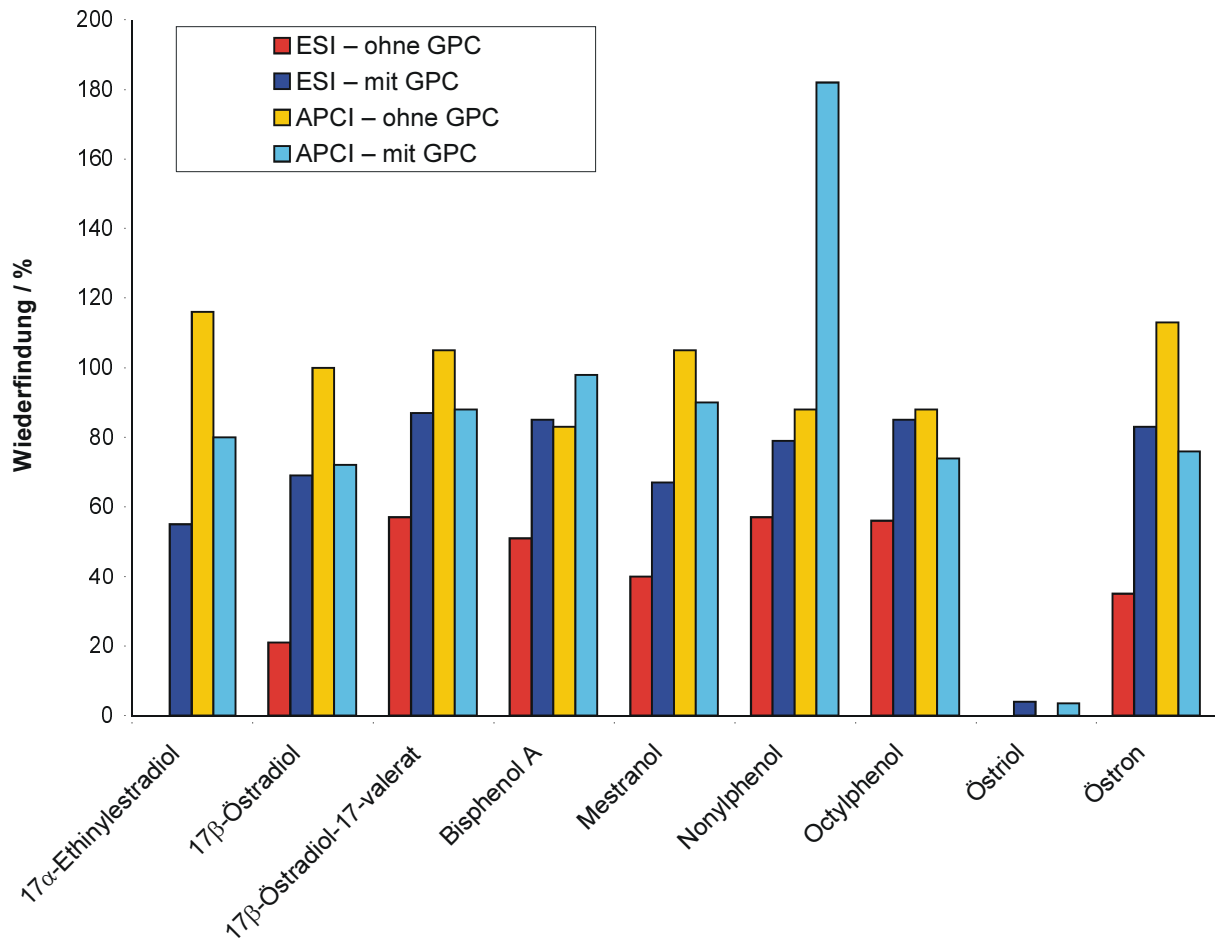


Abbildung 4.2: Wiederfindung über das Gesamtverfahren mit und ohne "vorgesaltete" GPC-Reinigung im Vergleich.

Tabelle 4.4: Tabellarische Zusammenfassung der in Abbildung 4.2 dargestellten Ergebnisse.

	ESI – ohne GPC	ESI – mit GPC	APCI – ohne GPC	APCI – mit GPC
17 $\beta$ -Östradiol	21	69	100	72
17 $\beta$ -Östradiol-17-valerat	57	87	105	88
Nonylphenol	57	79	88	182
4-Octylphenol	56	85	88	74
Bisphenol A	36	65	83	73
Mestranol	40	67	105	90
Östriol	n.b.	4	n.b.	3,5
Östron	35	83	113	76

n.b.: nicht bestimmbar

Aus Abbildung 4.2 ist erkennbar, dass die Wiederfindungen über das Gesamtverfahren bei ESI-LC-MS/MS nach der Reinigung mit GPC größer waren. Durch das Entfernen der Matrix entfiel die Signalsuppression durch die Matrixkomponenten und es resultierten höhere Wiederfindungen. Bei APCI-LC-MS/MS waren die Wiederfindungen über das Gesamtverfahren in der Regel kleiner, nachdem die Reinigung mit GPC erfolgt war. Auch dies ist mit der Entfernung der Matrix zu erklären, da der Matrixeffekt bei APCI das Signal erhöhte. Wegen der Verbesserung der Wiederfindungen wurde die Probenvorbereitung um den Reinigungsschritt mit GPC nach AAV 2 erweitert. Die Extraktionsausbeute für Östriol war auch nach der GPC-Reinigung sehr niedrig. Die Anreicherung mit Dichlormethan funktionierte nicht für Östriol. Daher wurde im Folgenden das Östriol bei der Auswertung der chemischen Analyse außen vor gelassen.

## 4.2 Leistungsparameter des chemisch-analytischen Verfahrens

### 4.2.1 Identifizierung

Die Identifizierung der 'target-Analyten' erfolgte über spezifische Ionenübergänge von "Mutter-Ion" zu "Tochter-Ion". Weiterhin wurde zur Absicherung, außer für Mestranol und 4-Octylphenol, ein weiterer Ionenübergang gemessen. Das Verhältnis der Peakhöhen dieser Ionenübergänge zueinander wurde ebenfalls als Spezifitäts-Kriterium gewählt (vgl. Tabelle 7.4). Darüber hinaus war die Retentionszeit entscheidend (vgl. Tabelle 7.2). Als letztes Kriterium, ob ein Analyt nachgewiesen oder bestimmt war, fungierten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (vgl. Tabelle 4.7).

## 4.2.2 Quantifizierung

### 4.2.2.1 Externe Kalibrierung

Anhand von Bisphenol A ist die externe Kalibrierung in Abbildung 4.3 dargestellt. Es wurde jeweils vor und nach der Analyse der Proben kalibriert, um eine mögliche Veränderung in der Empfindlichkeit des Massenspektrometers berücksichtigen zu können. Sofern sich diese zwei Kalibrierungen nicht entscheidend unterschieden, wurde eine gemeinsame gemittelte Kalibriergerade aus beiden Kalibrierungen erstellt. Die Funktion dieser gemeinsamen Geraden wurde zur Auswertung der Probenergebnisse benutzt. Da der Achsenabschnitt dieser Ausgleichsgeraden vernachlässigbar klein war, wurde der Koordinatenursprung als fester Stützpunkt gewählt; hierdurch wurde der Korrelationskoeffizient der Funktion nicht beeinflusst.

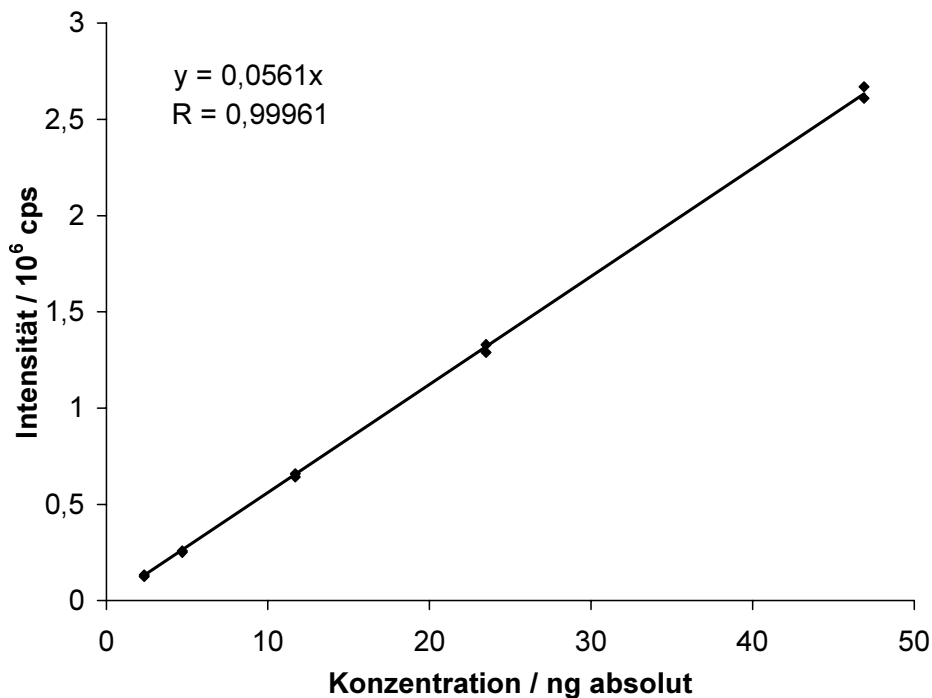


Abbildung 4.3: Kalibriergerade einer externen Kalibrierung, am Beispiel Bisphenol A.

Der lineare Verlauf der externen Kalibrierung wurde für die verwendeten Analyte über drei Größenordnungen zwischen 0,1 ng absolut und 100 ng absolut überprüft. Die Standardlösung wurde in 11 Schritten jeweils um den Faktor zwei verdünnt. (Die Konzentrationen der benutzten Stammlösungen sind in Anhang 1 angegeben.) In Tabelle 4.5 sind der genaue Konzentrationsbereich, die Steigung der Kalibriergeraden und der Korrelationskoeffizient R für die einzelnen Analyte aufgeführt.

Tabelle 4.5: Darstellung der Linearität bei externer Kalibrierung.

	Konzentrationsbereich / ng absolut	Steigung / (cps / ng absolut)	Korrelations- koeffizient R
17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	0,09–94	5922	0,99871
17 $\beta$ -Östradiol	0,10–97	5454	0,99926
17 $\beta$ -Östradiol-17-valerat	0,09–96	40173	0,99587
Nonylphenol	0,09–93	59607	0,99942
4-Octylphenol	0,09–96	14918	0,99958
Bisphenol A	0,09–95	66846	0,99992
Mestranol	0,09–93	56348	0,99887
Östron	0,09–97	70784	0,99966

#### 4.2.2.2 Standardadditionsverfahren

Um zu überprüfen, ob die Linearität der Messung für reale, Matrix enthaltende, Proben erhalten bleibt, wurde eine Probe von Kläranlagen-Abwasser mit vier verschiedenen Konzentrationen eines Standard-Gemisches nach AAV 1 (ohne GPC) angereichert. Als Beispiel ist in Abbildung 4.4 die Kalibriergerade für Östron gezeigt. Der Schnittpunkt mit der Abszisse ergab die Analyt-Konzentration von 0,14 ng absolut. Für diese Kläranlagen-Probe wurde ebenfalls eine externe Kalibrierung durchgeführt, welche zu einem Ergebnis von 0,13 ng absolut führte. Weiterhin konnte Bisphenol A bestimmt werden: Die externe Kalibrierung ergab 1,9 ng absolut und das Standardadditionsverfahren 10,4 ng absolut. Nonylphenol wurde mit der externen Kalibrierung auf 7,2 ng absolut und mit dem Standardadditionsverfahren auf 13,9 ng absolut quantifiziert. Die Abweichungen zwischen den Ergebnissen aus externer Kalibrierung und dem Standardadditionsverfahren sind auf die Einflüsse der Matrix zurückzuführen, die bei der externen Kalibrierung zum Tragen kommen.

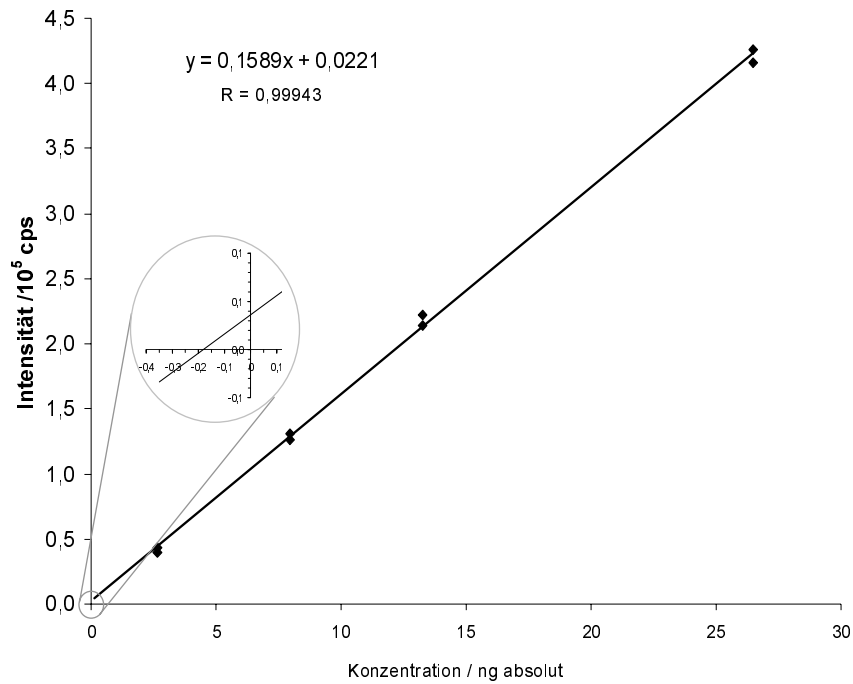


Abbildung 4.4: Kalibriergerade für das Standardadditionsverfahren, am Beispiel des Östron.

Auch in der matrixbeladenen, realen Probe von Kläranlagen-Abwasser konnte im Bereich von 30–300 ng/L die Linearität der Detektionsmethode festgestellt werden (vgl. Tabelle 4.6). Die Bestimmungsgrenzen für die einzelnen Analyte liegen jedoch teilweise 10–20 ng/L niedriger als der in Realproben getestete Messbereich.

Tabelle 4.6: Darstellung der Linearität beim Standardadditionsverfahren in Kläranlagen-Abwasser.

	Konzentrationsbereich / ng/L	Steigung / (cps / ng absolut)	Korrelationskoeffizient R
17β-Östradiol	31 - 310	644,14	0,99680
17β-Östradiol-17-valerat	31 - 315	86053	0,99921
Nonylphenol	32 - 325	25792	0,99299
4-Octylphenol	31 - 310	9019,9	0,99508
Bisphenol A	31 - 310	15227	0,99874
Östron	35 - 350	15893	0,99943

#### 4.2.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen für die in Tabelle 4.7 angegebenen Analyte, wurden ermittelt, indem aus dem Chromatogramm der jeweils intensivste Ionenübergang des Analyten extrahiert und daraus das durchschnittliche Rauschen ermittelt wurde. Als Nachweisgrenze wurde ein Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) von drei definiert [FLEMING ET AL. 1997] und als Bestimmungsgrenze eines von zehn [CROLEY ET AL.

2000, MEYER 1999]. Die Werte, die aus Chromatogrammen von Standardlösungen ermittelt wurden, entsprechen einer instrumentellen Nachweisgrenze. Um aber die Nachweis- bzw. die Bestimmungsgrenze für das ganze Verfahren zu kennen, müssen Chromatogramme von Aufstockversuchen in der untersuchten Matrix verwendet werden. Die oben beschriebenen Grenzwerte wurden für die Kläranlagenproben ermittelt, indem ein Volumen von 1,5 L nach AAV 1 aufgearbeitet und vor dem Extraktionsverfahren mit einer definierten Menge an Standardlösung aufgestockt wurde. Die Aufkonzentrierung in der gesamten Aufarbeitung betrug 1:7500. Die Matrix-Abtrennung durch GPC-Vorbehandlung ist in diesen Angaben nicht berücksichtigt. Bei Proben, die mit GPC behandelt wurden, sind Nachweis- und Bestimmungsgrenzen niedriger.

Tabelle 4.7: Nachweis- (S/N = 3) und Bestimmungsgrenzen (S/N = 10) mit ESI-LC-MS/MS aus Standard-Lösung (instrumentelle Grenzen) und aus aufgestockten Kläranlagen-Proben (für das gesamte Verfahren, ohne GPC).

	Nachweisgrenze / (ng/L)		Bestimmungsgrenze / (ng/L)	
	instrumentell	Gesamtverfahren	instrumentell	Gesamtverfahren
17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	0,9	– <sup>a</sup>	3,0	– <sup>a</sup>
17 $\beta$ -Östradiol	0,6	7	2,0	24
17 $\beta$ -Östradiol-17-valerat	0,2	3	0,7	9
Bisphenol A	1,0	2	3,4	6
Mestranol	0,8	15	2,6	49
Nonylphenol	2,6	10	9,0	33
4-Octylphenol	0,2	2	0,7	6
Östron	0,1	1	0,5	4

<sup>a</sup> Co-elution mit Matrixkomponenten

### 4.3 Adaptation des Hefetests

#### 4.3.1 Vergleich der Lösungsmittel Ethanol und Methanol

SUMPTER UND ROUTLEDGE (1996) nutzten ausschließlich in Ethanol gelöste Standards. DESBROW ET AL. (1998) benutzten in ihrer BDCA dagegen in Methanol gelöste Extrakte, um den Hefetest durchzuführen. Um den Hefetest in eine BDCA einzugliedern, schien es vorteilhaft zu sein, den Test in methanolischen Lösungen durchzuführen. Bei einer Elution der Analyte mit einem Methanol-Wasser-Gradienten in der Umkehrphasen-Flüssigchromatographie, könnten die identischen Extrakte sowohl im Biotest als auch in der chemischen Analyse eingesetzt werden. Daher wurden Experimente zur Frage durchgeführt, inwieweit sich die Testergebnisse von methanolischen Standardlösungen von denen ethanolischer Lösungen unterscheiden.



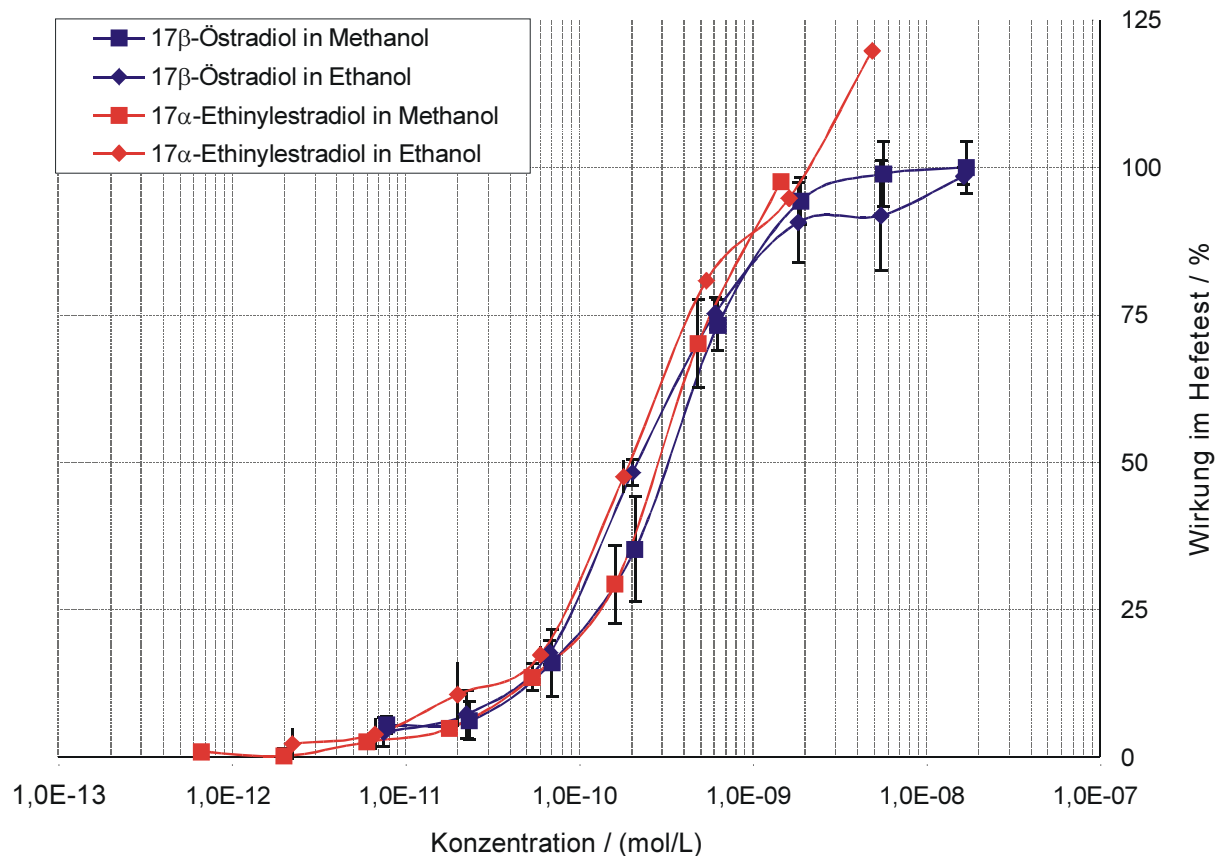


Abbildung 4.5: Einfluss des Lösungsmittels im Hefetest am Beispiel der Substanzen 17β-Östradiol und 17α-Ethinylestradiol.

Der Vergleich der beiden Lösungsmittel ergab, dass sich Methanol als Lösungsmittel im Hefetest nur geringfügig von Ethanol unterschied (vgl. Abbildung 4.5). Der  $EC_{50}$ -Wert der in Methanol gelösten Substanzen 17β-Östradiol und 17α-Ethinylestradiol lag um einen Faktor 1,5 über dem entsprechenden Werten der in Ethanol gelösten Analyte. Dieser Wert liegt aber noch im Schwankungsbereich des  $EC_{50}$ -Werts von 17β-Östradiol in Methanol aus Tests, die an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden (vgl. Anhang 2).

In den weiteren Versuchen wurde Methanol als Lösungsmittel im Hefetest verwendet, und es wurden Aliquote der gleichen Extrakte benutzt, die mit LC-MS/MS untersucht wurden (vgl. AAV 1).

#### 4.3.2 Untersuchungen zur Probenaufgabe

Zur Durchführung des Hefetests, wurde das Lösungsmittel jeweils vollständig durch Verdunstung entfernt. Dabei stellte sich die Frage, ob es beim Verdunsten Verluste bei den Analyten gab. Eine Möglichkeit dies zu verhindern, ist das Verwenden eines sogenannten 'Keepers' (Halter), eines schwerflüchtigen Lösungsmittels, das keine negativen Auswirkungen auf den Hefetest hat. Um dies zu testen, wurde der dreiwertige Alkohol Glycerin gewählt. Da die Hefe in 15 % (v/v) Glycerin enthaltendem Nährmedium bei -18 °C aufbewahrt wird,

wurde davon ausgegangen, dass Glycerin keine negativen Auswirkungen auf die Hefekulturen ausübt. Wie in Abbildung 4.6 dargestellt ist, verminderte Glycerin jedoch die Empfindlichkeit des Hefetests (bezogen auf den  $EC_{50}$ -Wert). Der  $EC_{50}$ -Wert von  $17\beta$ -Östradiol stieg um den Faktor 3, welcher signifikant ist in Bezug auf den Mittelwert der  $EC_{50}$ -Werte der Positivkontrolle  $17\beta$ -Östradiol (vgl. Anhang 2). Diese Experimente zeigten, dass Glycerin tatsächlich keine weiteren negativen Einflüsse auf den Hefetest hatte, denn der Blindwert aus Methanol und Glycerin war niedriger als der Blindwert von reinem Methanol. Da jedoch die Empfindlichkeit sank, wurde auf die Zugabe eines 'Keepers' verzichtet, und die weiteren Tests wurden mit Methanol als Lösungsmittel durchgeführt.

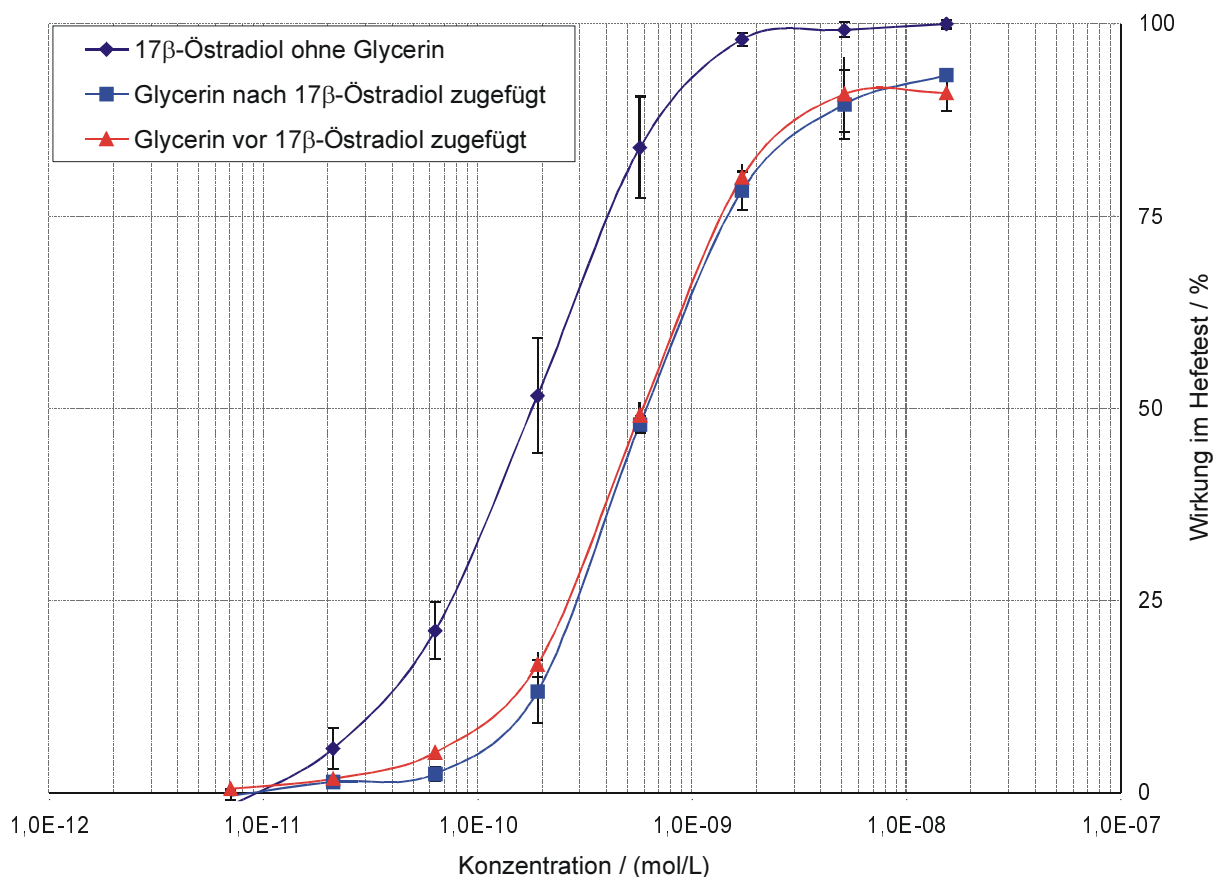


Abbildung 4.6: Darstellung der Wirkung von Glycerin als 'Keeper' im Hefetest.

#### 4.3.3 Nachweisgrenzen im Hefetest

Die Nachweisgrenze für eine östrogene Wirkung einer Probe in diesem Hefetest wurde willkürlich auf einen Wert von 10 % Wirkung festgelegt. Ab dieser Grenze war es möglich, eine qualitative Aussage zu formulieren. Dazu wurde die Konzentration bei 10 % Wirkung bestimmt; im Gegensatz zur Bestimmung der  $EC_{50}$ -Werte im nachfolgenden Kapitel wurden diese Konzentrationen nicht auf 10 % der Wirkung von  $17\beta$ -Östradiol, sondern auf 10 % der

maximalen Wirkung der jeweiligen Substanz bezogen. Die in Tabelle 4.8 angegebenen Werte beziehen sich auf eine Anreicherung einer Probe um 1:7500, ausgehend von einem Volumen von 1,5 L nach AAV 1. Mögliche Verluste während der Anreicherung wurden bei diesen Werten nicht berücksichtigt.

Tabelle 4.8: Die Nachweisgrenzen im Hefetest in der Übersicht.

	Konzentration bei 10%iger Wirkung / (mol/L) <sup>a</sup>	Konzentration in der Realprobe / (ng/L)
17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	1,6·10 <sup>-10</sup>	0,1
17 $\beta$ -Östradiol	1,2·10 <sup>-10</sup>	0,1
17 $\beta$ -Östradiol-17-valerat <sup>b</sup>	2,4·10 <sup>-9</sup>	2,3
Nonylphenol	1,5·10 <sup>-6</sup>	880
4-Octylphenol	1,5·10 <sup>-6</sup>	825
Bisphenol A	1,3·10 <sup>-6</sup>	790
Mestranol	7,1·10 <sup>-9</sup>	6
Östriol	2,0·10 <sup>-8</sup>	15
Östron	4,1·10 <sup>-10</sup>	0,3

<sup>a</sup> Konzentrationen entsprechen der Konzentration in 200  $\mu$ L Medium auf der Mikrotiterplatte

<sup>b</sup> hier wurde die Wirkungsschwelle bei 15%iger Wirkung festgelegt, da die Dosis-Wirkungskurve vorher nicht in den steilen Bereich übergegangen war.

#### 4.3.4 Dosis-Wirkungs-Kurven

In Abbildung 4.7 sind die Dosis-Wirkungs-Kurven für die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen dargestellt (siehe auch Referenz [HEISTERKAMP 2000; HEISTERKAMP 2001]). Es ist erkennbar, dass sie in diesem Test in sehr unterschiedlichen Konzentrationsbereichen östrogen wirken. Nonylphenol und 4-Octylphenol wirken darüber hinaus bei vergleichsweise hohen Konzentrationen zelltoxisch auf die Hefezellen und erreichen dadurch nicht die maximale Extinktion von 17 $\beta$ -Östradiol.

In Tabelle 4.9 sind die Effektkonzentrationen bei 50 % und bei 20 % angegeben. Diese Werte wurden im Vergleich zur entsprechenden Wirkung von 17 $\beta$ -Östradiol ermittelt (vgl. 3.5.2, S. 39). Weiterhin sind die Östradioläquivalenzfaktoren (EEF) sowohl aus den EC<sub>50</sub>- als auch aus den EC<sub>20</sub>-Werten aufgelistet. Da 4-Octylphenol mit seiner maximalen, nicht toxisch wirkenden Konzentration nicht die 50%-Wirkung von 17 $\beta$ -Östradiol erreichte, wird für diese Substanz nur der EC<sub>20</sub>-Wert angegeben.

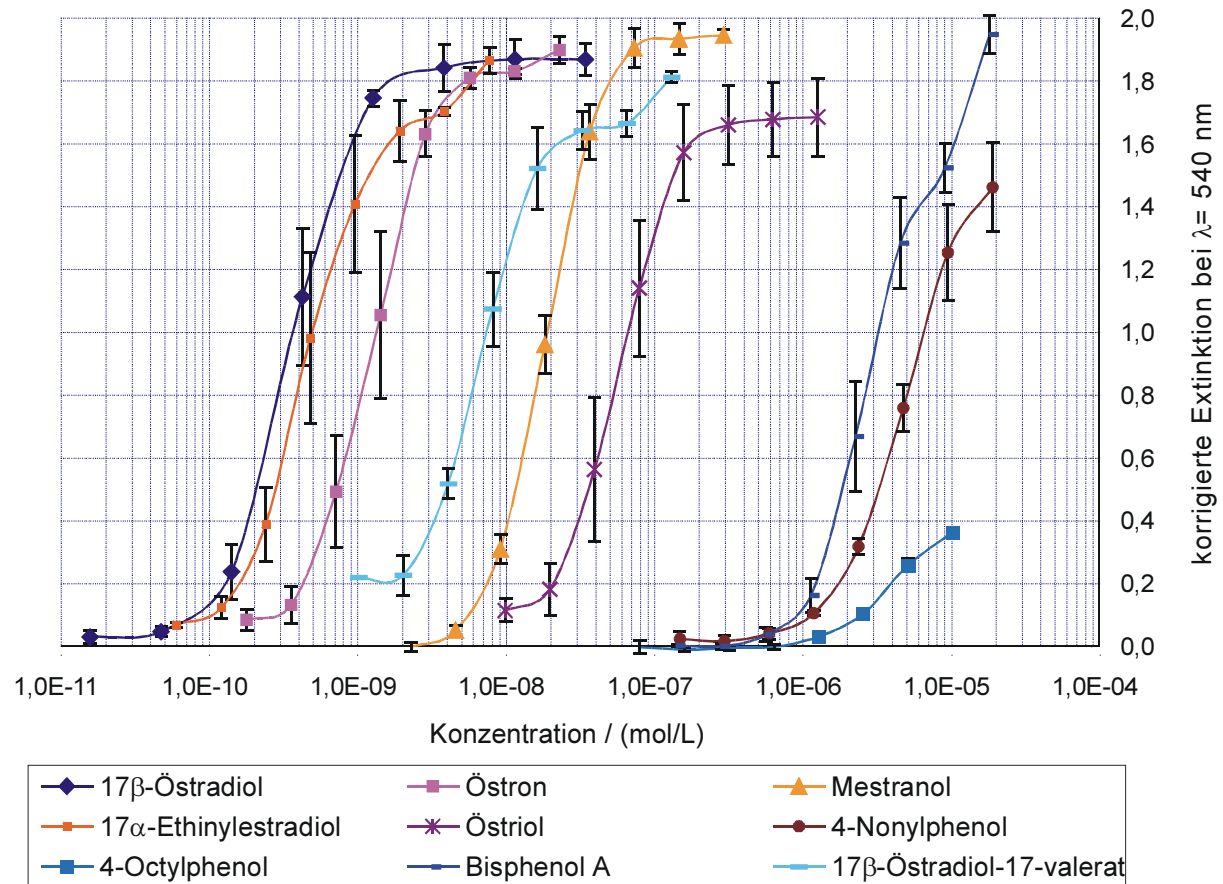


Abbildung 4.7: Dosis-Wirkungs-Kurven für die im Hefetest untersuchten Analyte; die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen bei  $n = 4$ .

Tabelle 4.9: Potenz der Analyte im Hefetest; angegeben sind sowohl die  $EC_{20}$ -Werte als auch die  $EC_{50}$ -Werte der Analyte und die Verhältnisse aus den EC-Werten von 17 $\beta$ -Östradiol und dem der Testsubstanz (EEF).

Analyt	$EC_{20}$ -Werte / (mol/L)	EEF aus $EC_{20}$	$EC_{50}$ -Werte / (mol/L)	EEF aus $EC_{50}$
17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	$2,4 \cdot 10^{-10}$	$7,1 \cdot 10^{-1}$	$4,5 \cdot 10^{-10}$	$7,6 \cdot 10^{-1}$
17 $\beta$ -Östradiol	$1,7 \cdot 10^{-10}$	1	$3,5 \cdot 10^{-10}$	1
17 $\beta$ -Östradiol-17-valerat	$3,2 \cdot 10^{-9}$	$2,7 \cdot 10^{-2}$	$7,0 \cdot 10^{-9}$	$2,6 \cdot 10^{-2}$
Nonylphenol	$2,8 \cdot 10^{-6}$	$8,2 \cdot 10^{-5}$	$6,0 \cdot 10^{-6}$	$8,3 \cdot 10^{-5}$
4-Octylphenol	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$2,0 \cdot 10^{-5}$	n.b.	n.b.
Bisphenol A	$1,7 \cdot 10^{-6}$	$4,4 \cdot 10^{-5}$	$3,2 \cdot 10^{-6}$	$5,0 \cdot 10^{-5}$
Mestranol	$1,9 \cdot 10^{-8}$	$1,9 \cdot 10^{-2}$	$2,0 \cdot 10^{-8}$	$1,8 \cdot 10^{-2}$
Östriol	$3,0 \cdot 10^{-8}$	$8,3 \cdot 10^{-3}$	$5,6 \cdot 10^{-8}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$
Östron	$6,0 \cdot 10^{-10}$	$2,8 \cdot 10^{-1}$	$1,4 \cdot 10^{-9}$	$2,1 \cdot 10^{-1}$

n.b.: nicht bestimmbar

In Tabelle 4.10 sind die in dieser Arbeit ermittelten  $EC_{50}$ -Werte denen von WENZEL UND SCHMITZ (1998) gegenübergestellt, die mit dem gleichen Hefestamm und dem gleichen Biotest arbeiteten. Die Werte stimmen gut miteinander überein: Der  $EC_{50}$ -Wert von  $17\beta$ -Östradiol ist derselbe und bei den anderen Substanzen liegt er in derselben Größenordnung.

Tabelle 4.10: Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten  $EC_{50}$ -Werte mit denen von WENZEL UND SCHMITZ (1998).

Analyt	$EC_{50}$ -Werte / (mol/L)	
	aus dieser Arbeit	aus [WENZEL UND SCHMITZ 1998]
$17\alpha$ -Ethinylestradiol	$4,5 \cdot 10^{-10}$	$1,6 \cdot 10^{-10}$
$17\beta$ -Östradiol	$3,5 \cdot 10^{-10}$	$3,5 \cdot 10^{-10}$
$17\beta$ -Östradiol-17-valerat	$7,0 \cdot 10^{-9}$	–
Nonylphenol	$6,0 \cdot 10^{-6}$	$9,0 \cdot 10^{-6}$
4-Octylphenol	–	$5,0 \cdot 10^{-5}$
Bisphenol A	$3,2 \cdot 10^{-6}$	$7,7 \cdot 10^{-6}$
Mestranol	$2,0 \cdot 10^{-8}$	$2,3 \cdot 10^{-8}$
Östriol	$5,6 \cdot 10^{-8}$	$5,7 \cdot 10^{-8}$
Östron	$1,4 \cdot 10^{-9}$	$5,5 \cdot 10^{-10}$

Die östrogene Wirksamkeit der ausgewählten Analyte im Hefetest verteilte sich über den Konzentrationsbereich zwischen  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L bis  $1 \cdot 10^{-10}$  mol/L. Dabei besaßen die natürlichen und synthetischen Östrogene eine Potenz, die um bis zu zwei Größenordnungen schwächer war, als die von  $17\beta$ -Östradiol. Die ausgewählten Xenoöstrogene dagegen waren um bis zu vier Größenordnungen schwächer östrogen wirksam als  $17\beta$ -Östradiol.

#### 4.3.5 Antiöstrogene Wirkung

Substanzen besitzen eine antiöstrogene Wirkung, wenn sie in der Lage sind, die Wirkung von Östrogenen zu unterdrücken oder zu hemmen. Tamoxifen, das zur Behandlung gegen Brustkrebs eingesetzt wird, ist eine solche Substanz. Es ist jedoch nicht nur in der Lage, die Wirkung von  $17\beta$ -Östradiol zu unterdrücken, sondern es wirkt teilweise selbst als Agonist, d.h., es kann selber östrogene Wirkung auslösen [ROUTLEDGE UND SUMPTER 1997]. Das partiell agonistische Wirken von Tamoxifen ist zellspezifisch und ist auf unterschiedliche Bindungsstellen an den Rezeptor-Proteinen zurückzuführen [NAVAS UND SEGNER 1998, GRAUMANN UND JUNGBAUER 2000, PARKER 1993].

Um die antiöstrogene Wirkung von Tamoxifen im Hefetest zu untersuchen, wurden die Hefezellen in einer ersten Versuchsreihe gleichzeitig Tamoxifen in einer Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 und  $17\beta$ -Östradiol der Konzentration  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/L exponiert ( $17\beta$ -Östradiol mit  $c = 1 \cdot 10^{-7}$  mol/L erzeugte im Hefetest eine maximale Wirkung). In einer weiteren Versuchsreihe wurde die gleiche Anordnung mit  $17\beta$ -Östradiol der Konzentration  $1 \cdot 10^{-9}$  mol/L

durchgeführt, welches eine halbmaximale Wirkung erreicht. Von allen Substanzen wurden jeweils 10  $\mu\text{L}$  eingesetzt. Die gelben Säulen in Abbildung 4.8 zeigen die Wirkung von Tamoxifen in unterschiedlichen Konzentrationen ohne weitere Zusätze. Es ist zu sehen, dass Tamoxifen in bestimmten Konzentrationen agonistisch wirkte, d.h. entsprechend einem natürlichen Hormon: Im Konzentrationsbereich von 10 nmol/L bis 1  $\mu\text{mol/L}$  besitzt Tamoxifen ein östrogenes Potenzial, welches eine Wirkung von bis zu 37 % der maximalen Wirkung von  $17\beta$ -Östradiol erreicht. In höheren Konzentrationen nimmt die Wirkung ab; bei einer Konzentration von 0,1 mmol/L wirkt Tamoxifen zelltoxisch auf die Hefe. Die rote gestrichelte Linie in der Abbildung gibt die Wirkung wieder, die  $17\beta$ -Östradiol der Konzentration  $1 \cdot 10^{-9}$  mol/L allein erreichen würde. Die roten Säulen stellen die erreichte Wirkung von  $17\beta$ -Östradiol der Konzentration  $1 \cdot 10^{-9}$  mol/L gemeinsam mit Tamoxifen in unterschiedlichen Konzentrationen dar. Die Wirkung von  $17\beta$ -Östradiol ( $c = 1 \cdot 10^{-9}$  mol/L) wurde durch Tamoxifen nicht gehemmt. Im Gegenteil, sie wurde teilweise sogar größer. Die gestrichelte blaue Linie spiegelt das Ausmaß der Wirkung von  $17\beta$ -Östradiol der Konzentration  $1 \cdot 10^{-7}$  mol/L wieder; die blauen Säulen geben die Wirkung der gleichen Konzentration  $17\beta$ -Östradiol gemeinsam mit Tamoxifen in verschiedenen Konzentrationen wieder. Diese hohe Konzentration von  $17\beta$ -Östradiol wurde durch die Zugabe von Tamoxifen ( $> 0,1$  nmol/L) um durchschnittlich ca. 20 % gehemmt.

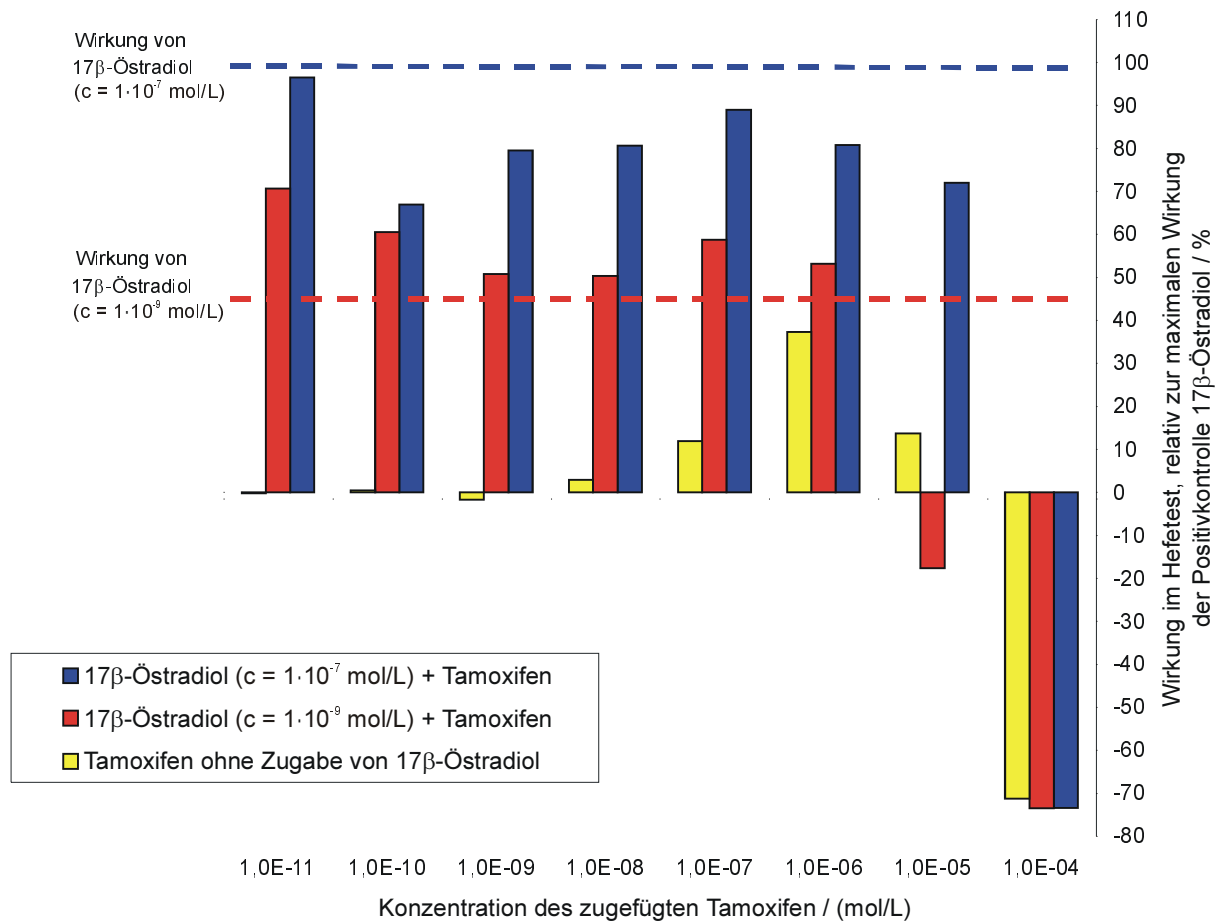


Abbildung 4.8: Einfluss von Tamoxifen auf die Wirkung von 17β-Östradiol im Hefetest.

Die Wirkung von Tamoxifen im Hefetest war nicht eindeutig. Die Hemmung der östrogenen Wirkung von 17β-Östradiol konnte nicht mit der Konzentration von Tamoxifen korreliert werden. Das gleiche galt für die Verstärkung der Wirkung von 17β-Östradiol der Konzentration 1·10<sup>-9</sup> mol/L. Die Verstärkung konnte ebenfalls nicht mit einer additiven Wirkung von 17β-Östradiol und Tamoxifen erklärt werden.

## 4.4 Realproben

### 4.4.1 Untersuchte Proben und Messunsicherheit der Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Analysen-Ergebnisse von vier unterschiedlichen Proben aus dem Ablauf der Kläranlage Köhlbrandhöft-Dradenau, einer Probe aus dem Elbe-Nebenfluss Bilina und eine Elbewasserprobe aus der Abwasserfahne der tschechischen Chemiefabrik Synthestia vorgestellt. Die Extraktionen erfolgten jeweils nach AAV 1. Unterschiede in Probenmenge, Aufkonzentrierung und Einsatz der GPC sind in Tabelle 7.6 zusammengefasst. Wurde eine Matrix-Abtrennung mit GPC durchgeführt, erfolgte dies nach AAV 2. Die Detektion mit LC-MS/MS wurde mit den in AAV 4 und AAV 5 dargestellten

Methoden durchgeführt und die Arbeitsschritte des verwendeten Hefetest sind in AAV 3 detailliert beschrieben. In Anhang 4 A ist ein Chromatogramm für eine Standardlösung dargestellt. In Abschnitt 4.4.4 werden die Ergebnisse dieses Kapitels zusammenfassend diskutiert.

Für die Messunsicherheit der in diesem Abschnitt angegebenen Analyseergebnisse wurde eine grobe Abschätzung vorgenommen. Die größte Unsicherheit dieser Werte liegt in den Schwankungen der Wiederfindungen über das Gesamtverfahren. In den in Tabelle 4.3 und Tabelle 4.4 angegebenen Wiederfindungen über das Gesamtverfahren sind systematische Fehler, wie Verluste durch eine unvollständige Abtrennung der Dichlormethan-Phase von der Wasser-Phase und Verluste bei der Aufkonzentrierung der Extrakte, sowie die Matrixeffekte bei der Detektion enthalten. Die unvollständige Wiederfindung im Verfahren stellt insgesamt einen systematischen Fehler dar, durch den die Konzentrationen systematisch verringert wird. Die Wiederfindungen über das Gesamtverfahren wurde nur für einige Proben bestimmt. Aufgrund der unterschiedlichen Matrices der untersuchten Proben ist unsicher, ob die Wiederfindung in allen Proben gleich groß wäre. Aus diesem Grund wurden die Analyse-Ergebnisse nicht hinsichtlich der Wiederfindungen über das Gesamtverfahren korrigiert. Die Fehlerangaben, die gemeinsam mit den Analyseergebnissen angegeben werden, wurden nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz kalkuliert und setzten sich aus Unsicherheiten im Bereich der externen Kalibrierung und aus den Abweichungen der Analyseergebnisse mehrerer Parallel-Extraktionen (die Anzahl  $n$  ist jeweils in den Tabellen angegeben) zusammen. Parameter, die für die Beurteilung der externen Kalibrierung hinzugezogen wurden, waren die Reinheit der Standards, die Wägung, die Verdünnungsschritte beim Erstellen der Standardlösungen, Injektionsvolumen der HPLC, die Steigung der beiden Kalibriergeraden vor und nach den Messungen der Proben. Diese kombinierte Messunsicherheit wurde für die einzelnen Messungen berechnet, da die Steigung der Kalibriergeraden an unterschiedlichen Analyse-Tagen aufgrund verschiedener Geräteeinstellungen nicht zu vergleichen waren und die Matrix der unterschiedlichen Proben ebenfalls differieren konnte.

Über das Vorhandensein von  $17\alpha$ -Ethinylestradiol in den untersuchten Wasserproben konnten keine Aussagen getroffen werden, da es mit der verwendeten Methode nicht auswertbar war. Das lag zum einen an einer Verschiebung der Retentionszeit zu kürzeren Messzeiten in den Realproben im Vergleich zu Standard-Messungen. Weiterhin gab es bei ESI-LC-MS/MS eine Überlagerung mit Fremdstoffen, die bei Anwendung von APCI-LC-MS/MS erkannt wurde. Jedoch konnte auch mit dieser Ionisierungsmethode der Analyt nicht einwandfrei ausgewertet werden. Aus diesen Gründen konnte  $17\alpha$ -Ethinylestradiol nicht quantifiziert werden.

Die Analytik-Ergebnisse, die in den Tabellen der folgenden Abschnitte dargestellt werden, wurden nicht mit der Wiederfindungsrate korrigiert. Aus diesem Grund stimmen die Ergebnisse der Ursprungsextrakte und der Summe der Fraktionen nicht genau überein.



#### 4.4.2 Proben von einem Kläranlagen-Ablauf

In Tabelle 4.11 sind die Ergebnisse der verschiedenen Kläranlagen-Abwasser-Proben aufgelistet.

Tabelle 4.11: Ergebnisse aus den ESI-LC-MS/MS-Analysen des Kläranlagen-Ablaufes.

	BG* / (ng/L)	Konzentration / (ng/L)			
		12.02.2001	29.05.2001	17.07.2001	06.09.2001
Anzahl Parallelproben <i>n</i>		1	3	3	2
Bisphenol A	7	23	18 ± 1	25 ± 2	33 ± 1
Nonylphenol	33	42	110 ± 18	95 ± 11	170 ± 16
Östron	4	< BG	n.n.	< BG	< BG

n.n.: nicht nachweisbar, BG: Bestimmungsgrenze

\* Bestimmungsgrenze ermittelt für 1,5 L Probe, ohne GPC

Zur Ermittlung der Messunsicherheit siehe Anfang des Abschnitts 4.4.1

Der Proben-Extrakt aus 20 L Kläranlagen-Ablauf-Wasser vom 12.02.2001 wurde im Hefetest untersucht. In Abbildung 4.9 stellen die roten Säulen seine Wirkung in Verdünnungsschritten von 1:2 dar. Durch einen Versuch mit Hilfe einer synthetischen Probe wurde versucht, die Ergebnisse bezüglich der Wirkung dieses Proben-Extrakts zu bestätigen. Die synthetische Probe wurde entsprechend der Ergebnisse aus der chemischen Analyse (vgl. Tabelle 4.11) aus Standardlösungen hergestellt und ebenfalls im Hefetest untersucht. Da bei der 20-L-Probe eine viel stärkere Aufkonzentrierung vorgenommen wurde als bei den 1,5 L-Proben, lagen die Bestimmungsgrenzen niedriger, wurden jedoch nicht explizit bestimmt. In die synthetische Probe für die 20-L-Probe wurde neben Bisphenol A und Nonylphenol auch Östron zugefügt (entsprechend einer Konzentration von 1,1 ng/L). Obwohl auch die in der Probe festgestellten Konzentrationen von Bisphenol A und Nonylphenol (vgl. Tabelle 4.11) unterhalb der Nachweisgrenzen des Hefetests (vgl. Tabelle 4.8) liegen, ist die beobachtete Wirkung im Hefetest erklärbar, wenn die stärkere Aufkonzentrierung dieser Probe berücksichtigt wird.

Die Wirkung dieser synthetischen Probe wird in Abbildung 4.9 durch die blauen Säulen dargestellt. Die Kläranlagen-Abwasser-Proben vom 29.05.2001 und vom 17.07.2001 wurden nicht im Hefetest untersucht, da sie im Rahmen der Experimente zu den Matrixeffekten und der GPC-Fraktionierung analysiert wurden.

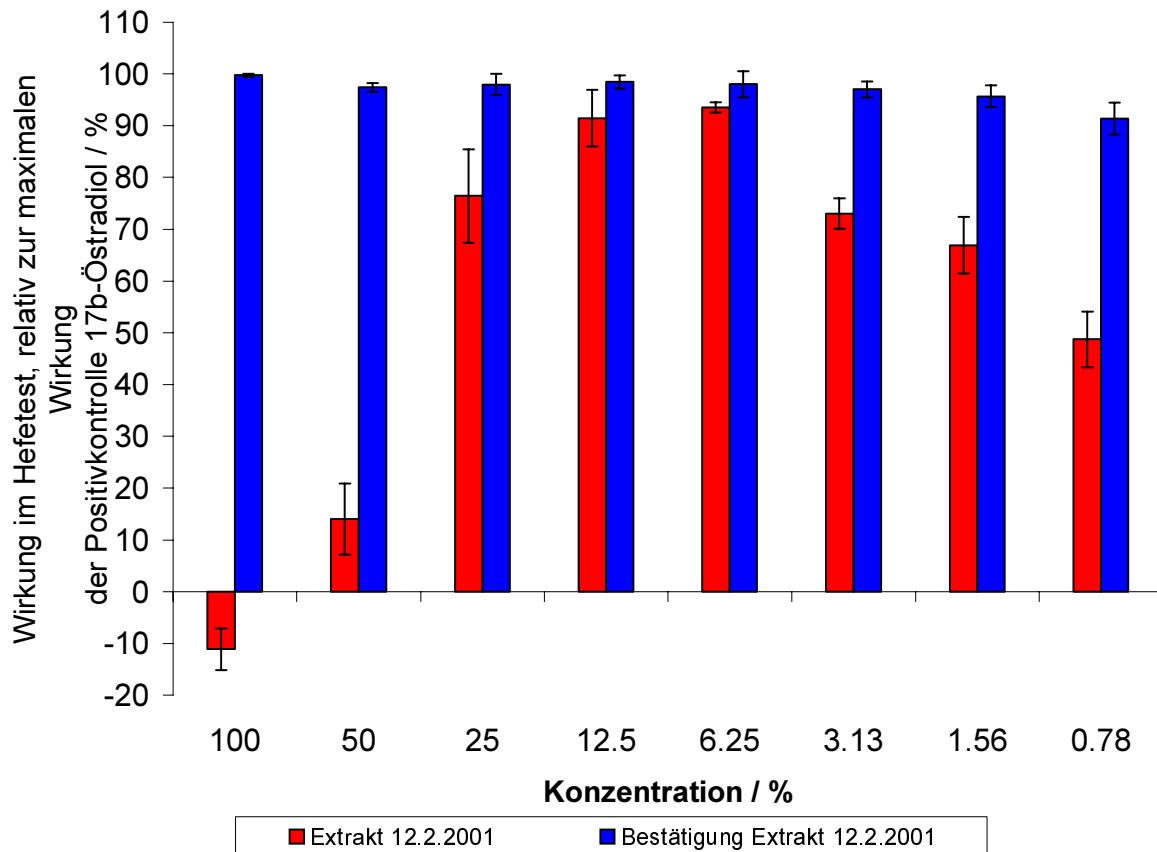


Abbildung 4.9: Ergebnisse des Hefetests für den Kläranlagen-Extrakt vom 12. Februar 2001 (rote Säulen) im Vergleich zu der Bestätigung im Hefetest mit einer synthetischen Probe (blaue Säulen).

Die Beobachtung, dass die Wirkung im Hefetest bei hoher Konzentration im negativen Bereich liegt, bzw. erst langsam ansteigt, ist darauf zurückzuführen, dass die Probe auf die Hefezellen toxisch wirkte. Die synthetische Probe besaß im Vergleich dazu dieses toxische Potenzial nicht. Die synthetische Probe erzeugte weiterhin keine Dosis-Wirkungs-Kurve, sondern alle Verdünnungen hatten eine Wirkung von nahezu 100 %. Es stellte sich daher die Frage, warum die natürliche Probe, eine geringere Wirkung aufwies als die synthetische Probe.

Zur Klärung der Fragen nach den Ursachen für die geringere Wirkung der natürlichen Probe wurden folgende Überlegungen angestellt:

- Zum einen besteht die Möglichkeit, dass Analyte an den Matrixkomponenten gebunden sind und nur geringere Möglichkeiten haben, an den Östrogenrezeptor zu binden.
- Weiterhin könnten die Analyte in der Probe in konjugierter, nicht östrogen wirksamer Form vorliegen. Dafür müssten sie jedoch während der chemischen Analyse so schnell dekonjugiert worden sein, dass sie sich während des Chromatographie-Prozesses wie Standardlösungen verhalten konnten. In diesem Zusammenhang wurde von WEGENER ET AL. (1999) festgestellt, dass Östrogenkonjugate wie Glucuronide oder Sulfate während

der Verweilzeit in Kläranlagen nahezu vollständig dekonjugiert werden. Danach liegen Östrogene im Abfluss der Kläranlage oder in Oberflächengewässern vor allem in dekonjugierter Form vor.

- Eine dritte Erklärung wäre ein antiöstrogenes Potenzial in der Probe, wobei die dafür verantwortlichen Analyte mit der angewandten chemischen 'target-Analyse' nicht erfasst wurden.

Die EEQ-Werte, die jeweils aus den Ergebnissen des Hefetests und der Analytik für diese Probe berechnet wurden (Tabelle 4.13) bestätigen, dass die chemisch-analytischen Ergebnisse (entsprechend der synthetischen Probe) eine höhere Wirkung im Hefetest erwarten lassen können, als tatsächlich bei der Realprobe vorlag. Es fehlt jedoch eine Erklärung für die tatsächlich niedrigere Wirkung der Realprobe im Hefetest.

Parallel zu den nachfolgend vorgestellten Proben aus der Tschechischen Republik (vgl. Abschnitt 4.4.3) wurde eine weitere Probe dieses Kläranlagen-Ablaufes aufgearbeitet. Die Ergebnisse der chemischen Analyse sind in Tabelle 4.12 aufgelistet. In den Anhängen 4 B und C sind Chromatogramme des Ursprungsextraktes und der zweiten Fraktion dargestellt.

Tabelle 4.12: Ergebnisse aus den LC-MS/MS-Analysen des Kläranlagen-Ablaufes vom 6. September 2001 in ng/L.

	BG*	Ursprungs- -extrakt	Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3	Fraktion 4 + 5
Anzahl Parallelproben <i>n</i>		2	2	2	2	2
Bisphenol A	6	33 ± 1	n.n.	40 ± 3	n.n.	n.n.
Nonylphenol	33	170 ± 16	n.n.	185 ± 17	18 ± 2	n.n.
Östron	4	< BG	n.n.	< BG	n.n.	n.n.

< BG: kleiner Bestimmungsgrenze, n.n.: nicht nachweisbar

\* Bestimmungsgrenze ermittelt für 1,5 L Probe, ohne GPC

Zur Ermittlung der Messunsicherheit siehe Anfang des Abschnitts 4.4.1

Sowohl der ursprüngliche Probenextrakt als auch die GPC-Fractionen (vgl. AAV 2) wurden im Hefetest untersucht.

In der Auswertung der folgenden Darstellungen von Hefetest-Ergebnissen fällt auf, dass einige Säulen in den negativen Bereich ragen. Ursachen hierfür sind mathematische Korrekturen wie die Subtraktion der Trübungsextinktion oder die Korrektur mit den Blindwerten (vgl. Abschnitt 3.5.2). So konnten, wenn die Probe toxisch war oder die Extinktionen gegen Null gingen, negative Werte resultieren.

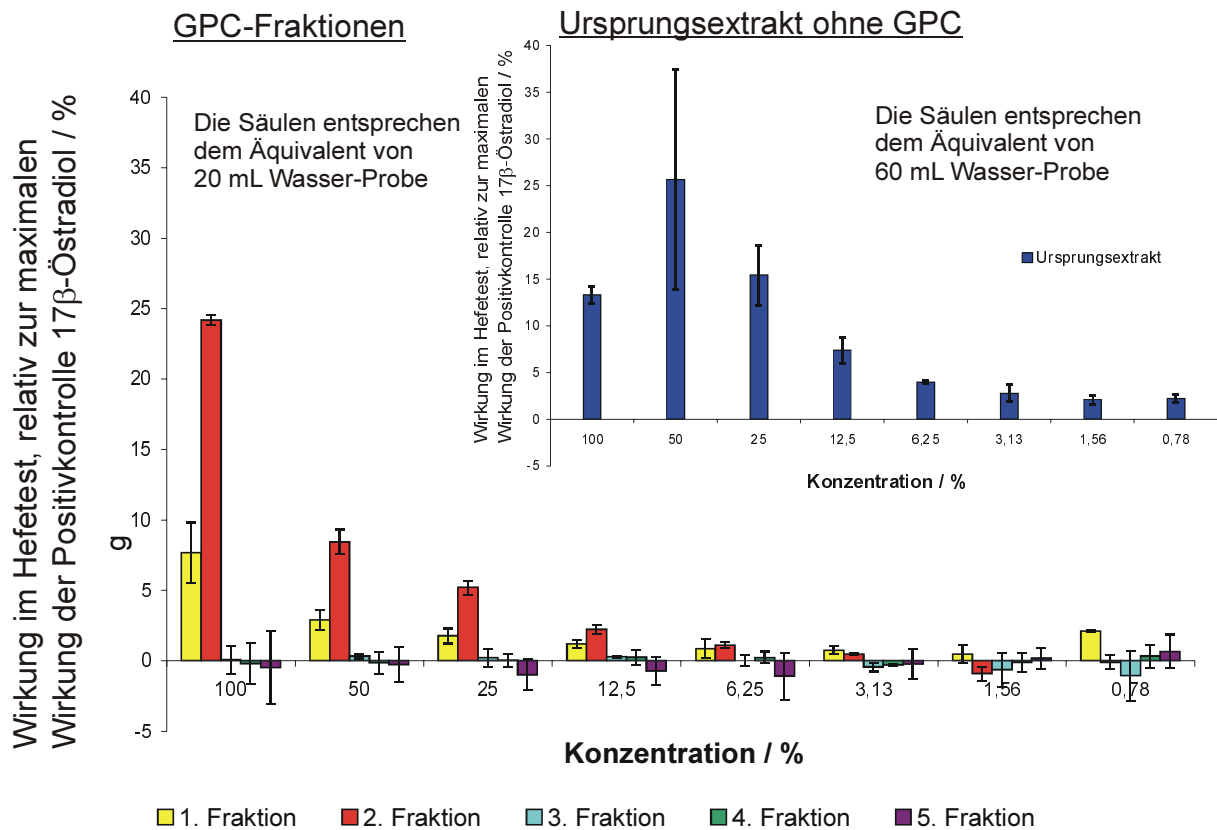


Abbildung 4.10: Ergebnisse des Hefetests der Kläranlagen-Probe vom 6. September 2001.

Abbildung 4.10 zeigt das Ergebnis des Hefetests der Kläranlagen-Probe vom 6. September 2001. Das kleinere Diagramm zeigt die Wirkung im Hefetest des Gesamtextrakts ohne GPC-Reinigung, demgegenüber stellt das große Diagramm die Ergebnisse des Hefetests der fünf GPC-Fractionen dar. Da die Extrakte des Gesamtextrakts und der Fraktionen in unterschiedlicher Weise aufkonzentriert wurden, können sie nicht direkt miteinander verglichen werden. Vor allem der Gesamtextrakt und die zweite Fraktion wiesen ein östrogenes Potenzial auf. Die erste Fraktion zeigte mit dem unverdünnten Extrakt 8 % der Wirkung von 17β-Östradiol und lag damit unterhalb der Nachweisgrenze des Hefetests. Aus Tabelle 4.12 ergibt sich, dass sowohl im Ursprungsextrakt der Kläranlagen-Probe als auch in der zweiten Fraktion zusätzlich zu Bisphenol A und Nonylphenol ebenso Östron nachgewiesen wurde – letzteres jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze von 4 ng/L.

Um den Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des Hefetests und der chemischen Analyse zu bestätigen, wurden entsprechend den Ergebnissen der chemischen Analyse aus Standardlösungen synthetische Proben für die Gesamtprobe und für die zweite Fraktion hergestellt. Obwohl das chemisch-analytische Ergebnis von Östron unterhalb der Bestimmungsgrenze lag, wurde für die Herstellung der synthetischen Proben eine halbquantitative Abschätzung vorgenommen. Die Ergebnisse von Nonylphenol und Bisphenol A lagen jeweils unterhalb der Nachweisgrenzen des Hefetests. Da die reale Probe

eine Wirkung im Hefetest aufwies und Östron, das in der Probe eindeutig nachgewiesen werden konnte, ein starkes östrogenes Potenzial besitzt, wurde es der synthetischen Probe des Ursprungsextrakts zugesetzt (entsprechend einer Konzentration im Wasser von 1,2 ng/L), damit die synthetischen Proben möglichst exakt die natürlichen Proben widerspiegeln konnten. Denn würde das Äquivalent der analytischen Bestimmungsgrenze von 4 ng/L Östron im Hefetest eingesetzt werden, entspräche das  $6,8 \cdot 10^{-9}$  mol/L. Im Vergleich mit Abbildung 4.7 (S. 56) ist zu erkennen, dass diese Konzentration im oberen Bereich der Dosis-Wirkungs-Kurve von Östron liegt. Dies bedeutet, dass Östron bereits unterhalb der mit dieser Methode erreichten Bestimmungsgrenze eine Wirkung im Hefetest erzielt. Dies gilt genauso für andere potente Östrogene.

Die synthetische Probe der zweiten Fraktion enthielt ausschließlich Bisphenol A und Nonylphenol. Hier war eine halbquantitative Abschätzung des Östrons wegen eines zu geringen Signal-Rausch-Verhältnis unmöglich.

Diese synthetischen Proben wurden im Hefetest auf die gleiche Weise untersucht, wie zuvor die Extrakte der Originalproben. Darüber hinaus wurden die synthetischen Proben parallel dazu in Methanol angesetzt, das mit dem Natriumsalz von Huminsäuren übersättigt wurde (es wurde eine 5%ige (m/V) Lösung hergestellt und mit Ultraschall behandelt, wobei sich jedoch nicht die gesamte Huminsäure im Methanol löste). Der Hefetest dieser mit Huminsäure angereicherten, synthetischen Probe verfolgte den Zweck, die Hypothese zu untersuchen, ob Matrixkomponenten die Wirkung der untersuchten Analyte im Hefetest negativ beeinflussen. In Abbildung 4.11 sind die Wirkungen im Hefetest von natürlichem Probeextrakt, synthetischer Probe in reinem Methanol und synthetischer Probe in angereichertem Methanol nebeneinander gestellt.

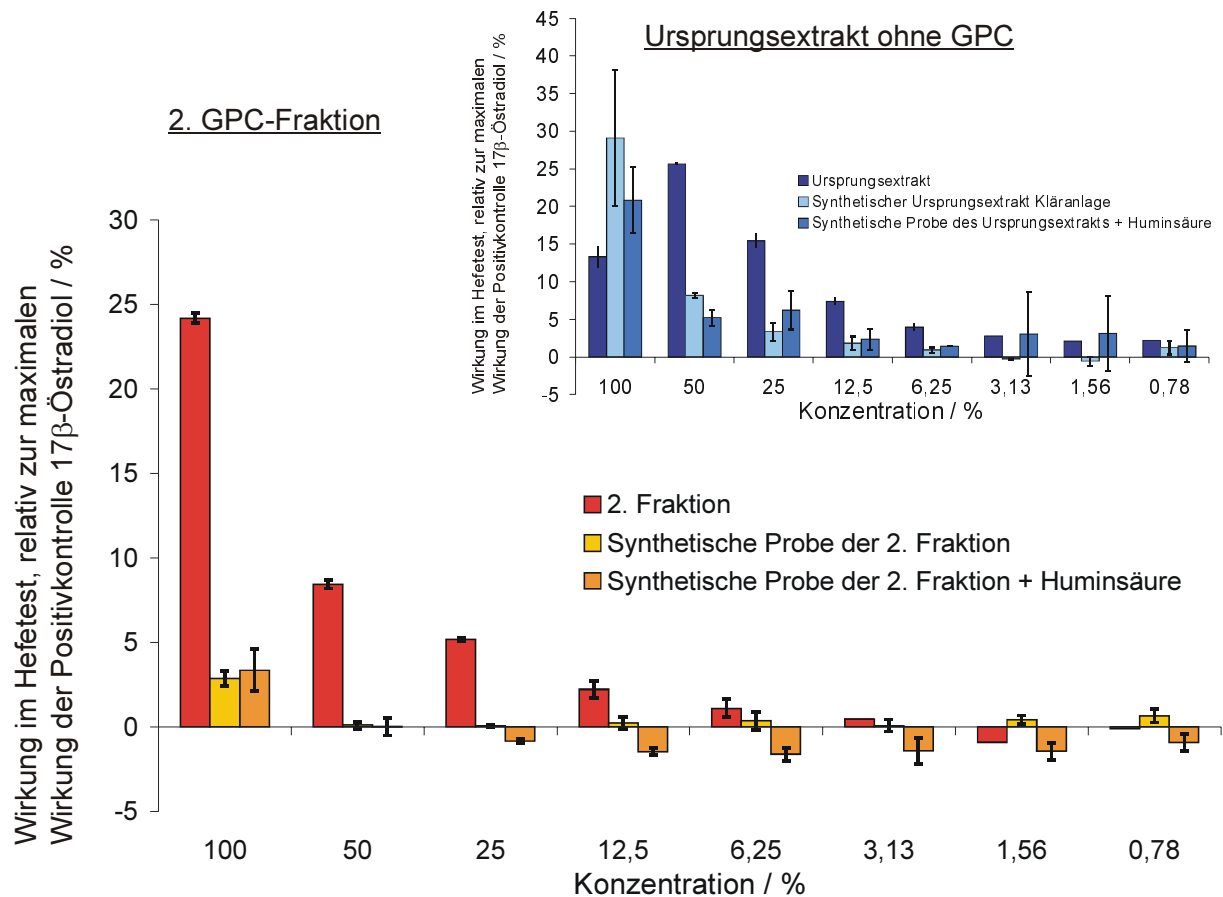


Abbildung 4.11: Die Kläranlagen-Probe im Hefetest; verglichen wird die natürliche Probe sowie deren 2. Fraktion mit in Methanol gelösten, synthetischen Proben (mit und ohne Huminsäure als Matrix). Das kleine Diagramm oben rechts stellt die Ergebnisse des Ursprungsextrakts dar, das große Diagramm unten die der zweiten Fraktion.

Der Ursprungsextrakt wies ein akut toxisches Potenzial auf, welches daran zu erkennen ist, dass die Wirkung im Hefetest zunächst anstieg und die Dosis-Wirkungs-Kurve erst ab 50 % Verdünnung einsetzte. Dieses akut toxische Potenzial konnte bei beiden Ansätzen der synthetischen Probe nicht beobachtet werden (Abbildung 4.11). Die synthetischen Proben zeigten im Rahmen der Schwankungen des Hefetests eine ähnliche Wirkung. Das Ergebnis der mit Huminsäure versetzten, synthetischen Probe war nur geringfügig niedriger als das der synthetischen Probe in Methanol. Sieht man jedoch von der toxischen Wirkung bei 100 % ab, können die synthetischen Proben die Wirkung der Realprobe nicht vollständig bestätigen, obwohl das Östron den synthetischen Proben zugesetzt wurde.

Bei der zweiten Fraktion konnte für die synthetischen Proben nur ein verschwindend geringes östrogenes Potenzial beobachtet werden. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass den synthetischen Proben neben Bisphenol A und Nonylphenol, die in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des Hefetests in den Proben vorlagen, keine weiteren östrogen wirksamen Substanzen zugesetzt wurden. Bei dieser Probe konnte der Bestätigungsversuch das Potenzial der Ausgangsprobe ebenso nicht vollständig erklären.

Die EEQ-Werte aus Tabelle 4.13 zeigen ebenfalls, dass die Ergebnisse der Analytik niedrigere Wirkungen erwarten lassen, als die reale Probe tatsächlich aufwies. Dies untermauert die These, dass weitere Substanzen mit östrogenen Wirkung in den Proben vorhanden gewesen sein müssen, die jedoch mit Hilfe der verwendeten Target-Analytik nicht erfasst wurden.

In der Tabelle 4.13 sind die EC<sub>20</sub>-Werte der verschiedenen, in dieser Arbeit im Hefetest untersuchten Kläranlagenproben und die jeweils dazugehörigen EC<sub>20</sub>-Werte der Positivkontrolle 17β-Östradiol aufgelistet. Daraus wurden die Östradioläquivalente aus Hefetest und chemischer Analytik entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 3.5.2 (Gleichung 3.8) errechnet. Für die Kläranlagen-Probe vom 12.02.2001 wurde statt des EC<sub>20</sub>-Werts der EC<sub>50</sub>-Wert verwendet, da die durchgeführte Verdünnung nicht ausreichend war, um die 20%ige Wirkung zu erreichen. Dieser Extrakt war sehr konzentriert, da eine 20-L-Probe 1:66.666 aufkonzentriert wurde. Daher musste eine starke Verdünnung vorgenommen werden, um in den richtigen Wirkungsbereich des Hefetests zu gelangen. Die Kläranlagen-Probe vom 06.09.2001 dagegen wurde 1:6.000 aufkonzentriert. Die Wirkung dieser Probe war zu niedrig um eine 50%ige Wirkung zu erreichen.

Tabelle 4.13: EC<sub>20</sub>-Werte der Kläranlagenproben, die dazugehörigen EC<sub>20</sub>-Werte für 17β-Östradiol und die entsprechenden Östradioläquivalente.

	EC <sub>20</sub> -Wert (Verdünnungs- faktor)	EC <sub>20</sub> -Wert <sup>b</sup> (17β-Östradiol) / (nmol/L)	EC <sub>20</sub> -Wert <sup>c</sup> (17β-Östradiol) / (ng/L)	EEQ <sub>H</sub> <sup>b</sup> / (nmol/L)	EEQ <sub>H</sub> <sup>c</sup> / (ng/L)	EEQ <sub>A</sub> <sup>c</sup> / (ng/L)
Kläranlage 12.02.2001	6,4 <sup>a</sup>	0,14 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,9 <sup>a</sup>	0,1 <sup>a</sup>	0,32 <sup>a</sup>
Kläranlage 06.09.2001	7,8	0,18	0,16	1,4	1,3	0,35
2. Fraktion Kläranlage 06.09.2001	2,9	0,23	0,6	0,7	1,7	0,02

<sup>a</sup> Bei dieser Probe wurden die Werte aus den EC<sub>50</sub>-Werten ermittelt, da die Probe nicht bis zu 20 % Wirkung verdünnt war.

<sup>b</sup> Diese Werte stellen die Konzentration von 17β-Östradiol auf der Mikrotiterplatte dar.

<sup>c</sup> Diese Werte sind entsprechend der unterschiedlichen Aufkonzentrierungen auf die Konzentration in einer 1-L-Wasserprobe hochgerechnet.

#### 4.4.3 Einleiternahe Oberflächengewässer-Proben

In dem folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse für einleiternahen Oberflächengewässer-Proben (vgl. 3.3) vorgestellt. Diese Proben wurden ebenfalls nach AAV 1 extrahiert, nach AAV 2 einer Fraktionierung mit GPC unterzogen, nach AAV 3 im Hefetest untersucht und nach AAV 4 mit LC-MS/MS untersucht. Die Details der Probenbehandlung sind von diesen Proben ebenfalls in Tabelle 7.6 aufgeführt.

#### 4.4.3.1 Gewässerprobe aus der Bilina

Die Ergebnisse der Bilina-Probe sind in Tabelle 4.14 dargestellt. In den Anhängen 4 B und E sind die Chromatogramme für den Ursprungsextrakt und die zweite Fraktion dargestellt. Der Ursprungsextrakt und die Fraktion 2 mussten vor der Messung 1:10 verdünnt werden, um im Arbeitsbereich zu liegen. In der Tabelle sind für Bisphenol A und Nonylphenol die Ergebnisse aus der verdünnten Analyse angegeben. Der Messwert für Östron lag im unverdünnten Extrakt bereits unter der Bestimmungsgrenze.

Tabelle 4.14: Ergebnisse aus den LC-MS/MS-Analysen der Bilina-Probe vom 22.08.2001 in ng/L.

	BG*	Ursprungs- extrakt	Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 5
Anzahl Parallel proben <i>n</i>		2	2	2	2	2	2
Bisphenol A	6	$(28 \pm 2) \cdot 10^3$	$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(20 \pm 2) \cdot 10^3$	$250 \pm 49$	$130 \pm 20$	$85 \pm 7$
Nonylphenol	33	$210 \pm 22$	n.n.	$225 \pm 25$	n.n.	n.n.	n.n.
Östron	4	< BG	n.n.	< BG	n.n.	n.n.	n.n.

< BG: kleiner Bestimmungsgrenze; n.n.: nicht nachweisbar

\* Bestimmungsgrenze ermittelt für 1,5 L Probe, ohne GPC

Zur Ermittlung der Messunsicherheit siehe Anfang des Abschnitts 4.4.1

Die Proben-Extrakte aus der Bilina und die Fraktionen wurden im Hefetest untersucht; die Ergebnisse sind in Abbildung 4.12 dargestellt.



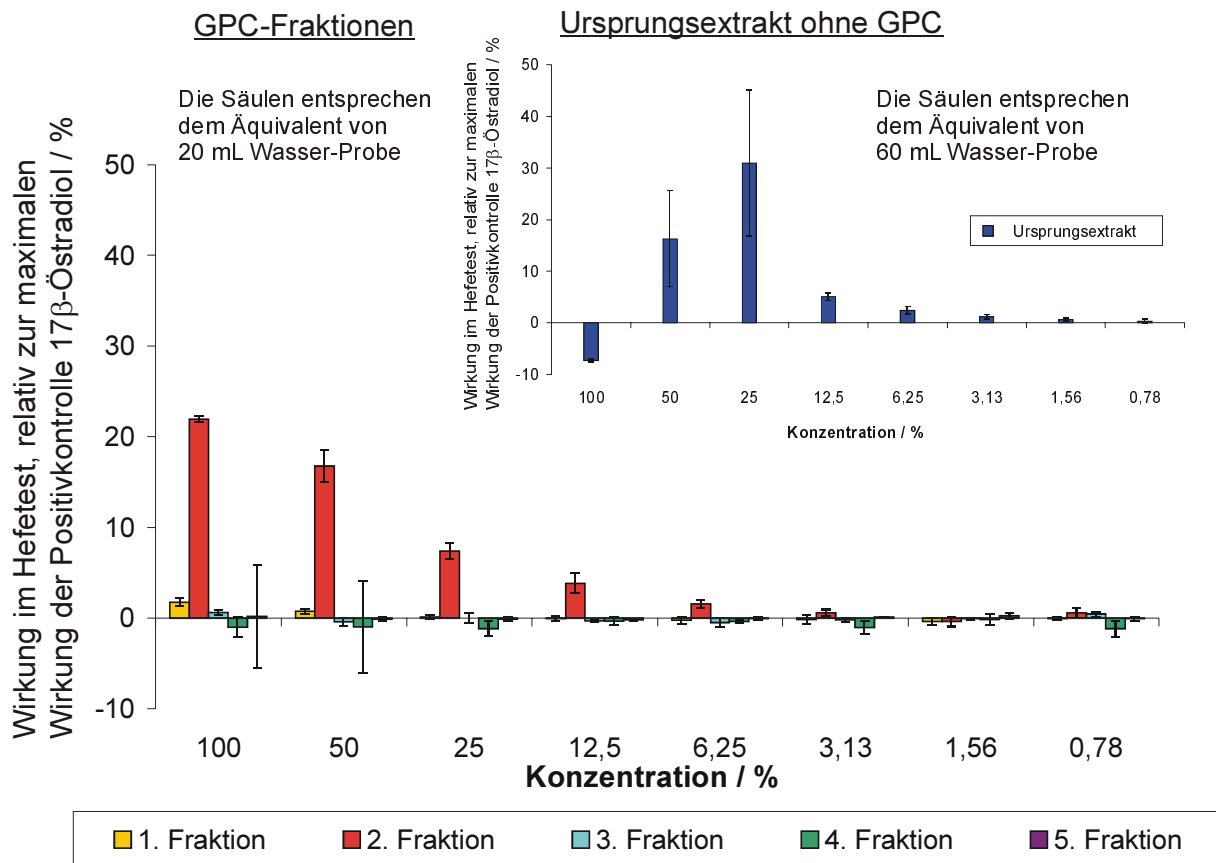


Abbildung 4.12: Ergebnisse des Hefetests der Bilina-Probe.

Der Ursprungsextrakt und die zweite Fraktion zeigten ein östrogenes Potenzial. Der Ursprungsextrakt wirkte in den Konzentrationen 100 % und 50 % toxisch auf die Hefezellen. In der Abbildung ist dies an der negativen Säule bei 100 % zu erkennen. Die Säule bei 50 % ragte nicht mehr in den negativen Bereich, aber da das Hefewachstum wegen des toxischen Milieus geringer ausfiel, war die maximale Wirkung noch nicht erreicht, die bei 25 % zu sehen ist. Anschließend wird ein normaler Verlauf einer Dosis-Wirkungs-Kurve beobachtet. Im Ursprungsextrakt der Bilina-Probe war Bisphenol A, Nonylphenol und Östron vorhanden (letzteres unterhalb der Bestimmungsgrenze) (vgl. Tabelle 4.14). In der dazugehörigen zweiten Fraktion wurden die gleichen Verbindungen bestimmt. Bei dieser Probe wurde Bisphenol A nicht erfolgreich in der GPC-Säule auf eine Fraktion konzentriert. Es lagen in allen Fraktionen Konzentrationen von Bisphenol A vor: Fraktion 1 wurde möglicherweise etwas zu spät geschnitten, so dass bereits ein Teil des Bisphenol A in dieser Fraktion war, in den anderen Fraktionen wurden im Vergleich zu Fraktion 2 nur Bruchteile bestimmt. Außer in der zweiten Fraktion wurde bei keiner Fraktion eine östrogene Wirkung im Hefetest beobachtet.

Für die Bilina-Probe wurde ebenso ein Versuch zur Bestätigung der Ergebnisse des Hefetests durchgeführt. Die synthetischen Proben wurden in reinem und in mit Huminsäure angereichertem Methanol angesetzt (vgl. S. 62). Diesen synthetischen Proben wurde

ebenfalls nach halbquantitativer Abschätzung Östron zugefügt, obwohl die chemisch-analytischen Ergebnisse unterhalb der Bestimmungsgrenzen lagen. Das Östron im Ursprungsextrakt entsprach einem Äquivalent von 2,3 ng/L, in der zweiten Fraktion 3,6 ng/L. In Abbildung 4.13 wird die Wirkung des natürlichen Probenextrakts sowie der beiden in Methanol gelösten, synthetischen Proben auf den Hefetest gegenüber gestellt.

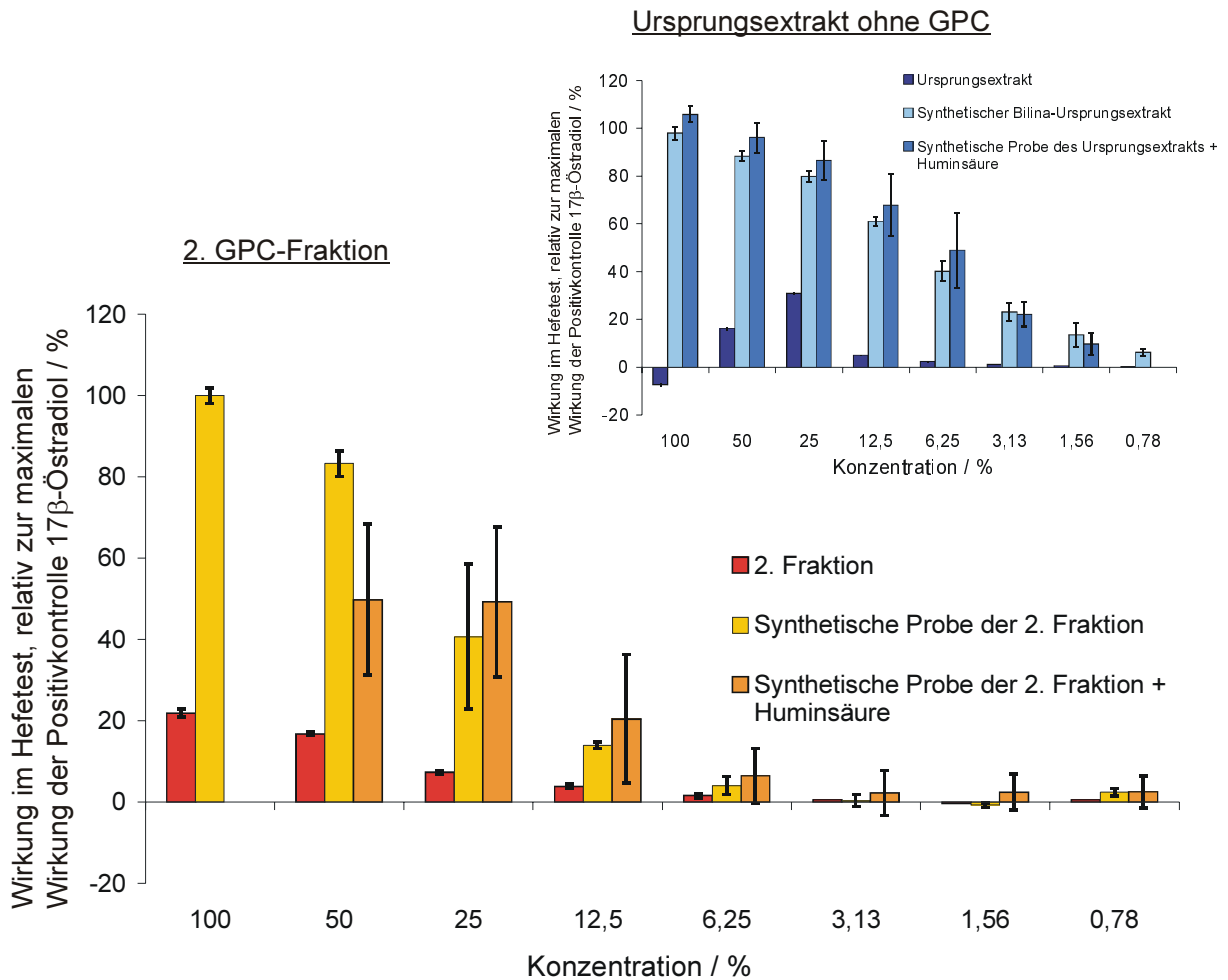


Abbildung 4.13: Die Bilina-Probe im Hefetest; verglichen wird die natürliche Probe sowie deren 2. Fraktion mit in Methanol gelösten, synthetischen Proben (mit und ohne Huminsäure als Matrix). Das kleine Diagramm oben rechts stellt die Ergebnisse des Ursprungsextrakts dar, das große Diagramm unten die der zweiten Fraktion.

Die Verdünnungen 100 % und 50 % des natürlichen Extrakts wirkten toxisch auf die Hefezellen. Diese Wirkung hatten die entsprechenden Verdünnungen der synthetischen Proben nicht. Sowohl in der Ursprungsprobe als auch in der zweiten Fraktion war die Wirkung der synthetischen Probe um ein Vielfaches höher. Allerdings bestand offenbar kein Unterschied zwischen den in reinem oder den in mit Huminstoffen angereichertem Methanol gelösten synthetischen Proben.

Unter Verwendung des Konzepts der Östradioläquivalente (vgl. Gleichung 3.8) ergab sich für die Bilina-Extrakte, das folgende Bild (Tabelle 4.15).

Tabelle 4.15: EC<sub>20</sub>-Werte der Bilina-Probe, die dazugehörigen EC<sub>20</sub>-Werte für 17β-Östradiol und die entsprechenden Östradioläquivalente.

	EC <sub>20</sub> -Wert (Verdünnungs- faktor)	EC <sub>20</sub> -Wert <sup>a</sup> (17β-Östradiol) / (nmol/L)	EC <sub>20</sub> -Wert <sup>b</sup> (17β-Östradiol) / (ng/L)	EEQ <sub>H</sub> <sup>a</sup> / (nmol/L)	EEQ <sub>H</sub> <sup>b</sup> / ng/L)	EEQ <sub>A</sub> <sup>b</sup> / ng/L)
Bilina Ursprungs- extrakt	4,8	0,06	0,05	0,3	0,2	1,9
Bilina 2. Fraktion	3,7	0,06	0,16	0,2	0,6	1,9

<sup>a</sup> Diese Werte stellen die Konzentration von 17β-Östradiol auf der Mikrotiterplatte dar.

<sup>b</sup> Diese Werte sind entsprechend der unterschiedlichen Aufkonzentrierungen auf die Konzentration in einer 1L Wasserprobe hochgerechnet.

Die östrogenen Potenziale aus Ursprungsextrakt und zweiter Fraktion stimmten bei der Bilina-Probe gut überein. Die östrogen wirksamen Substanzen lagen konzentriert in der zweiten Fraktion vor.

Der Vergleich der EEQ-Werte aus Hefetest und Analytik bestätigt, dass die Wirkung der synthetischen Proben höher sein musste als diejenige, die die Realprobe aufwies. Es fehlt jedoch eine Erklärung für die reduzierte Wirkung der realen Probe.

#### 4.4.3.2 Gewässerprobe aus der Elbe

Von der Synthesia-Probe (Tabelle 4.16) stand für eine Doppelbestimmung kein ausreichendes Probenvolumen zur Verfügung, daher wurde von dieser Probe ein Ansatz extrahiert, der doppelt analysiert wurde. Die Chromatogramme für den Ursprungsextrakt und der zweiten Fraktion sind in den Anhängen 4 F und G dargestellt.

Tabelle 4.16: Ergebnisse aus den LC-MS/MS-Analysen der Synthesia-Probe in ng/L.

	BG*	Ursprungs- -extrakt	Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3	Fraktion 4 + 5
Anzahl Parallel- proben <i>n</i>		1	1	1	1	1
Bisphenol A	7	30 ± 2	n.n.	45 ± 3	n.n.	n.n.
Nonylphenol	33	280 ± 35	n.n.	210 ± 26	45 ± 6	n.n.
Östron	4	< BG	n.n.	< BG	n.n.	n.n.

< BG.: kleiner Bestimmungsgrenze; n.n.: nicht nachweisbar

\* Bestimmungsgrenze ermittelt für 1,5 L Probe, ohne GPC

Zur Ermittlung der Messunsicherheit siehe Anfang des Abschnitts 4.4.1

Das Ergebnis des Hefetests für die Synthesia-Probe ist in Abbildung 4.14 dargestellt. Diese Probe wirkte nicht östrogen. Der 100%ige Extrakt der Ursprungsprobe wirkte toxisch auf die Probe, daher ist diese Säule in den negativen Bereich gerichtet. Die zweite Fraktion wies eine geringe rötlich Färbung auf; insgesamt setzte sich aber keine der Proben von den Blindwerten ab. Wie in Abbildung 4.14 zu sehen ist, pendeln die korrigierten Ergebnisse um den Wert Null und selbst der höchste Wert entspricht nur 5 % des Maximalwerts von 17 $\beta$ -Östradiol.

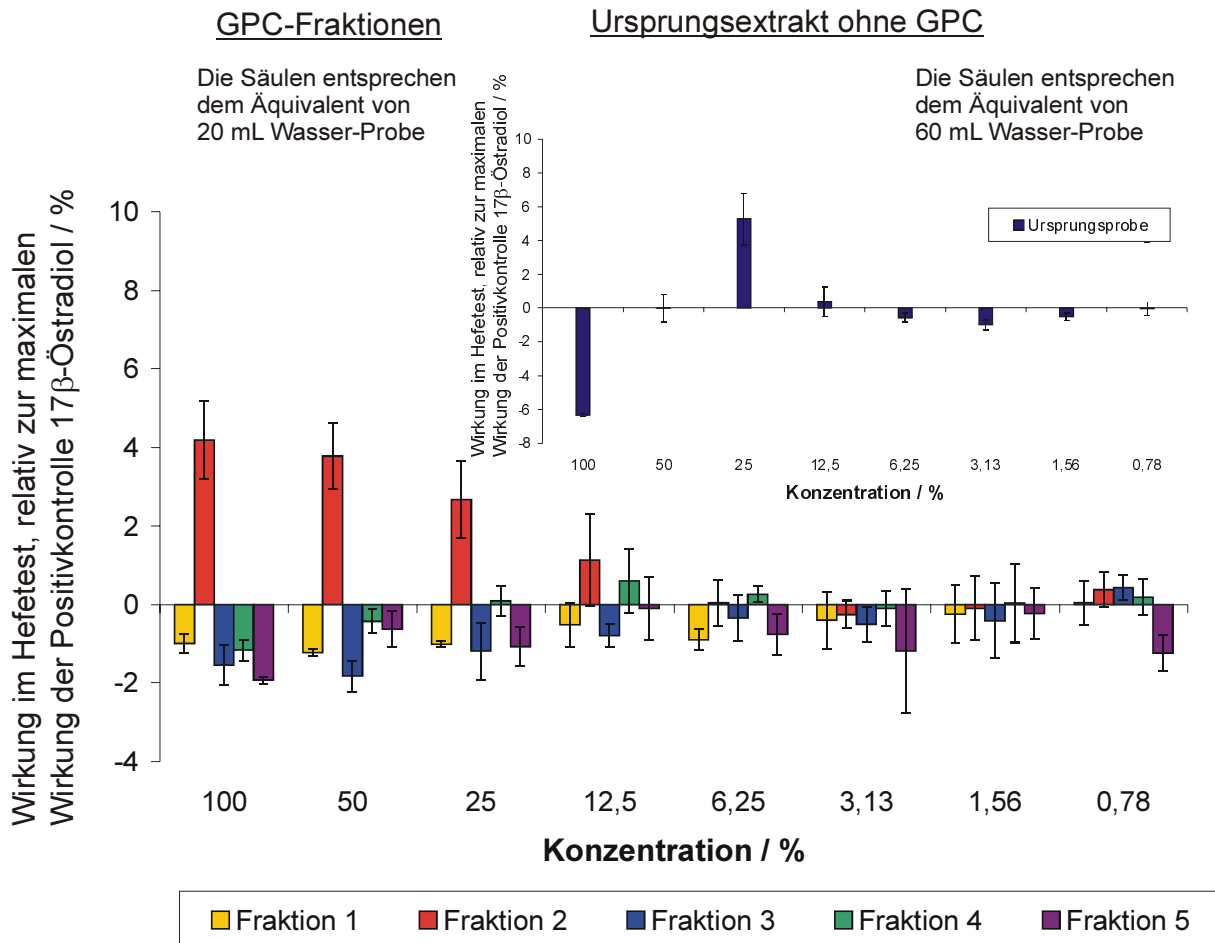


Abbildung 4.14: Ergebnisse des Hefetests der Synthesia-Probe.

#### 4.4.4 Zusammenfassende Diskussion der Realproben-Ergebnisse

In den in dieser Arbeit analysierten Proben konnten nur Bisphenol A und Nonylphenol quantifiziert werden, Östron wurde nachgewiesen – lag jedoch jeweils unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die ermittelten Konzentrationen im Kläranlagen-Ablauf lagen unterhalb dessen, was andere Arbeitsgruppen in Abläufen deutscher Kläranlagen quantifizierten. In Tabelle 4.17 ist eine Gegenüberstellung der Ergebnisse dieser Arbeit mit Beispielen aus der Literatur angegeben.

Tabelle 4.17: Gegenüberstellung der in dieser Arbeit in Kläranlagen quantifizierten Konzentration und Literaturwerte.

	Diese Arbeit	[SPENGLER ET AL. 1999] Medianwert	[KÖRNER ET AL. 2000] Einzelwert
Bisphenol A / (ng/L)	20 - 30	110	160
Nonylphenol / (ng/L)	40 - 170	750	320
Östron / (ng/L)	< 4	5	-

Bei dem Versuch, die Ergebnisse des Hefetests zu bestätigen, zeigten sich Abweichungen zwischen den Originalproben und den synthetischen Proben in beide Richtungen. Die im Vergleich zu den natürlichen Proben erhöhte Wirkung mancher synthetischer Proben konnte bisher nicht aufgeklärt werden (vgl. Abbildung 4.9 und Abbildung 4.13). Zur Klärung wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt. Eine Möglichkeit wäre die Bindung von Analyten an Matrixkomponenten, die dadurch nicht mehr für die Bindung an den Hormonrezeptoren zur Verfügung ständen. Die durchgeführten Experimente mit künstlicher Matrix (Huminstoffe) bestätigten diese Hypothese jedoch nicht. Eine weitere Überlegung wurde angestellt hinsichtlich konjugierter Östrogene in der Probe, die möglicherweise während der Analyse dekonjugiert würden. Dies würde theoretisch dazu führen, dass mit der chemischen Analyse höhere Konzentrationen ermittelt würden als im Hefetest wirksam vorliegen. Diese Hypothese wurde jedoch verworfen, da aus der Literatur hervorgeht, dass bereits während des Aufenthalts in der Kläranlage die Dekonjugation der Östrogene nahezu vollständig abgeschlossen ist, so dass im Ablauf von Kläranlagen und in Oberflächengewässern nur freie Östrogene vorliegen [WEGENER ET AL. 1999]. Weiterhin gab es keine überzeugenden Argumente, dass eine Dekonjugation während des Analysen-Prozesses erfolgte: die Analyte lagen im selben Lösungsmittel vor wie im Hefetest, darüber hinaus hätte die Dekonjugation vor Beginn der Trennung auf der LC-Säule erfolgen müssen, da anderenfalls die Retentionszeiten verschoben wären. Eine dritte Hypothese befasste sich mit dem Vorliegen antiöstrogen wirksamer Substanzen in der Probe. Solche Substanzen würden die Wirkung des natürlichen Extrakts verringern. Da diese Stoffe mit der 'target-Analyse' jedoch nicht erfasst wurden, konnten sie bei der Zusammensetzung der synthetischen Proben nicht berücksichtigt werden. Daher könnte die Wirkung der synthetischen Proben höher sein als die der natürlichen Proben. Die Auswirkungen antiöstrogen wirkender Substanzen auf den Hefetest sollten noch eingehender untersucht werden.

Neben einer, im Vergleich zu den synthetischen Proben, niedrigeren Wirkung der Originalproben gab es ebenfalls Proben, die höhere Wirkungen aufwiesen als die synthetischen Proben (Abbildung 4.11). Dies ist vor allem durch die unterschiedlichen Nachweisgrenzen von chemischer Analyse und Hefetest erklärbar. Bei den natürlichen und synthetischen Östrogenen ist der Hefetest wesentlich empfindlicher als die chemische Analyse. Im Hinblick auf die untersuchten Xenoöstrogene ist es umgekehrt. Für  $17\beta$ -Östradiol bedeutet z.B. ein  $EC_{50}$ -Wert von  $3,5 \cdot 10^{-10}$  mol/L bei einer Aufkonzentrierung der Probe von 1:7500 (vgl. AAV 1), dass in einer Wasserprobe eine Konzentration von 0,3 ng/L vorliegen müsste, um eine 50%ige Wirkung auszulösen. Für Nonylphenol ergibt die gleiche Rechnung bei einem  $EC_{50}$ -Wert von  $6 \cdot 10^{-6}$  mol/L eine Konzentration von 3,5  $\mu$ g/L. Da gerade die natürlichen und synthetischen Östrogene wie  $17\beta$ -Östradiol, Östron und  $17\alpha$ -Ethinylestradiol eine hohe

östrogene Potenz besitzen, lösen sie bereits in Konzentrationen, die von der chemischen Analyse nicht nachgewiesen werden konnten, eine hohe Wirkung aus.

Um den Hefetest erfolgreich in eine BDCA einzubinden, ist eine Optimierung in Hinblick auf die Bestimmungsgrenzen des chemisch-analytischen Verfahrens notwendig. Denn die Ergebnisse des Hefetests können in der BDCA nur erfolgreich interpretiert werden, wenn die für die östrogene Wirkung entscheidenden Analyte quantifiziert werden können. Weiterhin könnte eine chemische Feinfraktionierung dazu beitragen, dass die Ergebnisse des Hefetests besser interpretiert werden können, wenn sich möglichst wenige Substanzen in einer Fraktion befinden und sich dadurch die gegenseitigen Einflüsse verringern.

## 5 VERGLEICH ZWEIER *IN VITRO*-BIOTESTS

### 5.1 Prinzip eines *in vitro*-Leberzelltests für östrogene Substanzen

Ein weiterer *in vitro*-Biotest für östrogene Substanzen wurde im Rahmen der wissenschaftlich-technischen Zusammenarbeit zwischen Deutschland und Kanada in einer Zusammenarbeit mit einer Arbeitsgruppe am National Water Research Institute in Burlington, Kanada eingesetzt. Dieser basiert auf Primär-Leberzellen von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), die in der Lage sind das Protein Vitellogenin zu produzieren. Vitellogenin wird in der Umwelt als Biomarker zum Nachweis östrogenen Substanzen in Fischen u.a. genutzt [KENT 1998]. Bei Fischen, Reptilien, Amphibien und Vögeln ist Vitellogenin der Vorläufer des Dotterproteins, welches als Energielieferant des sich entwickelnden Embryos dient. Vitellogenin wird in der Leber produziert und das natürliche weibliche Sexualhormon 17 $\beta$ -Östradiol stimuliert dessen Synthese. Aus diesem Grund wird Vitellogenin unter normalen Bedingungen nur von Weibchen produziert. Jungtiere oder männliche Tiere sind jedoch ebenso in der Lage Vitellogenin zu produzieren, sofern sie 17 $\beta$ -Östradiol oder östrogen wirksamen Chemikalien exponiert werden.

An dieser Stelle soll das Prinzip des Leberzelltest beschrieben werden. Der Test läuft in mehreren Stufen ab. In einem ersten Schritt werden die Leberzellen einer Forelle isoliert. Diese Zellen werden in einem Nährmedium suspendiert und auf 24-Loch-Mikrotiterplatten aufgeteilt. Die zu untersuchenden Proben werden in dieses Nährmedium pipettiert, und die Zellen werden so über drei Tage den zu untersuchenden Proben exponiert. Die Exposition der Leberzellen ist semi-statisch, da jeden Tag die Hälfte des Nährmediums entfernt und durch neues ersetzt wird. Gleichzeitig wird ebenfalls jeden Tag die Hälfte der ursprünglichen Probenmenge erneut zugegeben. Dabei sind die isolierten Leberzellen, genau wie eine Leber in lebenden Fischen, in der Lage, Vitellogenin zu produzieren, wenn östrogen wirksame Substanzen gegenwärtig sind. Nach drei Tagen wird das Nährmedium, in dem sich das Vitellogenin befindet, entnommen und als Probe bei -80 °C eingefroren. Für diesen ersten Schritt wird eine Woche benötigt.

Im zweiten Schritt wird ein ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) durchgeführt, der die Quantifizierung des im Medium enthaltenen Vitellogenins zum Ziel hat. Das Schema des ELISA wird in Abbildung 5.1 dargestellt.

Die Mikrotiterplatten werden vor der Verwendung vorbereitet, indem die Oberflächen mit einer definierten Konzentration von Vitellogenin beschichtet werden. Proteine können an Plastikoberflächen unspezifisch und fest adsorbieren. Weitere, überzählige Bindungsstellen an den Kunststoffoberflächen werden mit einer Carbonatlösung durch das Protein Rinderalbumin abgesättigt. Nach einem Waschschrift mit Pufferlösung sind die Platten gebrauchsfertig.

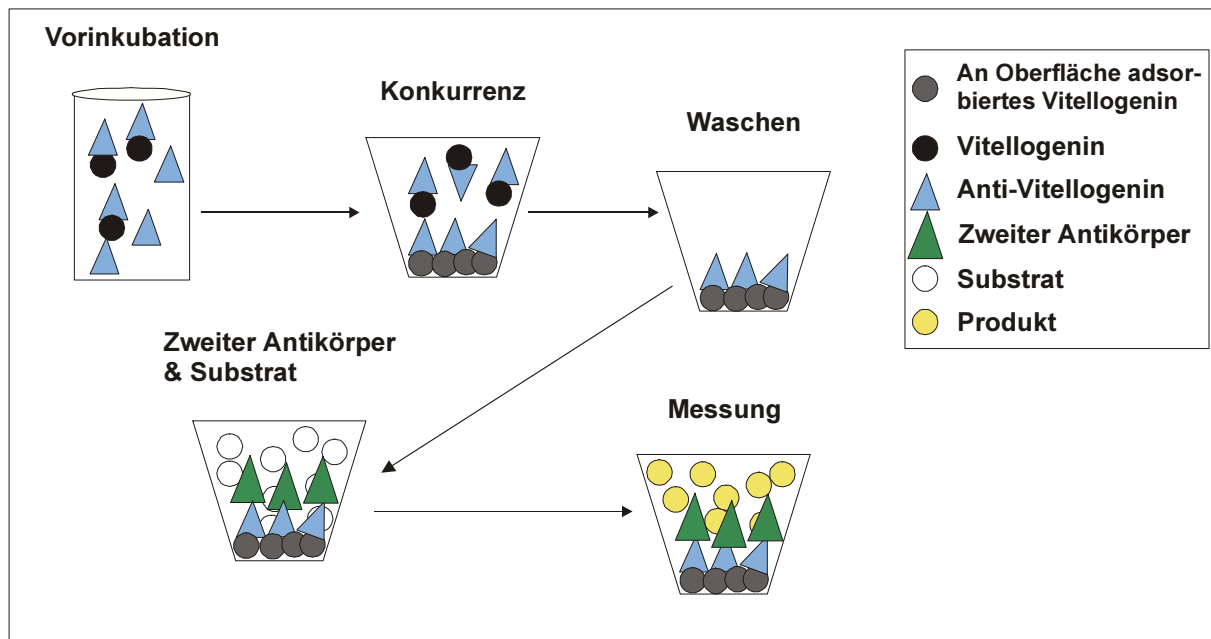


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des ELISA zur Quantifizierung des Vitellogenin.

Mit diesem ELISA werden in Verdünnungsreihen die Proben aus dem ersten Schritt untersucht. Diese Proben werden über Nacht mit einer definierten Menge eines spezifischen Antikörpers (Anti-Vitellogenin) vorinkubiert. Diese Lösungen werden in die Mikrotiterplatten pipettiert und inkubiert. Dabei tritt eine kompetitive Reaktion auf, zwischen dem Vitellogenin in der Probe, das während der Vorinkubation von dem spezifischen Antikörper gebunden wurde, und dem Vitellogenin, das auf den Kunststoffoberflächen der Mikrotiterplatte gebunden war. Überschüssige Antikörper, die während der Vorinkubation keine Antigene gebunden haben, binden letzteres Vitellogenin. Nach der Inkubationszeit werden die Platten mit den Proben geleert und gewaschen. Anschließend wird mit einem zweiten Antikörper inkubiert, der auf den ersten Antikörper gerichtet ist. Dieser zweite Antikörper ist darüber hinaus mit einem Enzym gekoppelt. Nach einem erneuten Waschschrift wird mit einem Substrat für das spezielle Enzym inkubiert. Durch eine Reaktion zwischen Substrat und dem Enzym gibt es eine Farbreaktion, über die photometrisch quantifiziert werden kann.

Während der Vorinkubation können genau so viele erste Antikörper eine Bindung eingehen wie Vitellogenin in der Probe enthalten ist. Dieses wird nach der Inkubation auf der Mikrotiterplatte aus dem System entfernt. Schließlich wird über den zweiten Antikörper und das Substrat die Menge an erstem Antikörper quantifiziert, die an die Vitellogenin-Moleküle auf der Kunststoffoberfläche gebunden sind. Da die Ausgangskonzentration von erstem Antikörper genau definiert ist, kann so in einem Umkehrschluss auf die Menge an Vitellogenin in der Probe geschlossen werden. Auf jeder Platte wird eine Standardkurve von Vitellogenin erstellt, die zur Quantifizierung der Vitellogenin-Gehalte in den Proben notwendig ist. SHERRY ET AL. (1999) beschrieben die Durchführung eines ELISA für Vitellogenin. Der in dieser Arbeit verwendete Test mit Leberzellen von Regenbogenforellen



(*Oncorhynchus mykiss*) unterscheidet sich von dem von SHERRY ET AL. (1999) beschriebenen Test mit Zellen von Braun-Forellen (*Salmo trutta*) nur in der Art der Antikörper.

## 5.2 Ergebnisse des Vergleichs

Für den Vergleich der zwei *in vitro*-Testsysteme wurden einige Standardsubstanzen und Probenextrakte während zwei Forschungsaufenthalten in Kanada mit dem Leberzelltest und anschließend in Deutschland mit dem Hefetest untersucht. Als Standardsubstanzen wurden  $17\beta$ -Östradiol und  $17\alpha$ -Ethinylestradiol getestet. Darüber hinaus wurde  $17\beta$ -Östradiol in beiden Biotests als Positivkontrolle genutzt. Als reale Proben standen Extrakte einer Abwasserprobe einer kanadischen Zellstoff-Fabrik und einer Ablaufprobe der deutschen Kläranlage zur Verfügung. Für den Leberzelltest wurde für die Kläranlagen-Probe ein Lösungsmittelwechsel zu Ethanol vorgenommen.

In Abbildung 5.2 sind die Dosis-Wirkungs-Kurven für  $17\beta$ -Östradiol für die beiden Testsysteme dargestellt.

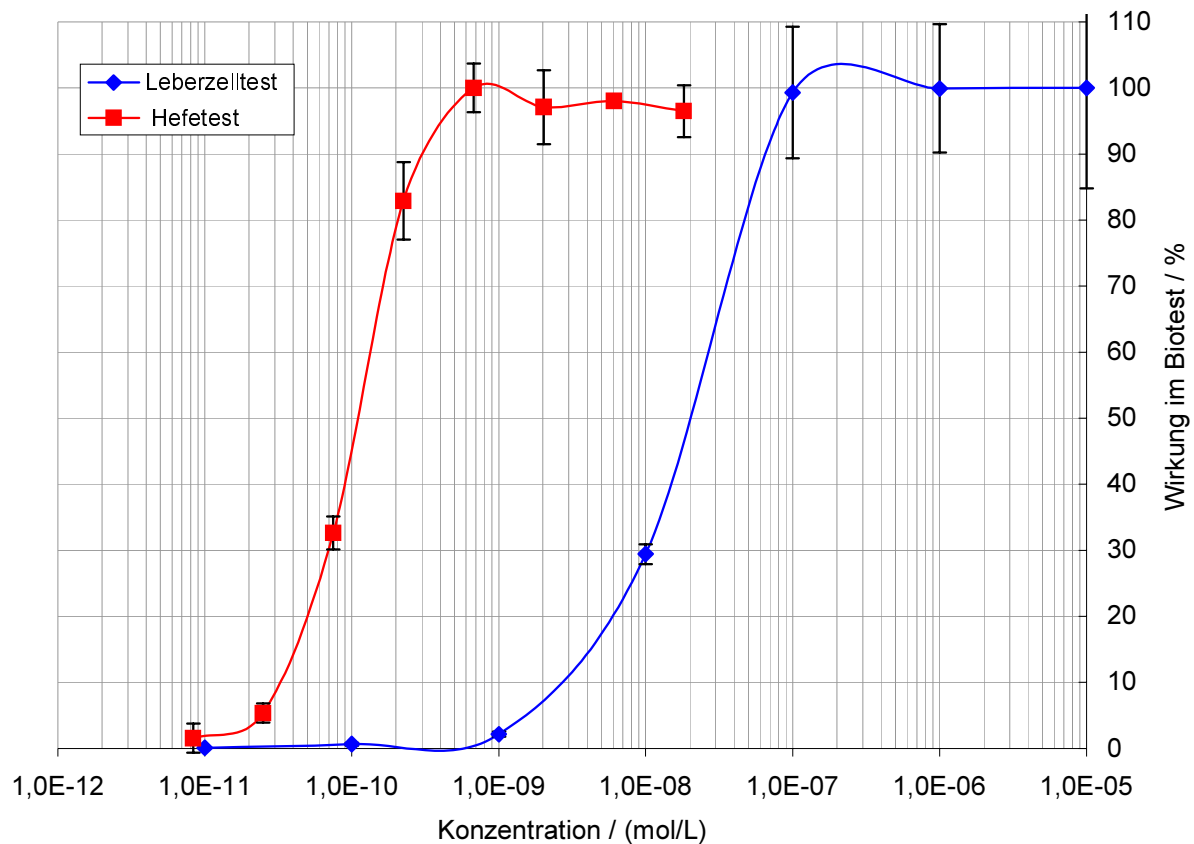


Abbildung 5.2: Vergleich zwischen dem Hefetest und dem kanadischen Leberzelltest anhand der Positivkontrolle  $17\beta$ -Östradiol.

Es ist zu erkennen, dass der Hefetest für  $17\beta$ -Östradiol um ca. zwei Größenordnungen empfindlicher ist. Im Hefetest hatte  $17\beta$ -Östradiol im Durchschnitt einen  $EC_{50}$ -Wert von  $3,5 \cdot 10^{-10}$  mol/L (in diesem speziellen Fall  $1,1 \cdot 10^{-10}$  mol/L); im Leberzelltest hingegen lag der  $EC_{50}$ -Wert bei  $2,0 \cdot 10^{-8}$  mol/L.

In Abbildung 5.3 sind die Dosis-Wirkungskurven für  $17\alpha$ -Ethinylestradiol abgebildet.

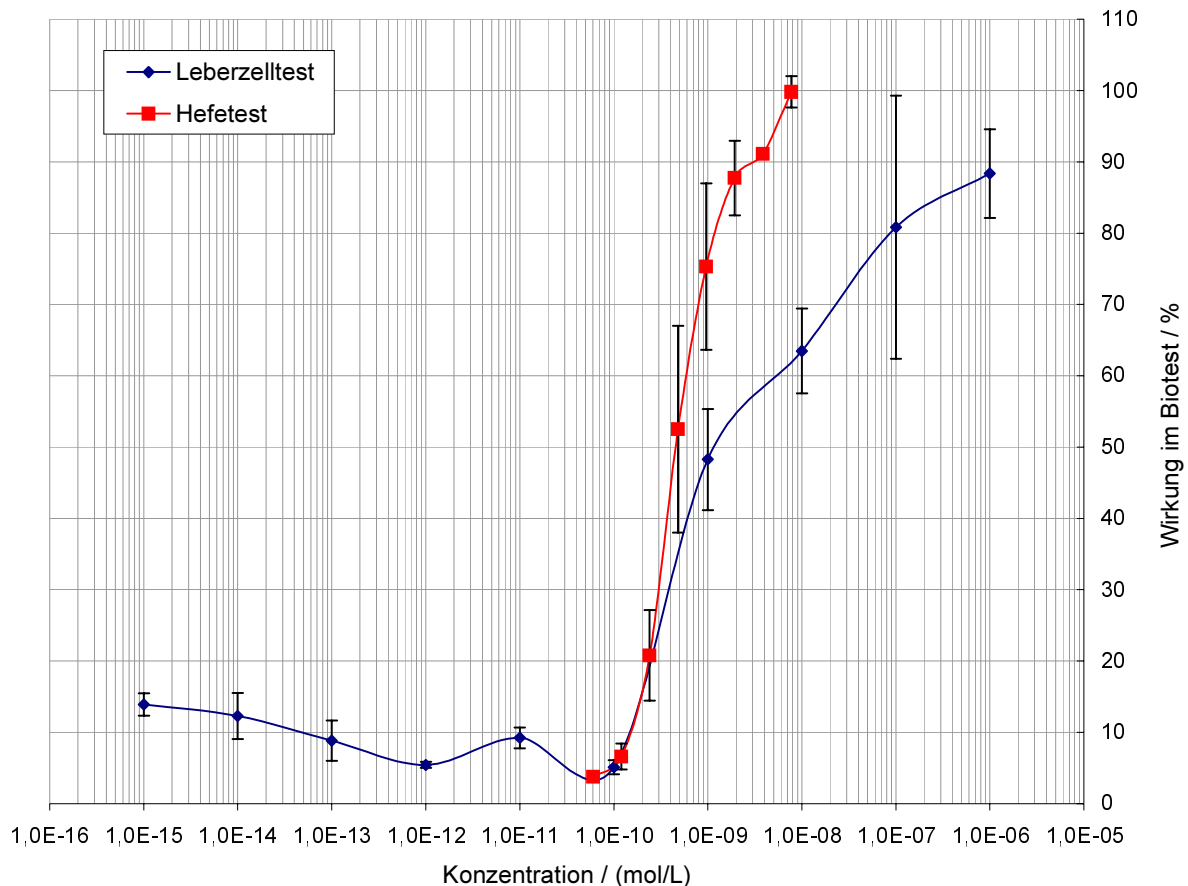


Abbildung 5.3: Vergleich zwischen dem Hefetest und dem kanadischen Leberzelltest anhand des synthetischen Östrogens  $17\alpha$ -Ethinylestradiol.

Für  $17\alpha$ -Ethinylestradiol ist der Leberzelltest mit einem  $EC_{50}$ -Wert von  $1,1 \cdot 10^{-9}$  mol/L um eine halbe Größenordnung weniger empfindlich als der Hefetest mit einem  $EC_{50}$ -Wert von  $4,5 \cdot 10^{-10}$  mol/L.

Bei den in Abbildung 5.4 dargestellten Ergebnissen der beiden Testsysteme für einen Kläranlagen-Abwasser-Extrakt aus dem Jahr 2000 war die Wirkung relativ zur Positivkontrolle  $17\beta$ -Östradiol größer als im Leberzelltest. Die Säulen stellen die Wirksamkeit im jeweiligen Testsystem relativ zur Wirkung von  $17\beta$ -Östradiol dar. In der unverdünnten Probe wirkte der Extrakt auf die Hefezellen toxisch – erkennbar an der stärker werdenden Wirkung zur Verdünnung 50 % hin. Ab der Verdünnung 50 % ist an der Dosis-Wirkungs-Kurve zu erkennen, dass die Probe noch nicht bis zum vollständigen Nachlassen der Wirkung verdünnt war. Im Lebertest waren keine Anzeichen für toxische Wirkung zu erkennen.

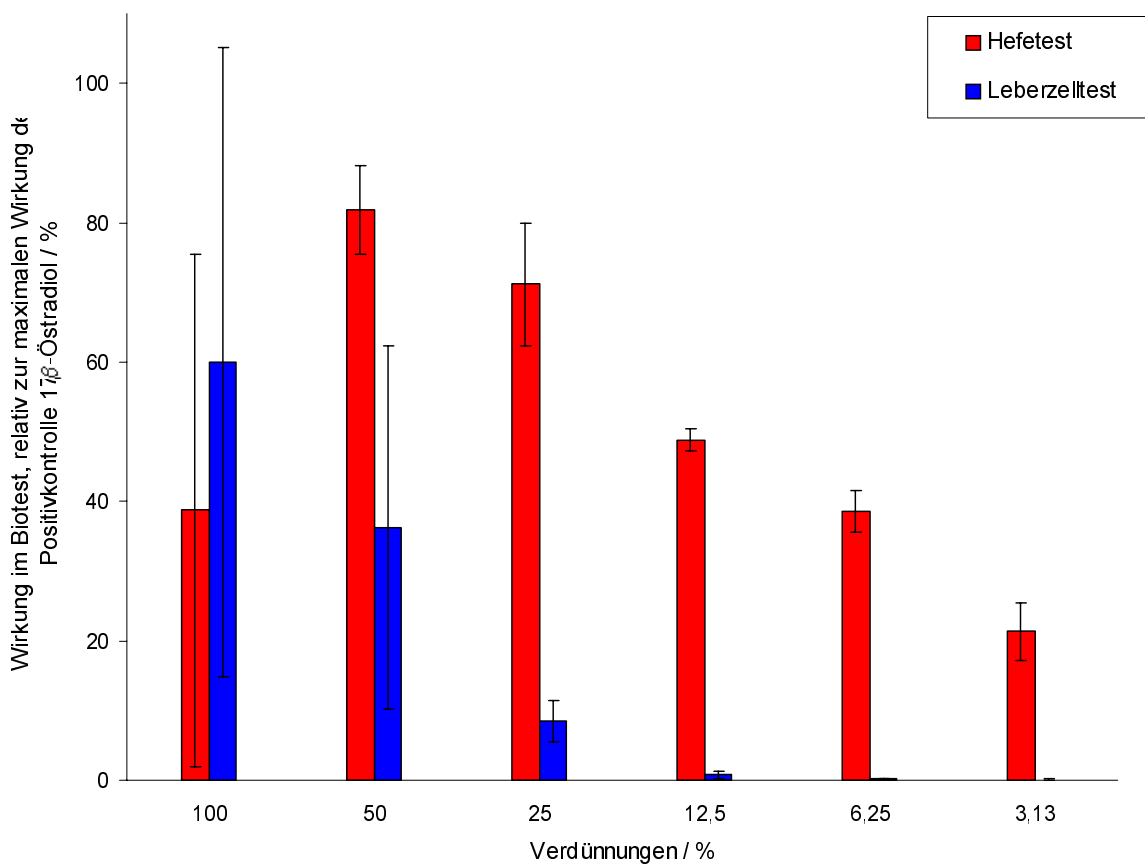


Abbildung 5.4: Vergleich des Hefetests und des kanadischen Leberzelltests anhand eines Kläranlagen-Abwasser-Extrakts aus dem Jahr 2000.

In Abbildung 5.5 ist der Vergleich der beiden Biotests anhand des Extrakts des Kläranlagenabwassers aus dem Jahr 2001 dargestellt. Wiederum war die Wirkung im Leberzelltest nicht vergleichbar groß wie die im Hefetest. Diese Probe hatte keine toxische Wirkung auf die Hefezellen, aber die Leberzellen waren bei der Exposition mit unverdünntem Extrakt leicht geschädigt. Bei dieser Probe ist ebenfalls eine höhere Empfindlichkeit des Hefetests zu erkennen.

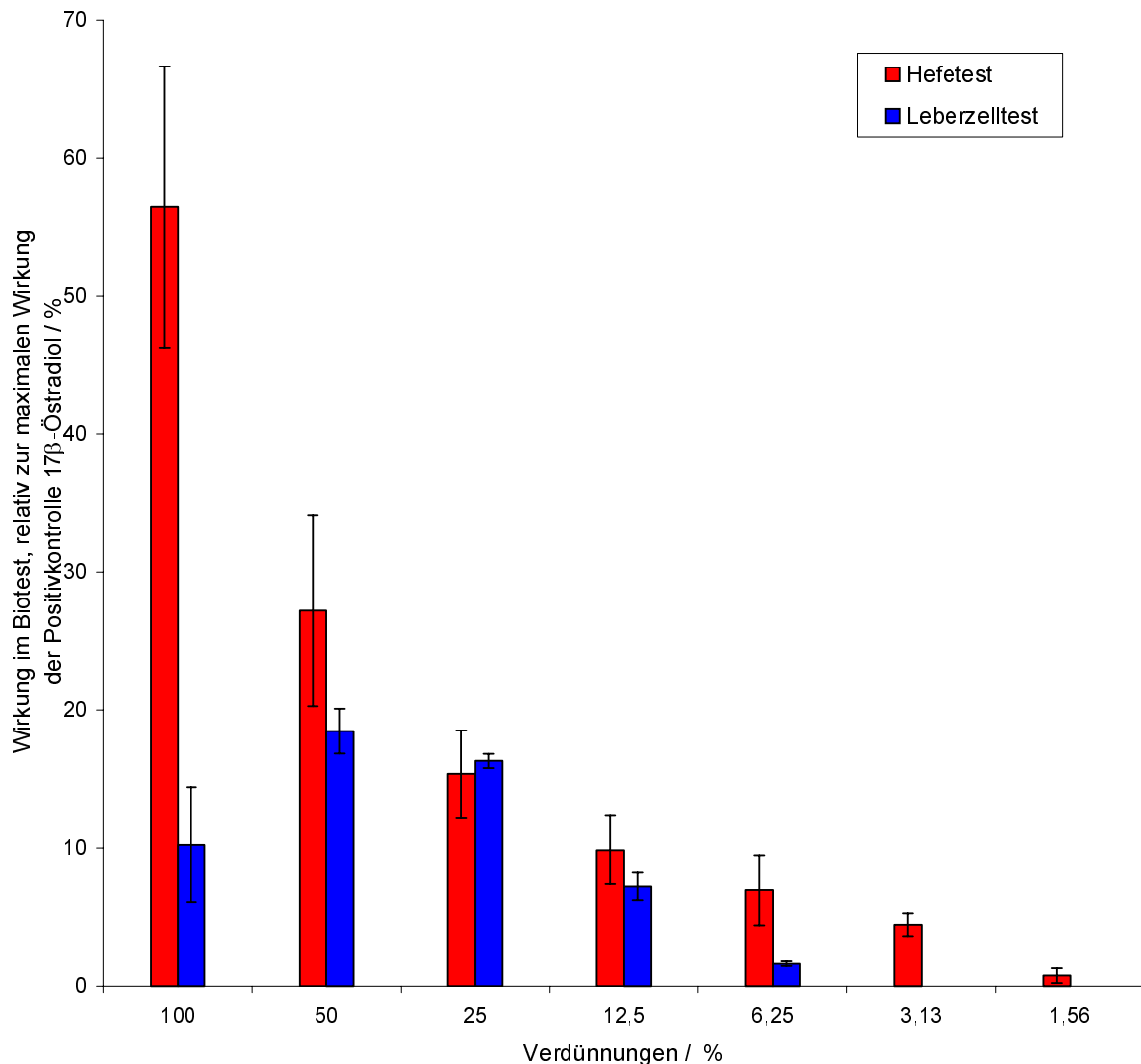


Abbildung 5.5: Vergleich zwischen dem Hefetest und dem kanadischen Leberzelltest anhand einer Kläranlagen-Probe vom 17. Juli 2001; der Hefetest wurde in Methanol als Lösungsmittel durchgeführt und der Leberzelltest in Ethanol.

In Abbildung 5.6 sind die Ergebnisse des Vergleichs für einen Extrakt des Abwassers einer kanadischen Zellstoff-Fabrik dargestellt. Dieser Extrakt zeigte eine so starke akute Toxizität für die Hefezellen, dass die verwendeten Verdünnungen nicht in den auswertbaren Bereich der Dosis-Wirkungskurve gelangten. Für diese Probe stellte sich wiederum heraus, dass der Hefetest empfindlicher als der Leberzelltest war, denn die Dosis-Wirkungs-Kurve für den Leberzelltest war bereits bei 12,5 % vollständig verdünnt, und der Hefetest zeigte bei dieser Verdünnung noch 20 % Wirkung an.

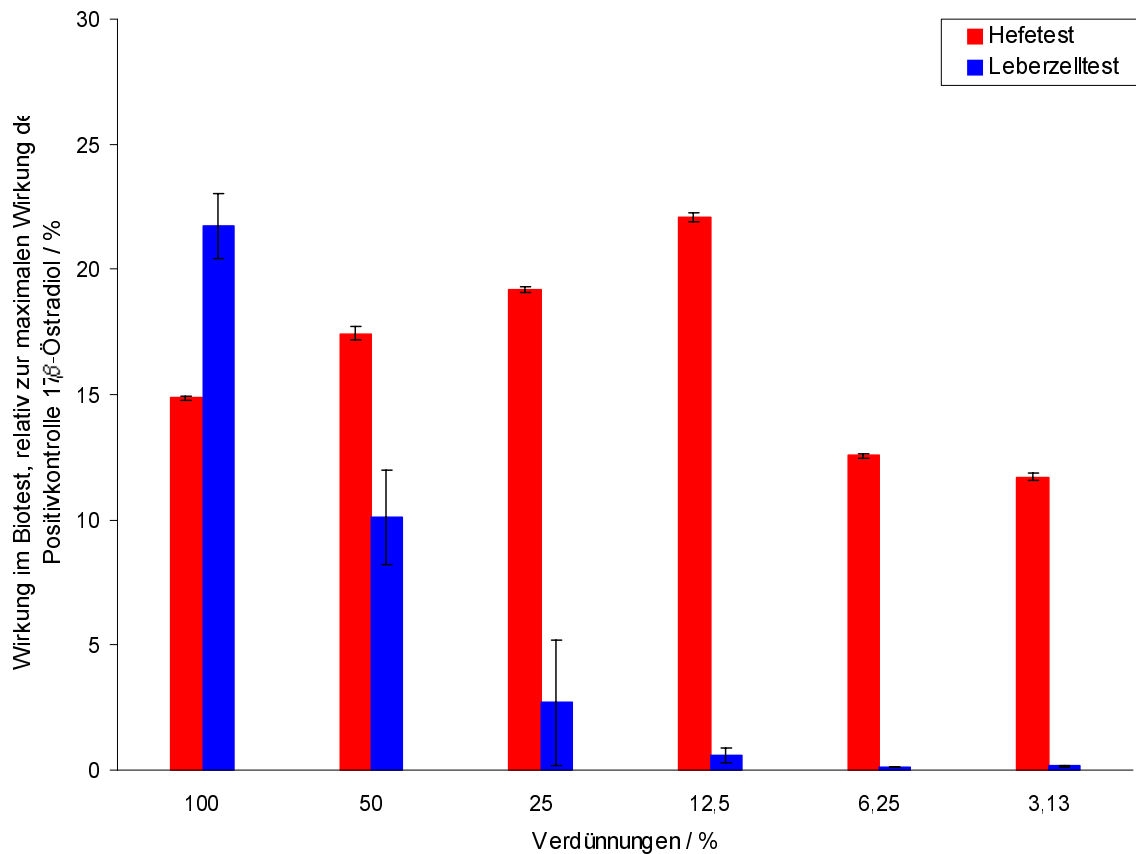


Abbildung 5.6: Vergleich des Hefetests und des kanadischen Leberzelltests anhand des Abwasser-Extrakts einer Zellstoff-Fabrik.

Im Vergleich lieferten die beiden *in vitro*-Biotests für östrogene Wirkung die gleichen qualitativen Aussagen, ob eine der untersuchten Proben östrogen wirksam war oder nicht. Der Hefetest war jedoch, je nach Substanz, um ein bis zwei Größenordnungen empfindlicher als der Leberzelltest. Der Arbeits- und Zeitaufwand war beim Hefetest erheblich geringer, da das Ergebnis innerhalb von einer Woche vorlag. Beim Leberzelltest war nach einer Woche die erste Stufe, die Exposition der Leberzellen mit den Proben, abgeschlossen. Hierauf folgte die Quantifizierung des Vitellogenins, die unter Umständen noch mehrere Wochen Zeit in Anspruch nahm.



## 6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit wurden Verfahren für eine Biotest-geleitete chemische Analyse zur Identifizierung von östrogen wirksamen Substanzen in Oberflächengewässern entwickelt. Eine Biotest-geleitete chemische Analyse kombiniert die Vorteile von chemischer Analyse und Biotests mit dem Ziel, Substanzen zu identifizieren, die für ein toxisches Potenzial einer Umweltprobe verantwortlich sind.

Das Ziel bestand in der Etablierung und Validierung eines geeigneten Biotests, in der Entwicklung eines universellen Aufkonzentrierungs- und Fraktionierungsverfahrens, das auf eine 'non-target-Analyse' ausgerichtet ist und schließlich einer 'target-Detektion' ausgewählter Östrogene und Xenoöstrogene. Sowohl für die 'target-Analyse' als auch für die Validierung des Biotests wurden die natürlichen Östrogene 17 $\beta$ -Östradiol, Östron und Östriol, die synthetischen Östrogene 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol, Mestranol und 17 $\beta$ -Östradiol-17-valerat sowie die Xenoöstrogene Bisphenol A, Nonylphenol und 4-Octylphenol eingesetzt.

Die chemische Analyse erfolgte mit einer Kopplung aus Flüssigchromatographie und Tandem-Massenspektrometrie. In der Regel wurde die Elektrospray-Ionisierung und der negative Ionisierungs-Modus eingesetzt. Nur die Analyte Mestranol und 17 $\beta$ -Östradiol-17-valerat wurden im positiven Modus ionisiert. Die Anreicherung der Proben erfolgte durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan. Die Wiederfindungsraten innerhalb des Gesamtverfahrens unter Einbeziehung des Matrixeffekts bei der LC-MS-Detektion lagen in Kläranlagen-Abwasser, das als Test-Matrix genutzt wurde, im Bereich von 30–65 %. Um diese zu erhöhen, wurde ein Reinigungsschritt mit Gelchromatographie eingeführt, der neben dem Abtrennen der Matrix eine Fraktionierung der Probe ermöglichte. Nach der Abtrennung der Matrix lag die Wiederfindung bei 65–90 %. Die Bestimmungsgrenzen (Signal/Rausch-Verhältnis von 10) für das chemisch-analytische Verfahren, bezogen auf Analysen ohne vorherige Matrix-Abtrennung, lagen für Kläranlagen-Abwasser zwischen 5 ng/L und 50 ng/L.

Als Biotest wurde ein rekombinanter Stamm der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt, in den das Gen des menschlichen Östrogenrezeptors (hER) integriert ist. Um mit diesem Test arbeiten zu können, wurde ein S1-Labor eingerichtet. Nach Validierung des Hefetests anhand der oben genannten Substanzen wurden bei einer Aufkonzentrierung von 1:7500 folgende Konzentrationen in wässrigen Proben als Nachweisgrenzen (EC<sub>10</sub>) festgestellt: 0,1 ng/L für 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol, 0,1 ng/L für 17 $\beta$ -Östradiol, 2,3 ng/L für 17 $\beta$ -Östradiol-17-valerat, 880 ng/L für Nonylphenol, 825 ng/L für 4-Octylphenol, 790 ng/L für Bisphenol A, 6 ng/L für Mestranol, 15 ng/L für Östriol und 0,3 ng/L für Östron. Darüber hinaus wurden die Effektkonzentrationen bei 20 % und 50 % Wirkung berechnet und die Wirksamkeit der untersuchten Substanzen im Verhältnis zu dem weiblichen Sexualhormon 17 $\beta$ -Östradiol bestimmt.

Um das entwickelte Verfahren zu prüfen, wurden in dieser Arbeit Wasserproben untersucht, die eine starke östrogene Wirkung vermuten ließen. Dazu gehörte der Ablauf einer

Kläranlage sowie einleiternahe Proben aus der Elbe und einem Elbe-Nebenfluss. In diesen Proben und in den aus der Gelchromatographie stammenden Fraktionen wurden die oben genannten Ziel-Analyte quantifiziert. Alle Proben und Fraktionen wurden darüber hinaus mit dem Hefetest untersucht. Über synthetische Proben, die entsprechend der analytisch bestimmten Konzentrationen aus Standardlösungen hergestellt wurden, wurde versucht, die Wirkung der Probe im Hefetest zu bestätigen. Dabei war die Wirkung der synthetischen Probe in manchen Fällen kleiner als die der Originalprobe, bei anderen Proben jedoch auch größer. Für diese Beobachtung konnte bisher keine Erklärung gefunden werden.

Durch die 'target-Analyse' wurde im Kläranlagen-Ablauf des Klärwerkverbundes Köhlbrandhöft-Dradenau in Hamburg in mehreren Proben Bisphenol A ( $18 \pm 1$  ng/L bis  $33 \pm 1$  ng/L) und Nonylphenol ( $40 \pm 11$  ng/L bis  $170 \pm 16$  ng/L) bestimmt. Darüber hinaus wurde Östron nachgewiesen. Wegen seiner relativ starken Potenz wurde ein Beitrag von Östron zum östrogenen Potenzial der Proben schon bei Konzentrationen unterhalb der für diese Methode ermittelten Bestimmungsgrenze von 4 ng/L vermutet. Zwei Proben des Kläranlagen-Ablaufes besaßen ein östrogenes Potenzial, das jeweils einer Konzentration von 0,3 ng/L  $17\beta$ -Östradiol äquivalent wäre.

In einer Wasser-Probe aus dem tschechischen Fluss Bilina, in der Nähe der chemischen Industrieanlage Spolchemie, konnten Bisphenol A ( $28 \pm 2$  µg/L) und Nonylphenol ( $210 \pm 22$  ng/L) bestimmt werden. In dieser Probe konnte Östron ebenso nur nachgewiesen, jedoch nicht bestimmt werden. Das östrogene Potenzial dieser Probe entsprach 1,9 ng/L  $17\beta$ -Östradiol. In einer Probe aus der Abwasserfahne der Firma Synthesia wurde kein östrogenes Potenzial festgestellt.

Die angewandte BDCA war prinzipiell funktionsfähig. Allerdings waren die analytischen Bestimmungsgrenzen nicht ausreichend, um Konzentrationen von z.B.  $17\beta$ -Östradiol in Oberflächengewässern oder im Hefetest bereits wirksame Konzentrationen zu quantifizieren. Die Ergebnisse des Hefetest waren unter anderem aus diesem Grund zum Teil schwer interpretierbar.

Im Rahmen eines Projekts der wissenschaftlich-technischen Zusammenarbeit mit Kanada wurde ein Vergleich zwischen dem in dieser Arbeit verwendeten Hefetest und einem weiteren *in vitro*-Biotest für östrogene Substanzen auf der Basis von Fisch-Leberzellen durchgeführt. Anhand der beiden Standardsubstanzen  $17\beta$ -Östradiol und  $17\alpha$ -Ethinylestradiol und einigen Probenextrakten wurden die Tests miteinander verglichen. Als Resultat dieses Vergleichs wurde der Hefetest als empfindlicher eingestuft. Darüber hinaus erwies er sich als weniger zeit- und arbeitsintensiv.

### Ausblick

Zur Zeit stellen sich die Ergebnisse des Hefetests im Rahmen der BDCA als schwer interpretierbar dar. Um die Auswirkung der in dieser Arbeit gewählten 'target-Analyten' im Hefetest richtig einordnen zu können und eine Bestätigung der Hefetest-Ergebnisse von Realproben zu ermöglichen, ist ein Absenken der Bestimmungsgrenzen im chemisch-



analytischen Verfahren notwendig. Die analytischen Bestimmungsgrenzen von potenten Analyten wie  $17\beta$ -Östradiol oder Östron liegen bisher erheblich über den Nachweisgrenzen und den  $EC_{50}$ -Werten im Hefetest und ebenfalls oberhalb der in Oberflächengewässern vorkommenden Konzentrationen. Daher weisen reale Probenextrakte Wirkungen auf, die möglicherweise auf diese Analyte zurückgeführt werden können, die jedoch nicht durch die synthetischen Proben bestätigt werden konnten. In diesem Zusammenhang wäre eine Verbesserung der Bestimmungsgrenze insbesondere von  $17\beta$ -Östradiol um einen Faktor 20 wünschenswert. Für  $17\alpha$ -Ethinylestradiol, das ebenfalls im Hefetest sehr potent ist und eine Relevanz in Wasserproben besitzt, jedoch mit dem angewandten chemisch-analytischen Verfahren nicht selektiv nachgewiesen werden konnte, sollte das Verfahren diesbezüglich optimiert werden.

Weiterhin sollte eine chemische Feinfraktionierung entwickelt werden, die ein genaueres Zuordnen der Wirkungen im Hefetest ermöglichen würde. In diesem Zusammenhang sollte eine genauere Untersuchung des Einflusses von antiöstrogen wirkenden Substanzen im Hefetest stattfinden. Diese könnte Erklärungen für die Beobachtung liefern, dass die synthetischen Proben teilweise höhere Wirkung im Hefetest besaßen als die zugehörigen Realproben.

Nach einer Optimierung der 'target-Analyse' für die in dieser Arbeit untersuchten Analyten sollte auch die Detektions-Methode zur 'non-target-Analyse' weiterentwickelt werden, um die gesamten Vorteile einer wirkungsspezifischen Analyse auszuschöpfen. Die Möglichkeiten zur Strukturaufklärung und Identifizierung von unbekanntem Substanzen können durch die Nutzung einer Kopplung aus Flüssigchromatographie und Time-of-flight-Massenspektrometrie verbessert werden, da die Massenauflösung bei diesem Gerät höher ist, als bei den 'triple-stage quadrupole'-Geräten.



## 7 EXPERIMENTELLER TEIL

### 7.1 Verwendete Geräte

Autoklav	2540 EL, Fa. Tuttnauer
HPLC-System HP 1050	
Autosampler	HP1050, Fa. Agilent Technologies
Degaser	HP1050, Fa. Agilent Technologies
HPLC-Pumpe	HP1050, Fa. Agilent Technologies
UV-Detektor	HP1050, Fa. Agilent Technologies
HPLC-System HP 1100	
Autosampler	HP1100, Fa. Agilent Technologies
Degaser	HP1100, Fa. Agilent Technologies
HPLC-Pumpe	HP1100, Fa. Agilent Technologies
Säulenofen	HP1100, Fa. Agilent Technologies
UV-Detektor	HP1100, Fa. Agilent Technologies
Massenspektrometer	API 3000, Fa. Applied Biosystems / PE Sciex
Ionenquellen	Turboionspray, Fa. Applied Biosystems / PE Sciex Heated Nebulizer, Fa. Applied Biosystems / PE Sciex
Microplate Reader	rosys anthos 2010, Fa. Zinsser Analytic
Mikro-Auffanggefäße	2 mL, Fa. Wheaton
N <sub>2</sub> -Dewar	Bio 10, Fa. Messer
Pipetten	10–100 µL Fa. HTL, 100–1000 µL Fa. HTL, 8-Kanalpipette, Transferpette®-8, Fa. Brand
Rotationsverdampfer	Rotavapor M, Fa. Büchi
Schüttelinkubator	GFL 3031, Fa. GFL
Schüttelmaschine	Laboshake, Fa. Gerhardt
Sicherheitswerkbank Klasse II	Bio Safe 1.2, Fa. Holten
TCS-Trockentemperier-System	Fa. Labor Technik Barkey
Transferpette	5–25, Fa. Brand 20–100, Fa. Brand
UV-Photometer	UV-1601 PC, Fa. Shimadzu Scientific Instruments
Zentrifuge	Contifuge 17 S, Fa. Heraeus Sepatech

### 7.2 Verwendete analytische Standards

17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	Fa. SIGMA, Reinheit 98 %	E4876
17 $\beta$ -Östradiol-17-valerat	Fa. SIGMA, Reinheit 98 %	E1631
17 $\beta$ -Östradiol	Fa. SIGMA, Reinheit 98 %	E8875

4n-Octylphenol <sup>6</sup>	Promochem, Reinheit 99,5 %	CP643
Bisphenol A	Fa. Fluka, Reinheit 97 %	14939
Mestranol	Fa. SIGMA, Reinheit 98,3 %	E5001
Nonylphenol, technisches Gemisch	Fa. Riedel-de-Haën, Reinheit 94 %	46018
Östriol	Fa. SIGMA, Reinheit 99 %	E1253
Östron	Fa. SIGMA, Reinheit 99 %	E9750
Tamoxifen	Fa. SIGMA, Reinheit 99 %	T-5648

### 7.3 Verwendete Chemikalien

Adenin	Fa. Sigma	A2768
Agar Agar	Fa. Roth	5210.1
Ammoniumacetat, p.A.	Fa. Merck	1.01116
Ammoniumsulfat	Fa. Merck	1217
Biotin	Fa. Sigma	B4639
Chlorphenolrot- $\beta$ -D-Galactopyranosid	Fa. Roche Diagnostics	884308
D-(+)-Glucose	Fa. Sigma	G7021
Dichlormethan, Suprasolv	Fa. Merck	1.06054
Eisen(II)sulfat-Heptahydrat	Fa. Merck	1.03965
Ethanol, p.A.	Fa. Merck	1.00983
Glycerin	Fa. Roth	3783.1
Huminsäure Natriumsalz	Fa. Roth	7824.1
Inositol	Fa. Sigma	I7508
Kaliumdihydrogenphosphat	Fa. Merck	1.04873
Kaliumhydroxid	Fa. Merck	105033
Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat	Fa. Merck	102790
L-Arginin-HCl	Fa. Sigma	A3909
L-Asparaginsäure	Fa. Sigma	A4534
L-Glutaminsäure	Fa. Sigma	G5638
L-Histidin	Fa. Sigma	H9386
L-Isoleucin	Fa. Sigma	I7383
L-Leucin	Fa. Sigma	L1512
L-Lysin-HCl	Fa. Sigma	L1262
L-Methionin	Fa. Sigma	M2893
L-Phenylalanin	Fa. Sigma	P5030
L-Serin	Fa. Sigma	S5511
L-Threonin	Fa. Sigma	T1645
L-Tyrosin	Fa. Sigma	T1020
L-Valin	Fa. Sigma	V6504

---

<sup>6</sup> Beim Kauf des Octylphenols war das technische Gemisch erwartet worden; später stellte sich durch eine gaschromatographische Analyse heraus, dass es sich tatsächlich um das 4n-Octylphenol handelte.

Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Fa. Merck	1.05886
Methanol, LiChrosolv	Fa. Merck	1.06007
Millipore-Wasser	aus einer Reinstwasser-Anlage (Milli-Q Plus 185, Elix 5, Fa. Millipore)	
Natriumsulfat, p.A.	Fa. Merck	1.06649
Pantothensäure	Fa. Sigma	P6292
Pyridoxin	Fa. Sigma	P6280
Thiamin	Fa. Sigma	T1270

## 7.4 Verwendetes Verbrauchsmaterial

96-well-Mikrotiterplatten, Polystyrol	Fa. Brand	3930515
Desinfektionsmittel:	Softa-Man <sup>®</sup> , Fa. Braun	03865096
Filtriereinheit, 150 mL, 0,2 µm Poren	Fa. Nalgene	9.046.034
Kryovials, 2,0 mL	Fa. Nalgene	5000-0020
Pipettenspitzen	2–200 µL, Plastibrand, Fa. Brand	702516
	50–1000 µL, Plastibrand, Fa. Brand	702521
	5–300 µL, Tip-Set, Fa. Brand	702360
Reaktionsgefäße, 1,5 mL	Fa. Brand	780500
Verschlussfilm für Mikrotiterplatten	Fa. Roth	H770.1

## 7.5 Verwendete Software

Microplate Reader	Win Read, Version 2.10
UV-Photometer	UV - 2102/3102 PC Photometrie / Multiwellenlängen PC Spektroskopie-Software, Version 2.51
HP 1050	Chem Station, Rev. A 01.03, Fa. Agilent Technologies
API 3000	Analyst Version 1.1, Fa. PE Sciex
Microsoft Excel 97, SR-2	
Microsoft Word 97, SR-2	

## 7.6 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

### 7.6.1 AAV 1: Methode der Flüssig-Flüssig-Extraktion

Zur Flüssig-Flüssig-Extraktion werden 1,5 L der wässrigen Proben mit 50 mL Dichlormethan versetzt und mit der Schüttelmaschine 10 Minuten auf Stufe 9 geschüttelt. Nach der Phasentrennung wird die wässrige Phase zweimal mit je 30 mL Dichlormethan extrahiert, danach mittels 15%iger Salzsäure auf pH2 gebracht und zwei weitere Male mit je 30 mL

Dichlormethan extrahiert. Die gesammelten Extrakte werden im Vakuum (400 mbar) bei 30 °C am Rotationsverdampfer auf ca. 1 mL eingengt.

#### Weiterbehandlung ohne GPC-Fraktionierung

Der Extrakt wird in 1 mL Methanol aufgenommen und im Vakuum (400 mbar) bei 30 °C eingengt bis kein Dichlormethan mehr verdunstet. Die methanolische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, in einer Pasteurpipette, die mit gereinigter Watte gefüllt war, aufgenommen und in ein Mikro-Auffanggefäß gefüllt.

Der Extrakt wird unter einem Stickstoffstrom auf 200 µL eingengt und in zwei Aliquote zu je 100 µL aufgeteilt.

#### Weiterbehandlung für GPC-Fraktionierung

Die Dichlormethan-Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, in einer Pasteurpipette, die mit gereinigter Watte gefüllt war, aufgenommen und in ein Mikro-Auffanggefäß gefüllt. Dieser Extrakt wird unter einem Stickstoffstrom auf 200 µL eingengt und in zwei Aliquote zu je 100 µL aufgeteilt.

### 7.6.2 AAV 2: Gel-Permeations-Chromatographie

#### Experimentelle Bedingungen:

Säule: 5 µm Phenogel 5 nm, 30 cm x 7,8 mm I.D., Fa. Phenomenex  
 Stationäre Phase: Styrol-Divinyl Benzol Copolymer  
 Vorsäule: 5 µm Phenogel, 5 cm x 7,8 mm I.D., Fa. Phenomenex  
 Eluent: 100 % Dichlormethan  
 Fluss: 0,75 mL/min

Zur Fraktionierung der Proben mittels GPC werden 100 µL des nach AAV 1 gewonnenen Extrakts chromatographiert. Die GPC-Säule wurde für die Chromatographie in die HPLC HP1050 eingebaut. Bei der verwendeten Trennsäule beträgt sowohl das Volumen zwischen den Poren als auch das Poreninnenvolumen jeweils 6 mL. Somit ist bei einem Fluss von 0,75 mL/min bei einer Trennzeit kleiner 8 Minuten und größer 16 Minuten keine Elution der Analyten zu erwarten. In Tabelle 7.1 wird die Aufteilung der Fraktionen dargestellt.

Tabelle 7.1: Fraktionen in der GPC.

	Trennzeit / min	Volumen der Fraktion / mL
1. Fraktion	8 - 11	2,25
2. Fraktion	11 - 12	0,75
3. Fraktion	12 - 13	0,75
4. Fraktion	13 - 14	0,75
5. Fraktion	14 - 16	1,50

### 7.6.3 AAV 3: Hefetest

#### 7.6.3.1 Allgemeine Arbeitshinweise

Jegliche Arbeiten an den Hefezellen sowie deren Lagerung müssen innerhalb eines S1-Labores durchgeführt werden, welches nach § 8 GenTG anmeldepflichtig ist.

Um ein steriles Arbeiten gewährleisten zu können, müssen die Arbeiten mit den Hefezellen in der Sicherheitswerkbank durchgeführt werden, die vorher mindestens 20 Minuten laufen muss. Die Arbeitsfläche wird jeweils vor Beginn und nach Abschluss der Arbeiten an den Hefezellen z.B. mit dem Desinfektionsmittel Softa-Man<sup>®</sup>, Fa. Braun desinfiziert. Bei allen angesetzten Lösungen muss auf die Sterilität geachtet werden, d.h. die Gefäße dürfen nur unter der Sterilbank geöffnet werden.

#### Autoklavieren

Feste Gegenstände wie Glasgeräte, die keinerlei Flüssigkeit enthielten, werden bei 134 °C 7 Minuten autoklaviert. Flüssigkeiten werden bei 121°C 20 Minuten autoklaviert.

#### 7.6.3.2 Vorbereitung und Lagerung der Hefezellen

1. Tag: Um einen Vorrat an Hefezellen herzustellen, wird das Wachstumsmedium hergestellt (vgl. Abschnitt 7.6.3.3). In das fertige Wachstumsmedium werden 0,125 mL der eingefrorenen Zellen pipettiert. Die Suspension wird mindestens 24 Stunden bei 32 °C im Schüttelinkubator inkubiert.

2. Tag: Es wird wiederum Wachstumsmedium vorbereitet; von der 24-h-Kultur wird 1 mL in das Medium pipettiert. Dieses wird erneut mindestens 24h oder bis es trüb ist bei 32 °C inkubiert.

3. Tag: Die Suspension wird zentrifugiert (10 Minuten, bei 4250 upm). Der Überstand wird dekantiert und die Hefekultur wird in 5 mL Grundmedium (vgl. Abschnitt 7.6.3.3), das 15 % (v/v) Glycerin enthält, resuspendiert. Für das 15%ige (v/v) glycerinhaltige Grundmedium werden 8 mL steriles Glycerin in 45 mL Grundmedium gelöst. Die Hefesuspension wird in 0,5 mL-Aliquoten als 10fach konzentrierter Vorrat in Kryovials gefüllt.

Sie kann bei –20 °C maximal 4 Monate aufbewahrt werden.

#### 7.6.3.3 Vorschriften zum Ansetzen der Nährlösungen

Die Hefezellen werden im sogenannten Wachstumsmedium, das der Ernährung der Hefezellen dient, kultiviert. Dieses wird zu Beginn jeden Tests frisch angesetzt:

### Wachstumsmedium

5 mL Glucose-Lösung, 1,25 mL Asparaginsäure-Lösung, 0,5 mL Vitamin-Lösung, 0,4 mL Threonin-Lösung, 0,125 mL Kupfer(II)sulfat-Lösung wurden in einen mit 45 mL Grundmedium gefüllten Erlenmeyerkolben gegeben.

Die einzelnen Bestandteile des Wachstumsmediums werden wie folgt vorbereitet und wie angegeben gelagert.

### Grundmedium (pH 7,1)

13,61 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,98 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4,2 g KOH, 0,2 g  $\text{MgSO}_4$ , 1 mL  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ -Lösung (40mg/50mL), 50 mg L-Leucin, 50 mg L-Histidin, 50 mg Adenin, 20 mg L-Arginin-HCl, 20 mg L-Methionin, 30 mg Tyrosin, 30 mg L-Isoleucin, 30 mg L-Lysin-HCl, 25 mg L-Phenylalanin, 100 mg L-Glutaminsäure, 150 mg L-Valin sowie 375 mg L-Serin werden eingewogen und mit Millipore-Wasser auf 1 L aufgefüllt. Um die Löslichkeit zu erhöhen, wird das Medium unter Rühren auf ca. 60 °C erhitzt. Das Grundmedium wird in Aliquoten von 45 mL in 250 mL-Erlenmeyerkolben gefüllt; diese werden mit Alufolie verschlossen, autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### Glucose Lösung

20 g D-(+)-Glucose wird unter Rühren bei 60 °C in 100 mL Millipore-Wasser gelöst. Die Lösung wird in 10 mL-Aliquoten in 22 mL-Probengläschen gefüllt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

### Asparaginsäure-Lösung

80 mg L-Asparaginsäure werden unter Rühren bei 60 °C in 20 mL Millipore-Wasser gelöst. Die Lösung wird in 5 mL-Aliquote in 8 mL-Probengläschen gefüllt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

### Threonin-Lösung

240 mg L-Threonin werden unter Rühren bei 60 °C in 10 mL Millipore-Wasser gelöst. Die Lösung wird in 5 mL-Aliquote in 8 mL-Probengläschen gefüllt, autoklaviert und bei 4°C gelagert.

### Kupfersulfat-Lösung

Eine Lösung von 500 mg Kupfer(II)sulfat in 100 mL Millipore-Wasser wird filtersterilisiert<sup>7</sup> und in einer sterilen<sup>8</sup> Glasflasche bei Raumtemperatur gelagert.

---

<sup>7</sup> Filtersterilisieren: Die Flüssigkeit wird sterilisiert, indem sie durch einen Spritzenfilter mit einem Porenvolumen von 0,2 µm gefiltert wird.

<sup>8</sup> Steril: Ein Gefäß wurde autoklaviert, bevor eine filtersterilisierte Flüssigkeit eingefüllt wurde.



### Chlorophenolrot- $\beta$ -D-Galactopyranosid-Lösung (CPRG)

Eine Lösung von 50 mg Chlorophenolrot- $\beta$ -D-Galactopyranosid in 5 mL Millipore-Wasser wird filtersterilisiert und in einem sterilen Gefäß bei 4 °C aufbewahrt.

### Vitamin-Lösung

Zur Herstellung der Vitamin-Lösung werden 8 mg Thiamin (Vitamin B<sub>1</sub>), 8 mg Pyridoxin (Vitamin B<sub>6</sub>), 8 mg Pantothersäure (Vitamin B<sub>2</sub>), 40 mg Inositol, 20 ml Biotin (Vitamin H) (2 mg/100 mL) eingewogen und in 180 mL Millipore-Wasser gelöst. Die Lösung wird filtersterilisiert und in 10 mL Aliquoten bei 4 °C aufbewahrt.

#### 7.6.3.4 Testdurchführung

1. Tag: Vor dem eigentlichen Experimentbeginn muss die Übernachtskultur der Hefezellen angesetzt werden. Dem Wachstumsmedium werden 0,125 mL der eingefrorenen Hefezellen zugefügt. Die Suspension wird über Nacht (ca. 24h) bei 32 °C unter Schütteln (32 upm) inkubiert. Hierdurch erreicht die Hefe-Suspension bei  $\lambda = 640$  nm eine optische Dichte von ca. 1,0.

2. Tag: Die Mikrotiterplatte wird gemäß Abbildung 7.1 in drei bzw. vier Bereiche aufgeteilt. Zur Negativkontrolle werden in einzelnen Spalten der Platte jeweils 10  $\mu$ L reinen Lösungsmittels (i.d.R. Methanol) pipettiert. Ein weiterer Bereich wird mit einer Verdünnungsreihe der Positivkontrolle 17 $\beta$ -Östradiol zu je 10  $\mu$ L ( $1 \cdot 10^{-7}$  bis  $1 \cdot 10^{-10}$  mol/L, 1:3 verdünnt) gefüllt. In ein bzw. zwei weitere Bereiche werden Verdünnungsreihen der Probe (1:2 verdünnt, Konzentrationsbereich abhängig von Wirkungsstärke der Substanz) pipettiert. Die Verdünnungen werden jeweils frisch angesetzt. Die Platten bleiben ca. 10–15 Minuten unter der Sicherheitswerkbank stehen, bis das Lösungsmittel verdunstet ist.

Währenddessen wird ausreichend Wachstumsmedium für die vorbereiteten Mikrotiterplatten hergestellt. Der einfache Ansatz reicht für zwei Mikrotiterplatten. Diesem Wachstumsmedium werden 0,5 mL CPRG- Lösung und je nach Wachstum der Hefe ein entsprechendes Volumen der Übernachtskultur zugegeben. Die optische Dichte wird mit einem UV-Photometer bestimmt. Es wird ein Volumen der Übernachtskultur zugefügt, das 0,8 mL bei einer optischen Dichte von 0,7 ( $\lambda = 640$  nm) entsprach. Von diesem Wachstumsmedium werden mit Hilfe der Mehrkanalpipette jeweils 200  $\mu$ L in die Öffnungen der Mikrotiterplatte gegeben. Die Platte wird mit einer Klebefolie luftdicht verschlossen.

2.– 4. Tag: Die Platten werden unter Schütteln (80 upm) bei 32 °C inkubiert.

4. Tag: Nach ca. 72 h wird mit dem Microplate-Reader die Extinktion der Proben bei  $\lambda = 540$  nm (Färbung) und  $\lambda = 640$  nm (Trübung) ermittelt.

Zur Vernichtung der Hefezellen werden die fertigen Platten sowie jeglicher Abfall oder Glasgeräte, die mit den Hefezellen in Kontakt kamen, für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Anschließend können Feststoffe über den Restmüll und Flüssigkeiten über die Kanalisation entsorgt werden; Glasgeräte werden nach dem Autoklavieren gereinigt (AAV 6).

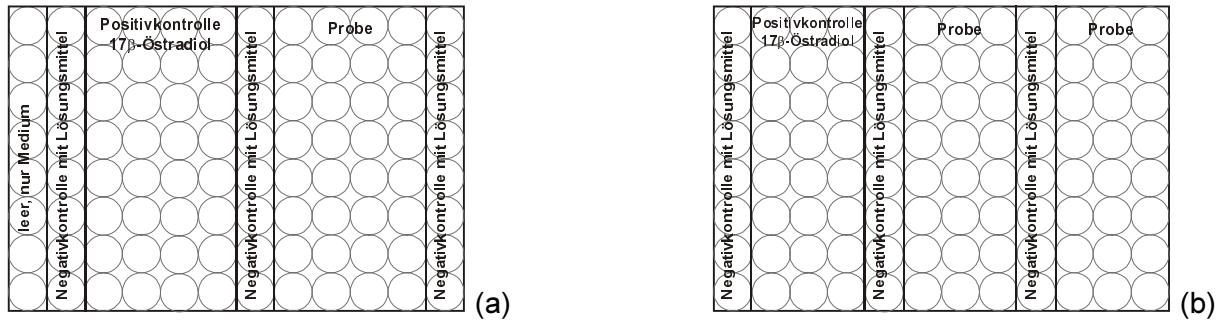


Abbildung 7.1: Beispiel für die Verteilung von Positivkontrolle, Negativkontrollen und Probe auf der Mikrotiterplatte, (a) bei Vorversuchen, wenn ausreichend Platz zur Verfügung steht, (b) wenn ein hoher Probendurchsatz bewältigt werden muss.

#### 7.6.4 AAV 4: Hochleistungsflüssigchromatographie

Für alle Messungen wurde folgende HPLC-Methode angewandt:

##### Experimentelle Bedingungen:

Säule: 5 µm Discovery™ RP-AmideC16, 15 cm x 2,1 mm I.D.,  
Fa. SUPELCO

Vorsäule: 5 µm Discovery™ RP-AmideC16, 2 cm x 2,1 mm I.D., Fa. SUPELCO

Eluent: **A:** 0,625 mM Ammoniumacetat in Wasser  
**B:** Methanol mit 0,625 mM Ammoniumacetat

Fluss: 0,15 mL/min

Equilibrierzeit (Zeile 0): 15 min, 50 % **B**

Gradient: 1 min 50 % **B** / 34 min 100 % **B** / 5 min 100 % **B** / 4 min 50 % **B**

Tabelle 7.2: Retentionszeiten für die Analyte.

Analyt	Retentionszeiten / min
Bisphenol A	16,6
17β-Ostradiol-17-valerat	35,6
17α-Ethinylestradiol	23,4
17β-Ostradiol	23,2
Östriol	12,0
Östron	20,2
Mestranol	29,1
Nonylphenol	31,8
4-Octylphenol	33,5

### 7.6.5 AAV 5: Massenspektrometrie

#### Multiple Reaction Monitoring-Methode für Turboionspray-Ionisierung:

Die Datenaufnahme des Massenspektrometers beträgt 40 Minuten. Die 4 Minuten, die der HPLC-Gradient länger beansprucht, dient der Einstellung des Anfangsgradienten.

Die Datenaufnahme innerhalb von 40 Minuten ist in fünf Perioden unterteilt.

#### Periode 1:

Dauer: 20 Minuten

Dwell Time: 150 msec

Ionisierungsmodus: negativ

Scan-Typ: MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Ionenübergänge m/z (%): 269,4/145,0 (100) [(M-H)<sup>-</sup> - C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O], 269,4/143,0 (37)  
 [(M-H)<sup>-</sup> - C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O], 287,4/170,9 (100) [(M-H)<sup>-</sup> - C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>], 287,4/145,0 (60)  
 [(M-H)<sup>-</sup> - C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>], 227,3/132,7 (100) [(M-H)<sup>-</sup> - C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O], 227,3/116,9 (18)

#### Periode 2:

Dauer: 5 Minuten

Dwell Time: 150 msec

Ionisierungsmodus: negativ

Scan-Typ: MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Ionenübergänge m/z (%): 295,4/142,8 (100) [(M-H)<sup>-</sup> - C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O], 295,4/183,0 (43)  
 [(M-H)<sup>-</sup> - C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O], 271,4/183,0 (86) [(M-H)<sup>-</sup> - C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O], 271,4/145,0 (100)  
 [(M-H)<sup>-</sup> - C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O]

#### Periode 3:

Dauer: 4 Minuten

Dwell Time: 200 msec

Ionisierungsmodus: positiv

Scan-Typ: MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Ionenübergänge m/z (%): 311,4/121,1 (100) [(M+H)<sup>+</sup> - C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>O]

#### Periode 4:

Dauer: 4,2 Minuten

Dwell Time: 150 msec

Ionisierungsmodus: negativ

Scan-Typ: MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Ionenübergänge m/z (%): 219,4/132,7 (100) [(M-H)<sup>-</sup> - C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>], 219,4/146,7 (10)  
 [(M-H)<sup>-</sup> - C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>], 205,2/106,1 (100) [(M-H)<sup>-</sup> - C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>], 205,2/188,7 (1)

Periode 5:

Dauer: 6,8 Minuten

Dwell Time: 200 msec

Ionisierungsmodus: positiv

Scan-Typ: MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Ionenübergänge m/z (%): 374,1/255,2 (100) [(M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup> – C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>], 374,1/159,0 (67)  
[(M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup> – C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>O<sub>2</sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]

In Tabelle 7.5 sind für jeden Analyten die genauen Parameter-Einstellungen für das Turboionspray aufgeführt. Sie wurden bei jedem Ionenübergang auf die maximale Intensität optimiert. Diese Einstellungen können sich jedoch ändern, wenn z.B. das Massenspektrometer gewartet oder gereinigt wird. Daher müssen sie nach größeren Eingriffen an dem Gerät geprüft und gegebenenfalls neu angepasst werden.

Die Methode für die Ionenquelle 'Heated Nebulizer' entspricht in der Aufteilung der Perioden und in den Parametern für die verschiedenen Spannungen der Methode für das Turboionspray. Statt der Ionenspray-Spannung wird die Spannung an der Corona-Entladungsnadel angegeben; und statt der Temperatur für den Gasgegenstrom wird die Temperatur, mit der das Quarzrohr beheizt wird, benötigt. Die sich unterscheidenden Werte werden im Folgenden angegeben.

Tabelle 7.3: Parameter für den 'Heated Nebulizer', die sich von Turboionspray-Ionenquelle unterscheiden.

	Strom an der Corona- Entladungsnadel / $\mu\text{A}$	Temperatur / $^{\circ}\text{C}$
Periode 1	-3	400
Periode 2	-3	400
Periode 3	+3	400
Periode 4	-3	400
Periode 5	+3	400

Tabelle 7.4: Verhältnis der Ionenübergänge zueinander.

Analyt	Ionenübergänge	Verhältnis / %
Bisphenol A	227,3/116,9 : 227,3/132,7	18 %
17 $\beta$ -Östradiol-17-valerat	374,1/159,0 : 374,1/255,2	65 %
17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	295,4/183,0 : 295,4/142,8	45 %
17 $\beta$ -Östradiol	271,4/145,0 : 271,4/183,0	120 %
Östriol	287,4/145,0 : 287,4/170,9	55 %
Östron	269,4/143,0 : 269,4/145,0	36 %
Mestranol	–	–
Nonylphenol	219,4/146,7 : 219,4/132,7	12 %
4-Octylphenol	–	–

Tabelle 7.5: Einstellung der Parameter am API 3000 für die Turboionspray-Ionenquelle.

	17 $\beta$ -Östradiol	17 $\alpha$ -Ethinyl- estradiol	Östron	Östriol	Mestranol	Bisphenol A	17 $\beta$ -Östradiol- 17-valerat	Nonylphenol	Octylphenol
Summenformel	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O
Molmasse / (mol/L)	272,178	296,178	270,162	288,173	310,193	228,115	356,235	220,183	206,167
Mutterion / (m/z)	271,4	295,4	269,4	287,4	311,4	227,3	374,1	219,4	205,2
Tochterionen / (m/z)	183	142,8	145	170,9	121,1	132,7	255,2	132,7	106,1
Zeit / msec	150	150	150	150	200	150	200	150	150
Ionisierungsmodus	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ	negativ
Nebulizer Gas	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Curtain Gas	15	15	15	15	8	15	8	15	15
Collision Gas	5	5	5	5	4	5	4	5	5
Ionenspray- spannung / V	-4000	-4000	-4000	-4000	4200	-4000	4200	-4000	-4000
Temperatur / °C	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Declustering Potential / V	-110	-100	-95	-110	50	-60	35	-50	-55
Focusing Potential / V	-105	-140	-125	-145	225	-220	160	-250	-250
Entrance Potential / V	10	10	10	10	-10	10	-10	10	10
Collision Energy	-60	-74	-55	-75	35	-42	18	-45	-38
Cell Exit Potential / V	-10	-11	-7	-9	7	-5	18	-6	-8

### 7.6.6 AAV 6: Reinigung der Glasgeräte

Glasgeräte werden in der Spülmaschine bei 90 °C mit mildalkalischem Laborreiniger gespült und anschließend getrocknet. Pasteur-Pipetten und Glasvials werden im Ultraschallbad in Aceton gereinigt, getrocknet und vor Gebrauch mit dem benötigten Lösungsmittel gespült. Probengläschen werden über Nacht in einem 5%igen (v/v) RBS 50-Bad (Fa. Roth) gereinigt, anschließend sorgfältig drei Mal mit entionisiertem Wasser gespült und getrocknet. Der Trockenvorgang findet in der Regel acht Stunden bei 250 °C in einem Trockenschrank statt. Graduierte Glasgeräte werden bei 60 °C getrocknet.

### 7.6.7 AAV 7: Herstellung von Standardlösungen

#### Stammlösungen

Die Reinstsubstanz wird bei Raumtemperatur in einem Schraubdeckelgefäß eingewogen (minimale Einwaage 5 mg), und anschließend wird die erforderliche Menge Methanol zupipettiert und ebenfalls eingewogen.

#### Verdünnungen

Das benötigte Volumen wird mit Hilfe eines Transferpipettors abgenommen, in ein sauberes Schraubdeckelglas gefüllt und die nötige Menge Methanol zupipettiert. Die jeweiligen Mengen werden ausgewogen.

## 7.7 Übersicht über Probenbehandlung

Tabelle 7.6: Behandlung der verschiedenen Proben

	Kläranlage 12.02.2001	Kläranlage 29.05.2001	Kläranlage 17.07.2001	Kläranlage 06.09.2001	Bilina 22.08.2001	Synthesia 22.08.2001
Anzahl Parallelansätze	1	3	3	2	2	1
Probenvolumen / L	20	1,5	1,5	1,5	1,5	2
Volumen nach Aufkonzentrierung / $\mu\text{L}$	300	200	200	250	250	300
In GPC injiziertes Volumen / $\mu\text{L}$	–	–	–	100	100	100
Volumen nach Aufkonzentrierung der GPC-Fraktionen / $\mu\text{L}$	–	–	–	300	300	300
Injektionsvolumen in LC / $\mu\text{L}$	5	10	20	10	10	10
Volumen für Hefetest / $\mu\text{L}$	10	–	–	10	10	10

## 8 LITERATUR

- Arnold S.F., Klotz D.M., Collins B.M., Vonier P.M., Guillette L.J., McLachlan Jr. J.A. (1996): Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science* **272**: 1489-1492.
- Ashby J., Lefevre P.A., Odum J., Harris C.A., Routledge E.J., Sumpter J.P. (1997): Synergy between synthetic oestrogens? *Nature* **385**: 494.
- Ashby J., Lefevre P.A., Odum J., Tinwell H., Kennedy S.J., Beresford N., Sumpter J.P. (1997): Failure to confirm estrogenic activity for benzoic acid and clofibrate: Implications for lists of endocrine-disrupting agents. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **26**: 96-101.
- Belfroid A.C., Van der Horst A., Vethaak A.D., Schäfer A.J., Rijs G.B.J., Wegener J., Cofino W.P. (1999): Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands. *The Science of the Total Environment* **225**: 101-108.
- Bescheid des Ministeriums für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein zur Anmeldung der gentechnischen Anlage 06/99 (S1), GKSS Geesthacht vom 23.08.1999.
- Bolz U., Körner W., Hagenmaier H. (1998): Development and validation of a GC/MS-method for determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples. *Organohalogen Compounds* **35**: 93-96.
- Bolz U., Körner W., Hagenmaier H. (2000): Development and validation of a GC/MS method for determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples. *Chemosphere* **40**: 929-935.
- Brack W., Altenburger R., Ensenbach U., Möder M., Segner H., Schüürmann G. (1999): Bioassay-directed identification of organic toxicants in river sediment in the industrial region of Bitterfeld (Germany) – A contribution to hazard assessment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **37**: 164-174.
- Breinholt V., Larsen J.C. (1998): Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay. *Chem. Res. Toxicol.* **11**: 622-629.
- Casellas M., Fernandez P., Bayona J.M., Solanas A.M. (1995): Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona. *Chemosphere* **30** (4): 725-740.
- Choi B.K., Hercules D.M., Gusev A.I. (2001): LC-MS/MS signal suppression effects in the analysis of pesticides in complex environmental matrices. *Fresenius J. Anal Chem.* **369**: 370-377.
- Colborn T., Dumanoski D., Myers J.P. (1996): Our Stolen Future. Are we threatening our fertility, intelligence, and survival? – A scientific detective story. Penguin Books Ltd. New York.
- Colborn T., vom Saal F.S., Soto A.M. (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* **101** (5): 378-384.
- 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. (1998): Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. *Environmental Health Perspectives* **106**, Suppl. 1: 11-56.
- Croley T.R., Hughes R.J., Koenig B.G., Metcalfe C.D., March R.E. (2000): Mass spectrometry applied to the analysis of estrogens in the environment. *Rapid Communications In Mass Spectrometry* **14**: 1087-1093.

- Der Laborkatalog Merck. Chemikalien und Reagenzien. 2001.
- Desbrow C., Routledge E., Sheehan D., Waldock M., Sumpter J. (1996): The Identification and Assessment of Oestrogenic Substances in Sewage Treatment Works Effluents. *Environment Agency. R&D Project 490*. Bristol.
- Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P., Waldock M. (1998): Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science & Technology* **38** (11): 1549-1558.
- Dingermann T. (1999): Gentechnik, Biotechnik: Prinzipien und Anwendungen in Pharmazie und Medizin. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Feldman D. (1995): Editorial: Estrogens from plastic - are we being exposed? *Endocrinology* **138** (5): 1777-1779.
- Fent K. (1998): Ökotoxikologie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York.
- Ferguson P.L., Iden C.R., Brownawell B.J. (2000): Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in the aquatic environment using liquid chromatography – electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **72**: 4322-4330.
- Fiehn, O. (1997): Toxizitätsgeleitete Fraktionierung und Charakterisierung organischer Schadstoffe in gewerblichen Abwässern. VDI-Verlag, Düsseldorf.
- Fleming J., Albus H., Neidhart B., Wegscheider W. (1997): Glossary of analytical terms (VII). *Accred Qual Assur* **2**: 51-52.
- Fry D.M., Toone C.K. (1981): DDT-Induced Feminization of Gull Embryos. *Science* **213**: 922-924.
- Gentechnikgesetz, Gesetz zur Regelung der Gentechnik – GenTG, Fassung vom 16. Dezember 1993. (BGB1.I 1993 S. 2066; 1994 S. 1416; 1997 S. 2390).
- Graumann K., Jungbauer A. (2000): Agonistic and synergistic activity of tamoxifen in a yeast model system. *Biochemical Pharmacology* **59**: 177-185.
- Greim H. (1998): Hormonähnlich wirkende Stoffe in der Umwelt – Einführung und Sachstand. *Mitteilungsblatt der GDCH-Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie* **3**: 4-8.
- Gülden M., Turan A., Seibert H. (1997): Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. Umweltbundesamt (Hrsg.). *UBA-FB 97-068. UBA-Texte 46/97*. Berlin.
- Hamburger Stadtentwässerung (Hg.) (2000): Abwasserbehandlung in Hamburg. 3. Auflage.
- Hannigan M.P., Cass G.R., Penman B.W., Crespi C.L., Lafleur A.L., Busby Jr. W.F., Thilly W.G., Simoneit B.R.T. (1998): Bioassay-Directed Chemical Analysis of Los Angeles Airborne Particulate Matter Using a Human Cell Mutagenicity Assay. *Environmental Science & Technology* **32** (22): 3502-3514.
- Harries C.A., Henttu P., Parker M.G., Sumpter J.P. (1997): The estrogenic activity of phthalate esters In Vitro. *Environmental Health Perspectives* **105** (8): 802-811.
- Heisterkamp I. (2000): Identification of Xenoestrogens in Surface Waters Utilising Bioassay-Directed Chemical Analysis. Poster. Abstract Band: 3rd SETAC World Congress, 10th Annual Meeting of SETAC Europe.
- Heisterkamp I. (2001): Identification of Estrogen-like Acting Substances in Water Samples Utilising Bioassay-directed Chemical Analysis. Poster. Abstract Band: Abstracts - Second Status Seminar, Endocrine Disrupters.



- Hesse M., Meier H., Zeeh B. (1995): *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 5., überarb. Aufl. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York.
- Holtey-Weber R.I., Färber H.A., Schöler H.F. (1999): On-Line-Silylierung zur Analytik von endokrin wirksamen Substanzen in Wasser mittels GC-MSMS. *Vom Wasser* **92**: 1-9.
- Jobling S., Sumpter J.P. (1993): Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology* **27**: 361-372.
- Karlson P., Doenecke D., Koolman J. (1994): *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 14. Neubearb., Aufl. Stuttgart.
- Körner W., Bolz U., Süßmuth W., Hiller G., Schuller W., Hanf V., Hagenmaier H. (2000): Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere* **40**: 1131-1142.
- Körner W., Spengler P., Bolz U., Schuller W., Hanf V., Metzger J.W. (2001): Substances with Estrogenic Activity in Effluents of Sewage Treatment Plants in Southwestern Germany. 2. Biological Analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20** (10): 2142-2151.
- Laganà A., Bacaloni A., Fago G., Marino A. (2000): Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry* **14**: 401-407.
- Lee H.B., Peart T. (1998): Determination of 17 $\beta$ -Estradiol and its metabolites in sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography / mass spectrometry. *Journal of AOAC International* **81** (6): 1209-1216.
- Matthiessen P. (2000): Is Endocrine Disruption a Significant Ecological Issue? *Ecotoxicology* **9**: 21-24.
- Meyer V.R. (1999): *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. 8., überarbeitete Auflage. Salle + Sauerländer.
- Mount D.I., Anderson-Carnahan L. (1988): Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase I Toxicity Characterization Procedures. *EPA/600/3-88-34*. U.S. Environmental Protection Agency.
- Mount D.I., Anderson-Carnahan L. (1988): Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase II Toxicity Identification Procedures. *EPA/600/3-88-35*. U.S. Environmental Protection Agency.
- Mount D.I., Anderson-Carnahan L. (1988): Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations: Phase III Toxicity Confirmation Procedures. *EPA/600/3-88-36*. U.S. Environmental Protection Agency.
- Navas J.M., Segner H. (1998): Antiestrogenic activity of anthropogenic and natural chemicals. *Environ. Sci. & Pollut. Res.* **5** (2): 75-82
- Neumann B.<sup>9</sup>, Francke W. (2001): Biotest-geleitete chemische Analyse von Sedimenten unterschiedlicher Belastung. In: Calmano W. (Hrsg.): *Untersuchung und Bewertung von Sedimenten*. Springer Verlag Berlin: 445-462.
- Niessen W.M.A. (1998): Advances in instrumentation in liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques. *Journal of Chromatography A* **794**: 407-435.

---

<sup>9</sup> Neumann B., geb. Schmidt B.

- Niessen W.M.A. (1999): State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **856**: 179-197.
- Ockels W. (1999): Interpretation von Massenspektren. Grundkurs. Spectral Service.
- Parker, G. (1993): Mortyn Jones Memorial Lecture - Structure and Function of the Oestrogen Receptor. *Journal of Neuroendocrinology* **5**: 223-228.
- PE Biosystems: API 3000 Operator Training Course, Analyst-NT.
- Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R., Sumpter J.P. (1994): Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology* **8**: 275-285.
- Reemtsma T., Fiehn O., Jekel M. (1999): A modified method for the analysis of organics in industrial wastewater as directed by their toxicity to *Vibrio fischeri*. *Fresenius J. Anal. Chem* **363**: 771-776.
- Routledge E.J., Sumpter J.P. (1996): Estrogenic Activity of Surfactants and some of their Degradation Products assessed using a Recombinant Yeast Screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15** (3): 241-248.
- Routledge E.J., Sumpter J.P. (1997): Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *The Journal of Biological Chemistry* **272** (6): 3280-3288.
- Safe S. (1990): Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-1,4-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDF), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalent factors (TEFs). *Crit. Rev. Toxicol.* **21**: 51-88.
- Safe S.H. (1995): Environmental and dietary estrogens and human health: Is there a problem? *Environmental Health Perspectives* **103** (4): 346-351.
- Schäfer W.R., Zahradnik H.P., Frijus-Plessen N., Schneider K. (1996): Anthropogene Substanzen mit unerwünschter Östrogenwirkung. *Umweltmed. Forsch. Prax.* **1** (1): 35-42.
- Schlett C., Pfeifer B. (1996): Bestimmung von Steroidhormonen in Trink- und Oberflächenwässern. *Vom Wasser* **87**: 327-333.
- Schmidt B. (1999): Biotest-geleitete chemische Analyse von Sedimenten. Dissertation. Universität Hamburg.
- Schuetzle D., Lewtas J. (1986): Bioassay-Directed Chemical Analysis in Environmental Research. *Anal. Chem.* **58**, 1060A – 1075A.
- Schwedt G. (1995): Analytische Chemie. Grundlagen, Methoden und Praxis. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Seibert H. (1996): Störungen der Entwicklung und Funktion des männlichen Reproduktionssystems. *UWSF* **8**: 275-284.
- Sheahan D.A., Brighty G.C., Daniel M., Kirby S.J., Hurst M.R., Kennedy J., Morris S., Routledge E.J., Sumpter, J.P., Waldock M.J. (2002): Estrogenic Activity Measured in a Sewage Treatment Works Treating Industrial Inputs Containing High Concentrations of Alkylphenolic Compounds – a Case Study. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21** (3): 507-514.
- Shen J.H., Gutendorf B., Vahl H.H.; Shen L.; Westendorf J. (2001): Toxicological profile of pollutants in surface water from an area in Taihu Lake, Yangtze Delta. *Toxicology* **166**: 71-78.
- Sherry J., Gamble A., Fielden M., Hodson P., Burnison B., Solomon K. (1999): An ELISA for brown trout (*Salmo trutta*) vitellogenin and its use in bioassays for environmental estrogens. *The Science of the Total Environment* **225**: 13-31.

- Snyder S.A., Keith T.L., Verbrugge D.A., Snyder E.M., Gross T.S., Kannan K., Giesy J.P. (1999): Analytical Methods for Detection of Selected Estrogenic Compounds in Aqueous Mixtures. *Environmental Science & Technology* **33**: 2814-2820.
- Snyder S.A., Villeneuve D.L., Snyder E.M., Giesy J.P. (2001): Identification and Quantification of Estrogen Receptor Agonists in Wastewater Effluents. *Environmental Science & Technology* **35**: 3620-3625.
- Sohoni P., Sumpter J.P. (1998): Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology* **158**: 327-339.
- Soto A.M., Lin T.M., Justicia H., Silvia R.M., Sonnenschein C. (1992): An "In Culture" Bioassay to Assess the Estrogenicity of Xenobiotics (E-Screen). In: Colborn T., Clement C. (Eds.) (1992): Chemically-induced alterations in sexual development: the wildlife / human connection: 295-309.
- Spengler P., Körner W., Metzger J.W. (1999): Schwer abbaubare Substanzen mit östrogenartiger Wirkung im Abwasser von kommunalen und industriellen Kläranlagenabläufen. *Vom Wasser* **93**: 141-157.
- Spengler P., Körner W., Metzger J.W. (2001): Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20** (10): 2133-2141.
- Stumpf M., Ternes T.A., Haberer K., Baumann, W. (1996): Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern. *Vom Wasser* **87**: 251-261.
- Sumpter J.P., Jobling S. (1995): Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* **103** (suppl. 7): 173-178.
- Ternes T.A., Brenner-Weiß G., Eggert T., Müller J., Kirschhöfer F., Nusser M., Wilken R.D., Obst U. (1999): Analysis of Phytoestrogens and Mycoestrogens in Water Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometry (LC-MSMS). *Vom Wasser* **93**: 255-263.
- Ternes T.A., Stumpf M., Mueller J., Haberer K., Wilken R.D., Servos M. (1999): Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of the Total Environment* **225**: 81-90.
- Thomas K.V., Hurst M.R., Matthiessen P, Waldock M.J. (2001): Characterization of Estrogenic Compounds in Water Samples Collected from United Kingdom Estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20** (10): 2165-2170.
- Vack A. (1996): Östrogene Wirkung von Xenobiotika. Forschungsstand und Konsequenzen für die Bewertung der Umweltrelevanz von Chemikalien. *Z. Umweltchem. Ökotox.* **8** (4): 222-226.
- Verordnung über die Sicherheitsstufen und Sicherheitsmaßnahmen bei gentechnischen Arbeiten in gentechnischen Anlagen, Gentechnik-Sicherheitsverordnung – GenTSV, Fassung vom 24. Oktober 1990. (BGB1.I. S. 2340; ...; BGB1I 1995 S. 285)
- Wegener G., Persin J., Karrenbrock F., Rörden O., Hübner I. (1999): Vorkommen und Verhalten von natürlichen und synthetischen Östrogenen und deren Konjugaten in der aquatischen Umwelt. *Vom Wasser* **92**: 347-360.
- Wenzel A., Schmitz A. (1998): Östrogene Wirkung von Umweltchemikalien. Teilthema 5: Entwicklung und Erprobung eines in vitro Test-Systems mit einer gentechnisch veränderten Hefe. *UBA-Forschungsplan 108 02 899/05*.

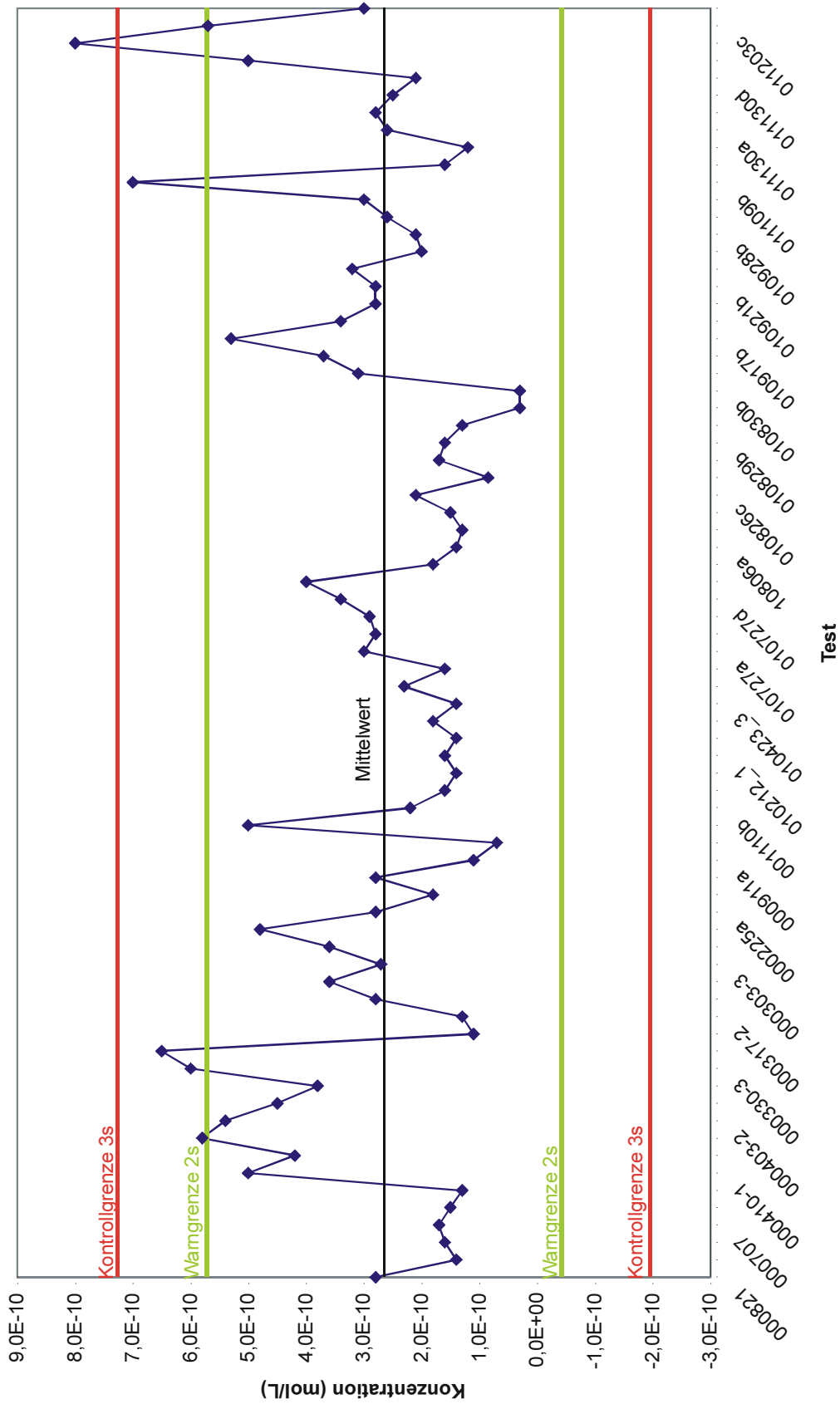
Zabel E.W., Cook P.M., Peterson R.E. (1995): Toxic equivalency factors of polychlorinated dibenzo-1,4-dioxin, dibenzofuran and biphenyl congeners based on early life stage mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* **31**: 315-328.

## Anhang

### *Anhang 1      Konzentrationen der Stammlösungen*

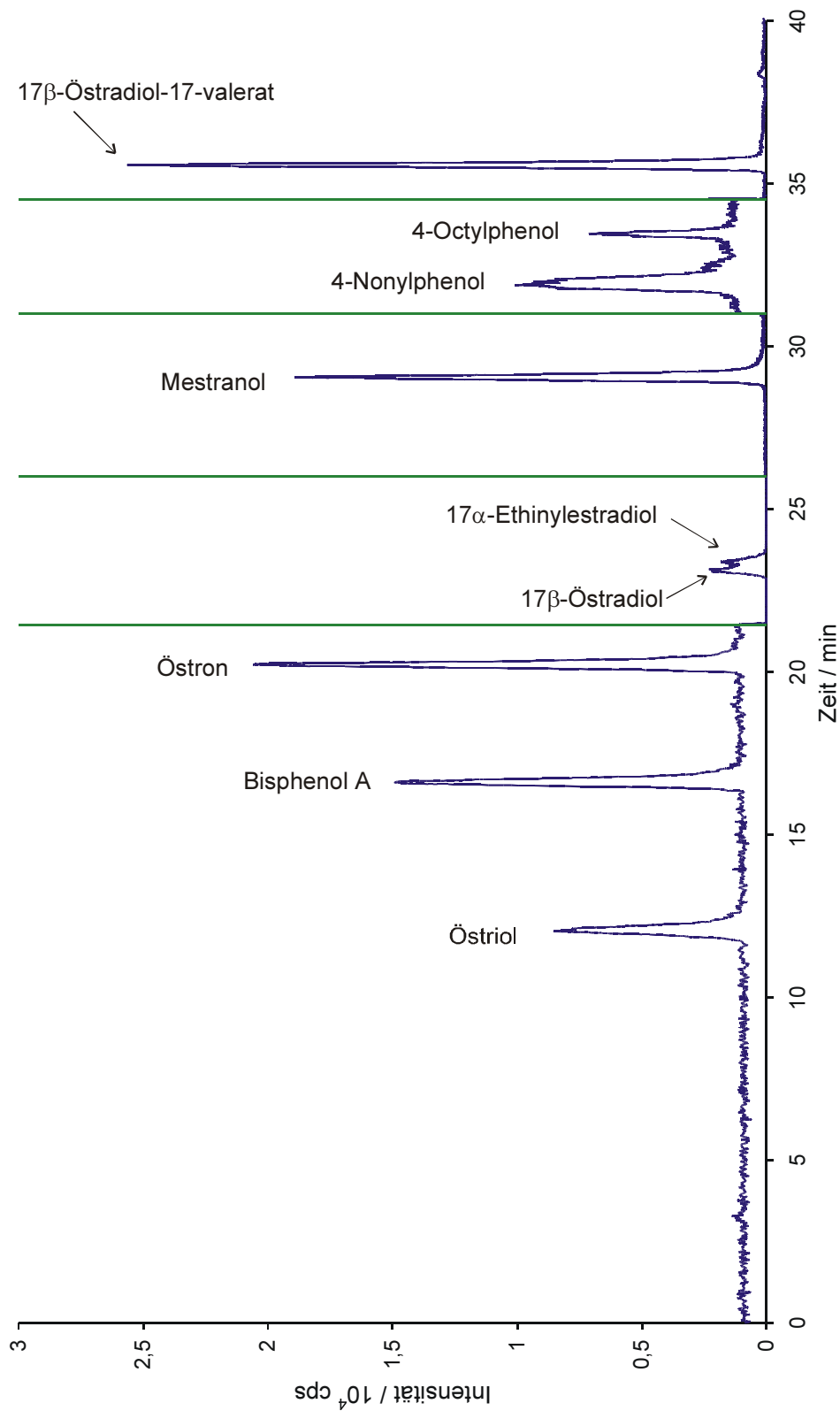
Analyt	Konzentration / (mg/mL)	Konzentration / ( $10^{-3}$ mol/L)
17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	1,024	3,455
17 $\beta$ -Östradiol	0,992	3,639
17 $\beta$ -Östradiol-17-valerat	0,998	2,799
Bisphenol A	0,999	4,376
Mestranol	0,958	3,086
Nonylphenol	0,940	4,266
Octylphenol	0,996	4,830
Östriol	1,156	4,008
Östron	1,122	4,150

**Anhang 2 Kontrollkarte über den  $EC_{50}$ -Wert von  $17\beta$ -Östradiol im Hefetest**



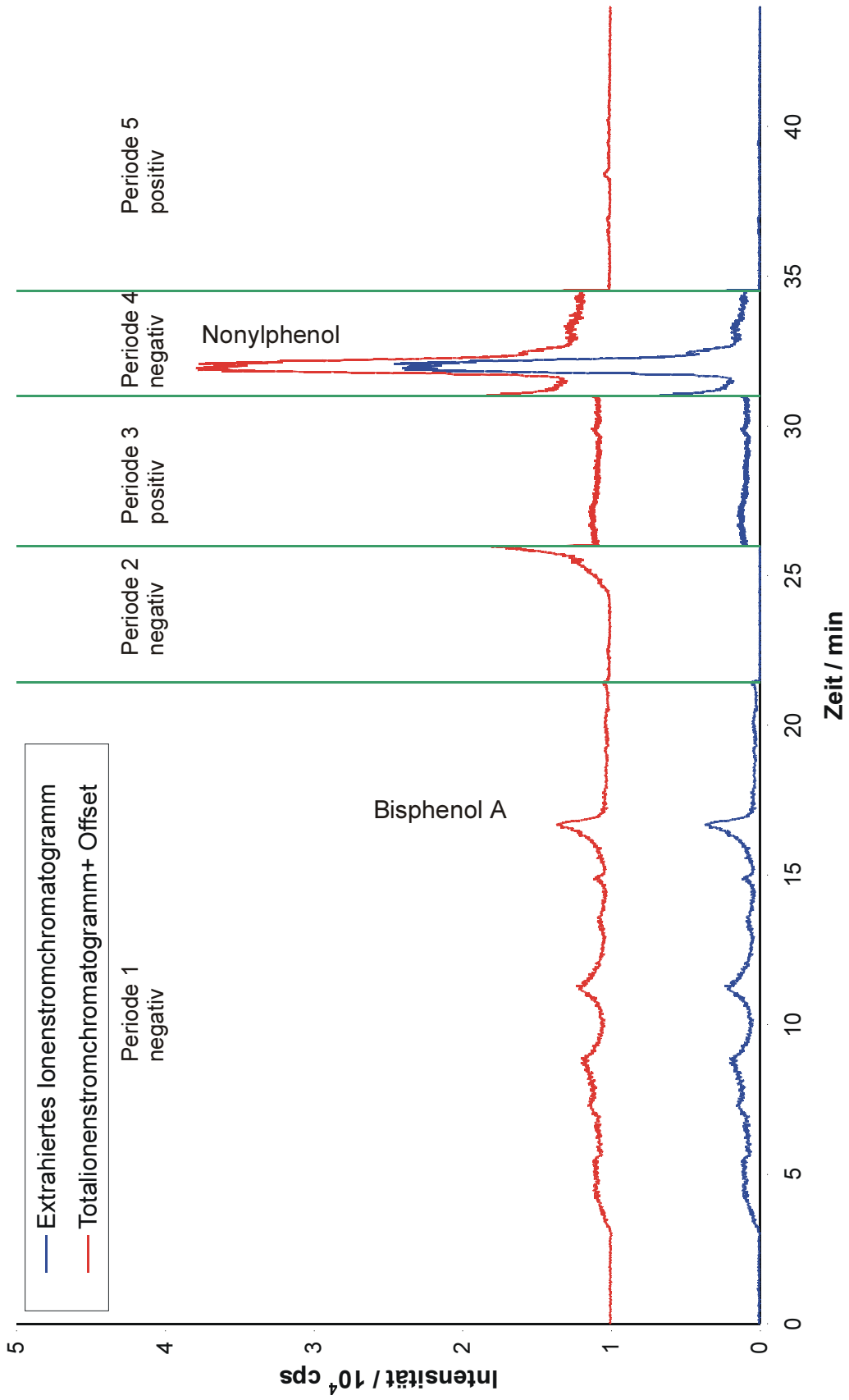
## Anhang 3 Chromatogramme

### A Chromatogramm für eine Standardlösung



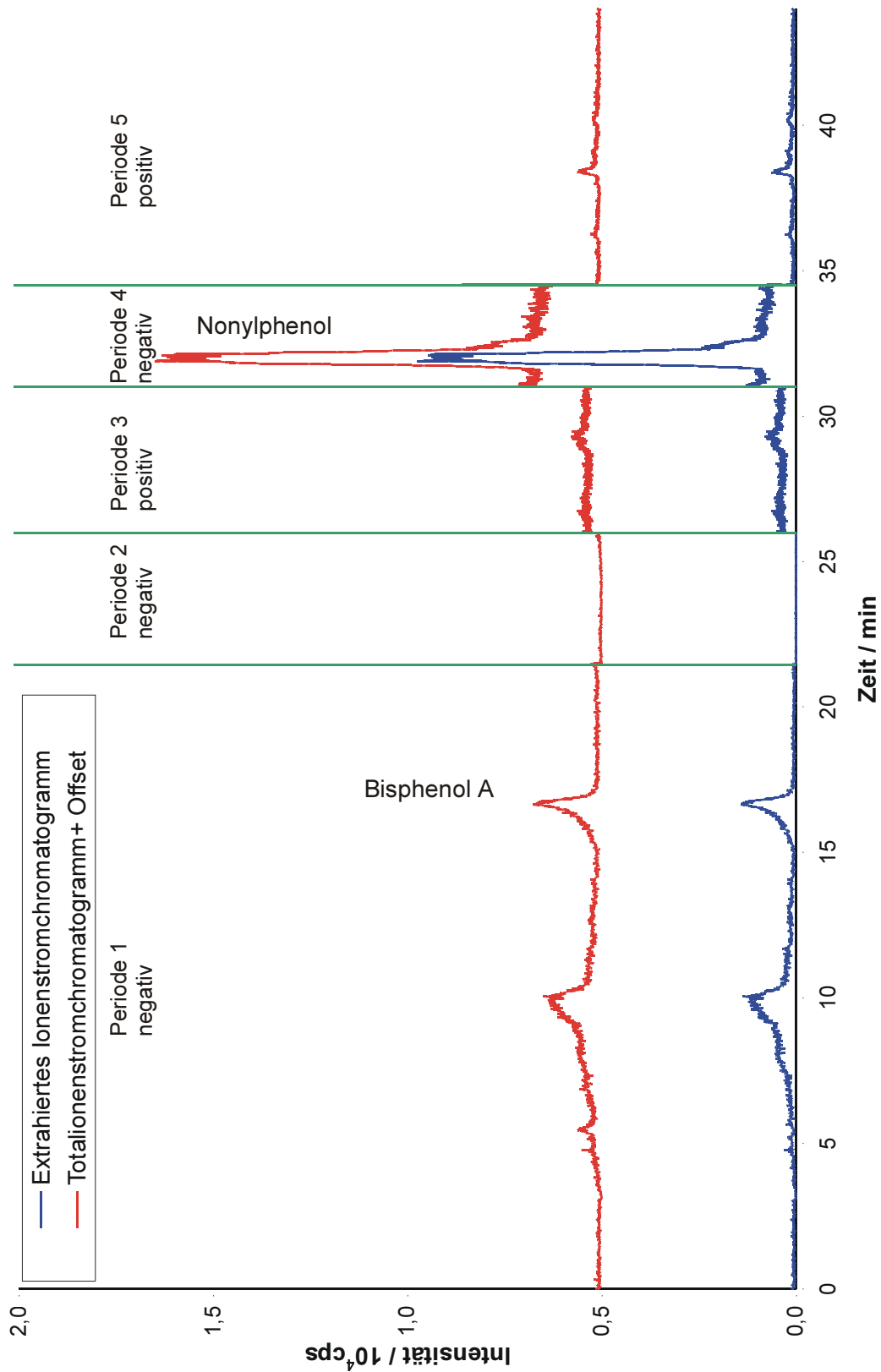
Die Peaks entsprechen jeweils einer Injektion von ca. 3 ng absolut.

**B Chromatogramm für die Kläranlagen-Probe vom 06.09.2001**

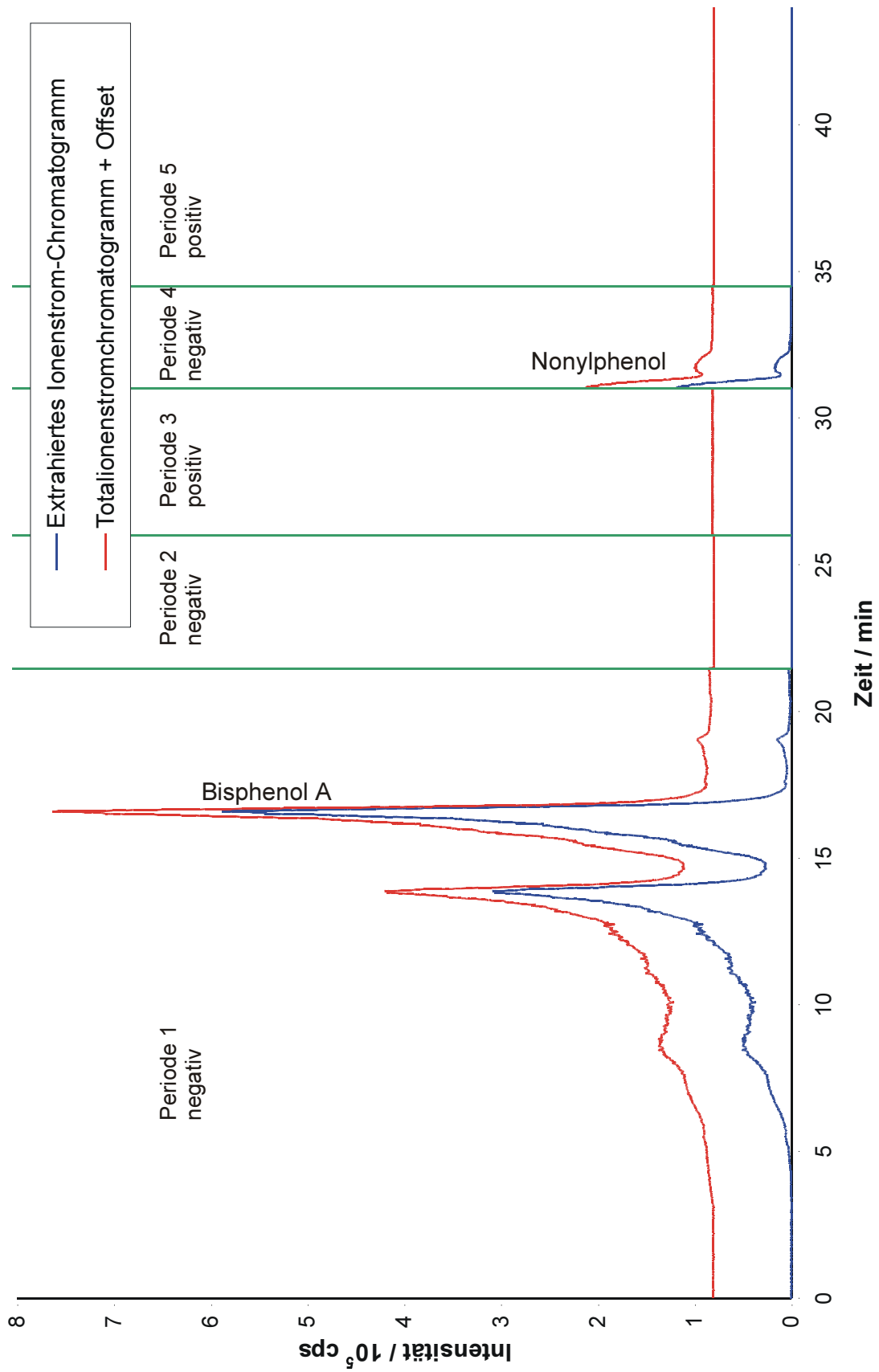


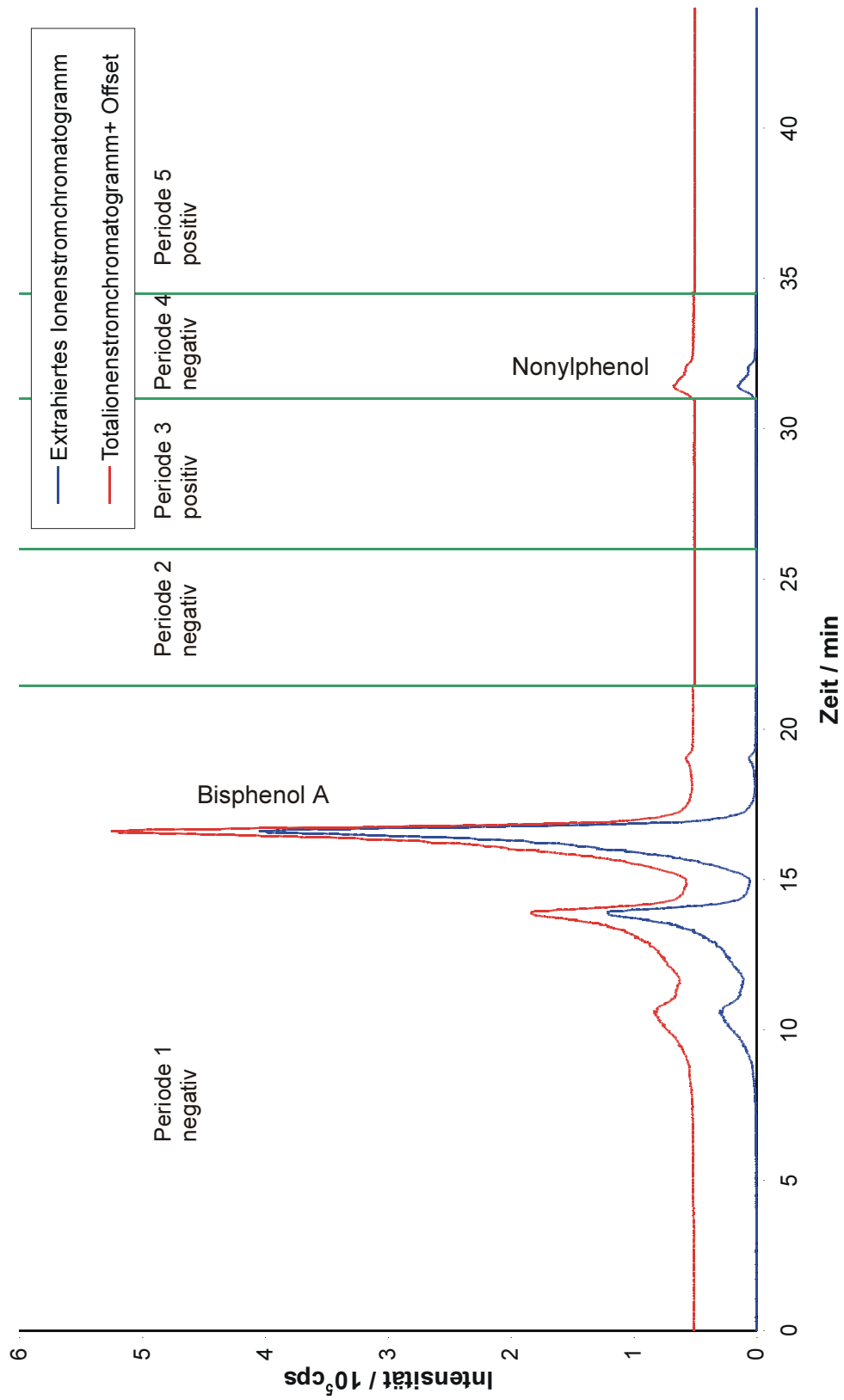


### C Chromatogramm für die 2. Fraktion der Kläranlagen-Probe vom 06.09.2001

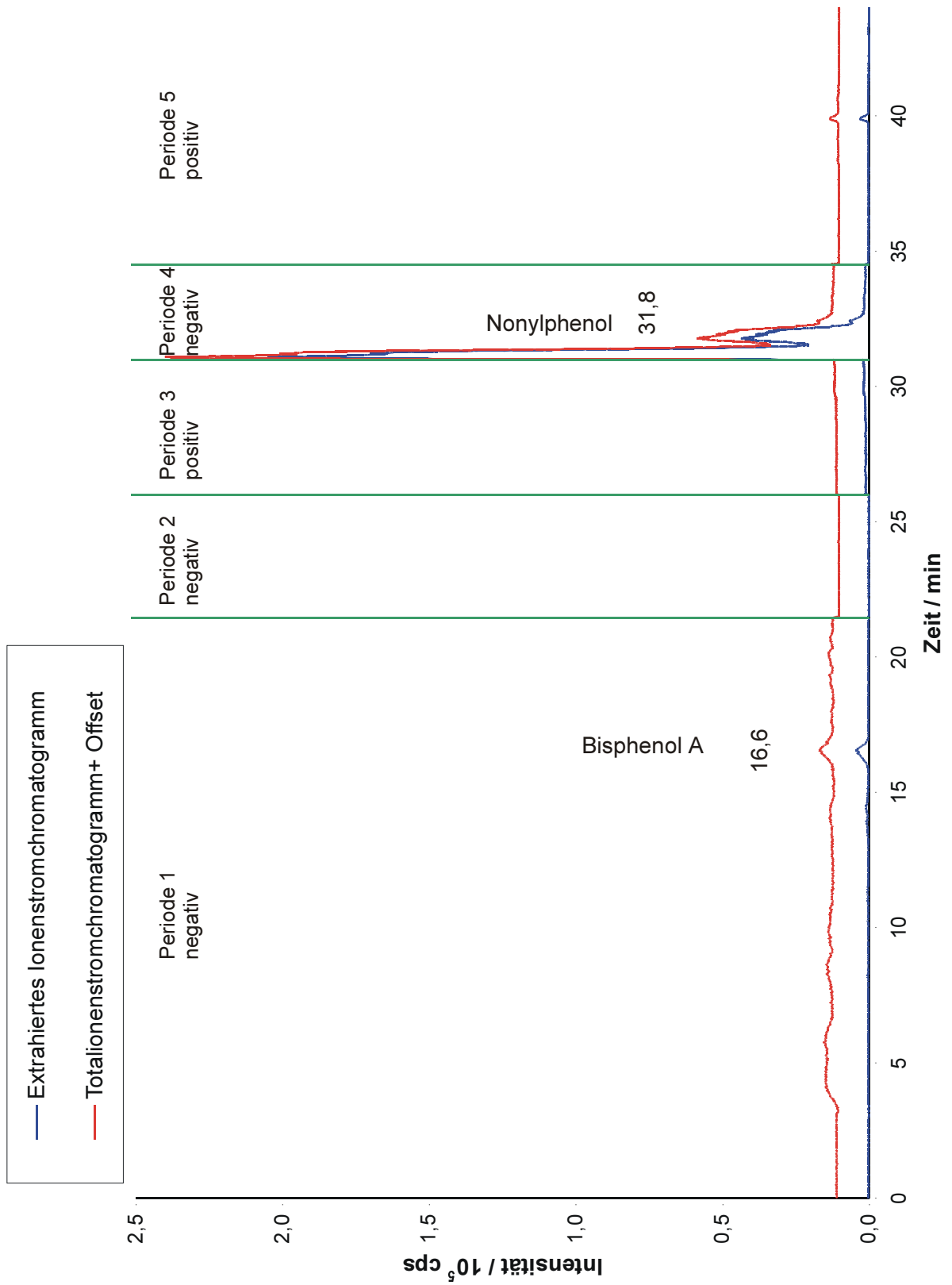


**D Chromatogramm für die Bilina-Probe vom 22.08.2001**

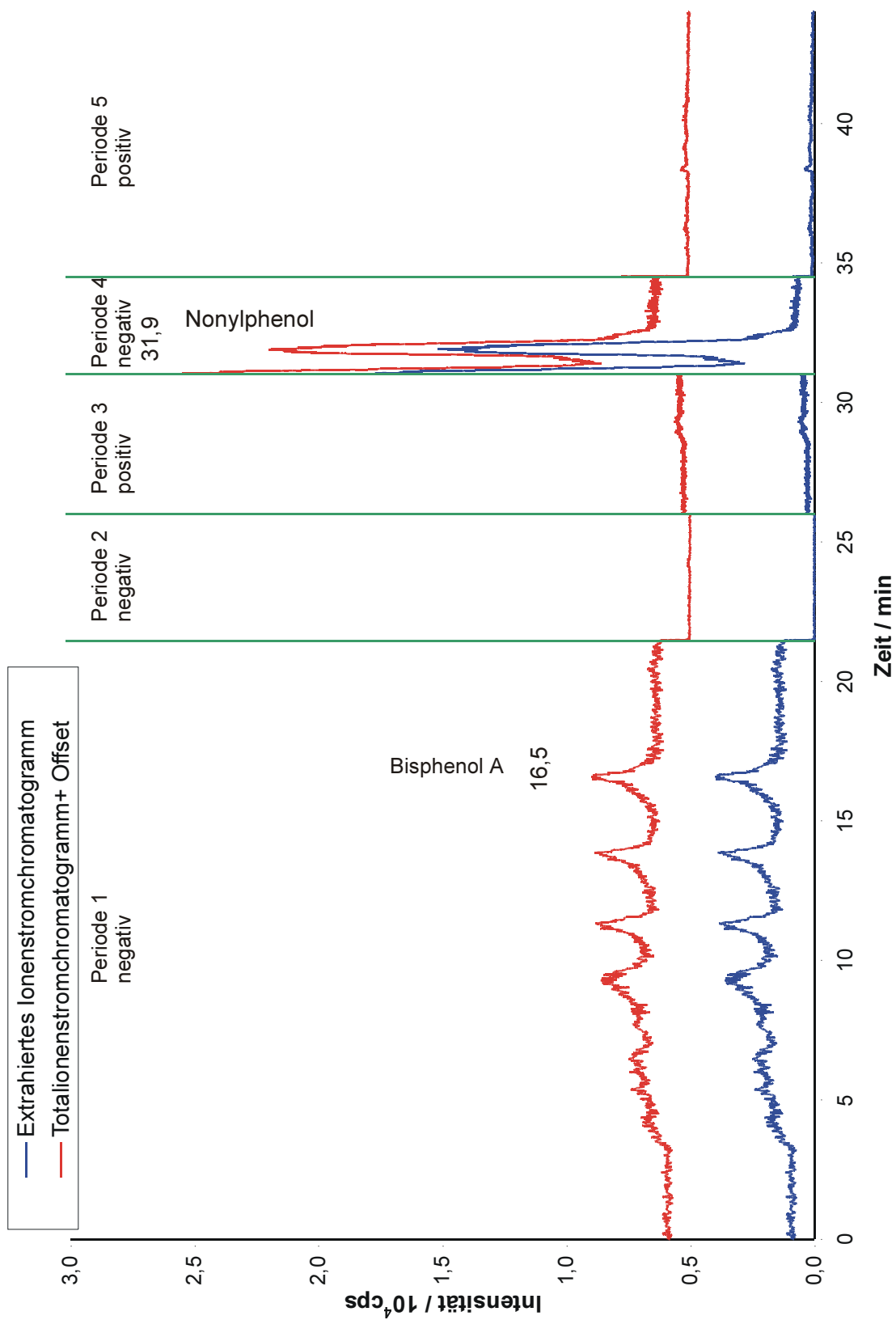


**E Chromatogramm für die 2. Fraktion der Bilina-Probe vom 22.08.2001**

**F Chromatogramm für die Synthesia Probe vom 22.09.2001**



**G Chromatogramm für die 2. Fraktion der Synthesia Probe vom 22.09.2001**





## Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. B. Neidhart für die Möglichkeit, am Institut für Küstenforschung zu promovieren, für seine Unterstützung und für die Übernahme des Zweitgutachtens. Herrn Prof. W. Ruck möchte ich für die gute Betreuung als Erstgutachter danken.

Herrn Jürgen Gandraß danke ich für die fachlichen Gespräche und für das Korrekturlesen dieser Arbeit, Herrn Armando Caba für die tatkräftige Unterstützung im Labor. Insgesamt danke ich allen Mitgliedern der Abteilung Organische Spurenanalytik für die Unterstützung bei meiner Arbeit und das angenehme Arbeitsklima. Bei Annika Jahnke möchte ich mich für ihre gute Hilfe im Rahmen ihres Praktikums bedanken

Herrn Prof. J.P. Sumpter an der Brunel University in England und seiner Arbeitsgruppe möchte für die Bereitstellung der rekombinanten Hefezellen danken.

Herrn Augustin der Hamburger Stadtentwässerung und den Mitarbeitern des Klärwerks Dradenau möchte ich für die Erlaubnis zur Probennahme in dem Klärwerk danken. Den Mitarbeitern von Povodi Labe in Tschechien danke ich für die Probennahme der Wasserproben in Elbe und Bilina.

Den Mitgliedern der Abteilung Umweltchemie an der Universität Lüneburg danke ich für ihre herzliche Aufnahme bei meinen kurzen Besuchen.

Meinen Freunden und Kollegen Sabine Rzepka, Hartwig Preckel, Kathrin Spiegel, Runar Eberhardt, Anja Schaub, Sibylle Steubing, Olaf Ziemann, Christina Roos, Rudolf Tuckermann möchte ich herzlich für die fachlichen Diskussionen aber auch für schöne Freizeitgestaltung danken. Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Michael Taraschewski für seine ständige Unterstützung und Ermutigung und für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit.

Für die sehr interessanten Forschungsaufenthalte in Burlington, Kanada, möchte ich Frau J. Parrott und Herrn J. Sherry danken. Für die Finanzierung danke ich dem BMBF.

Ein sehr herzlicher Dank gilt außerdem meinen Eltern und Geschwistern, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.