

Bestimmung von estrogen wirksamen Schadstoffen in der Gallenflüssigkeit der Fischart Aalmutter

*(Vom Fachbereich Umweltwissenschaften, Fach Umweltchemie,
an der Universität Lüneburg als Diplomarbeit angenommen)*

**Bestimmung von estrogen wirksamen
Schadstoffen in der Gallenflüssigkeit
der Fischart Aalmutter**

*(Vom Fachbereich Umweltwissenschaften, Fach Umweltchemie,
an der Universität Lüneburg als Diplomarbeit angenommen)*

Autorin:

B. Lünemann

(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

Bestimmung von estrogen wirksamen Schadstoffen in der Gallenflüssigkeit der Fischeart Aalmutter

(Vom Fachbereich Umweltwissenschaften, Fach Umweltchemie, an der Universität Lüneburg als Diplomarbeit angenommen)

Bettina Lünemann

182 Seiten mit 43 Abbildungen und 60 Tabellen

Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit lag der Aufbau eines Extraktionsverfahrens für estrogen wirkende Substanzen aus Gallenflüssigkeiten von Aalmuttern. Die Aufgabe bestand in der Kopplung der Verfahrensschritte Extraktion, Clean-up und massenspektrometrischer Vermessung. Anschließend sollte das entwickelte Verfahren auf Realproben angewendet werden. Bei den analysierten Substanzen handelte es sich um das natürliche Estrogen 17 β -Estradiol und dessen Metabolite Estriol und Estron, den Phytoestrogenen Genistein und Daidzein, das synthetische Estrogen 17 α -Ethinylestradiol und um die Industriechemikalien Nonylphenol, Bisphenol A und 4-tert-Octylphenol. Zusätzlich wurden ausgewählte Pharmazeutika (Carbamazepin, Diclofenac, Bezafibrat, Gemfibrozil) untersucht.

Zunächst wurden in Vorversuchen mit Standardlösungen sowohl in Wasser als auch in Gallenflüssigkeiten die Verfahrensschritte Extraktion und Clean-up optimiert. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion erfolgte dabei durch dreimaliges Ausschütteln mit Ethylacetat. Es folgte ein Aufreinigungsschritt mit Kieselgel. Die Vermessung der Analyte wurde mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS) mit Elektrospray-Ionisierung durchgeführt. Die Wiederfindung des Gesamtverfahrens lagen für das optimierte Verfahren zwischen 19 und 99 %. Der Matrixeffekt bei der massenspektrometrischen Vermessung lag zwischen einer Signalpression von 23 % und einer Signalverstärkung von 117 %, woraus sich um den Matrixeffekt korrigierte Wiederfindungen der Aufarbeitung von 28–119 % ergaben. Die Nachweisgrenzen lagen für die natürlichen Estrogene zwischen 0.016–0.055 ng/ μ L Galle, für die Industriechemikalien zwischen 0.002 bis 0.17 ng/ μ L Galle und für die Pharmaka zwischen 0.001–0.006 ng/ μ L Galle.

Mit dem entwickelten Verfahren wurden Proben von Gallenflüssigkeiten sowohl männlicher als auch weiblicher Aalmuttern der Station Klärwerk Wendorf und Salzhaff aufgearbeitet. Die Proben wurden nach der Ausprägung der Missbildungen Intersex sowie Atresie unterschieden. In den Realproben konnten Estradiol, Estron, Estriol, Nonylphenol und Bisphenol A nachgewiesen bzw. bestimmt werden. Die Konzentrationen der natürlichen Estrogene unterschieden sich erwartungsgemäß zwischen den männlichen und weiblichen Tieren. Auch war ein Konzentrationsunterschied der natürlichen Estrogene in Bezug auf das Vorkommen der Missbildungen festzustellen. In Tieren ohne Missbildungen lagen mit 0.19 ng/ μ L Galle im Mittel geringere Konzentrationen der natürlichen Estrogene vor, als in den Tieren mit starken Missbildungen

(0.24 ng/ μ L Galle). Für die Industriechemikalien konnte dieser Unterschied nicht festgestellt werden. Die Untersuchungen ergaben aber relativ hohe Konzentrationen von Nonylphenol (2.3 ng bis 18.8 ng/ μ L Galle) und Bisphenol A (0.71 bis 19.5ng/ μ L Galle) in den Gallenflüssigkeiten.

Determination of estrogenic compounds in bile fluid of eelpout

Abstract

The main objective of this thesis was to develop an extraction method for the analysis of estrogenic compounds in bile fluid of eelpout (*Zoarces viviparus*). For this purpose, an extraction method, a clean-up procedure, and analysis by HPLC-MS/MS had to be combined and optimised. Finally, the developed method was applied to analyse bile samples of eelpouts from the Baltic Sea. The investigated substances were 17β -estradiol and its metabolites estriol and estrone, the phytoestrogens genistein und daidzein, the synthetic estrogen 17α -ethinylestradiol, and the industrial chemicals nonylphenol, bisphenol A and 4-tert-octylphenol. Additionally, the pharmaceuticals carbamazepine, diclofenac, bezafibrate, and gemfibrozil were analysed.

First of all, recovery experiments with water and bile fluid spiked with standard solutions were carried out to optimize the extraction and clean-up procedure. The liquid-liquid-extraction was done three times with ethylacetate followed by a clean-up of the combined extracts with silica gel. The analytes were measured by HPLC-MS/MS with electrospray ionisation.

The overall method recovery of the method was between 19 and 99 %. The matrix effect of the measurement by mass spectrometry ranged from 23 % (signal suppression) to 117 % (signal enhancement). Thus, matrix effect-corrected recoveries of the sample preparation procedure were calculated to be 28–119 %. The limit of detection in bile fluid ranged from 0.016 to 0.055 ng/ μ L for the natural estrogens, from 0.002 to 0.17 ng/ μ L for the industrial chemicals, and from 0.001 to 0.006 ng/ μ L for the pharmaceuticals.

Bile fluid samples of male and female eelpouts, caught in the Baltic Sea near the sewage treatment plant Wendorf (Wismar) and at the Salzhaff were analysed with the newly developed method. The samples were categorised by the severity of the alterations intersex and atresia. In the samples estradiol, estrone, estriol, nonylphenol, octylphenol and bisphenol A could be detected. As expected, the concentration of natural estrogens differed between male and female eelpouts. A concentration difference of the natural estrogens could also be determined between eelpouts with strong and no atresia. In fishes without alterations the mean concentration (0.19 ng/ μ L bile fluid) was lower than in fishes with strong alterations (0.24 ng/ μ L bile fluid). This effect could not be found for the industrial chemicals. However, nonylphenol (2.3 ng to 18.8 ng/ μ L bile fluid) and bisphenol A (0.71 to 19.5 ng/ μ L bile fluid) occurred at comparatively high concentrations.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Küstenforschung, Abt. für Marine bioanalytische Chemie, in der GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH durchgeführt und stand unter der Leitung von Frau Dr. Regina Bruhn.

Großer Dank gilt im Besonderen meinen Eltern und Geschwistern für die Unterstützung jeglicher Art, die ich ihrerseits erfahren habe. Ohne sie wären diese Form der Ausbildung und Erstellung dieser Diplomarbeit nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Iris-Constanze Beck für die ständige und intensive Betreuung, dem praktischen Beistand und den wertvollen Hilfen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Für die Bereitstellung von Probenmaterial danke ich des weiteren Herrn Dr. Jens Gercken vom Institut für Angewandte Ökologie in Neu Broderstorf.

Jürgen Gandraß möchte ich für die hilfreiche Diskussionsbereitschaft bei analytischen Fragestellungen und ebenfalls Stephan Lassen und Jan Bergmann für die Hilfe am Messgerät danken.

Frau Dr. Regina Bruhn und Herrn Dr. Wolf-Ulrich Palm danke sehr ich für die Überlassung die interessante Fragestellung dieser Diplomarbeit, für die Betreuung der Arbeit und für die kontinuierliche Unterstützung in allen Bereichen meiner Tätigkeiten.

Mein Dank gilt ebenfalls Michael, Frauke, Sebastian, Anja, Janine und Torsten, für die kritische Durchsicht des Manuskriptes, den aufmunternden Worten und ihren wertvollen Anregungen. Auch bin ich dankbar für jene, die mich während meines Studiums in allen Phasen moralisch oder fachlich beigestanden haben.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 EINFÜHRUNG UND AUFGABENSTELLUNG.....	1
1.1 Einführung in die Thematik.....	1
1.2 Aufgabenstellung.....	4
2 THEORETISCHER TEIL.....	7
2.1 Hormone und hormonell wirkende Substanzen im Organismus.....	7
2.1.1 <i>Natürliche Hormone und hormoneller Regelkreis</i>	7
2.1.2 <i>Natürliche und anthropogene Stoffe mit endokriner Wirkung</i>	9
2.1.3 <i>Folgen der anthropogenen, endokrinen Wirkung</i>	12
2.2 Fremdstoffmetabolismus	16
2.2.1 <i>Metabolismus in der Leber</i>	16
2.2.2 <i>Anreicherung in der Galle</i>	17
2.3 Eintrag in die Umwelt	18
2.3.1 <i>Quellen von Estrogenen und estrogen wirkenden Stoffen</i>	18
2.3.2 <i>Eintragspfade von Estrogenen und estrogen wirkenden Stoffen</i>	20
2.3.3 <i>Vorkommen</i>	23
2.3.4 <i>Arzneimittel in der Umwelt – Eintragswege und Vorkommen</i>	24
2.4 Stand des Wissens zu den Analyten.....	26
2.4.1 <i>Chemische Struktur, Verwendung und Vorkommen der Substanzen</i>	26
2.4.2 <i>Analytische Bestimmung der Substanzen.</i>	38
2.5 Gegenstand der Untersuchung: Die Aalmutter.....	44
2.6 Die Geräte.....	45
2.6.1 <i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie</i>	45
2.6.2 <i>Interface und Ionisierungshilfsmittel</i>	47
2.6.3 <i>Massenspektrometrie</i>	48
3 EXPERIMENTELLER TEIL.....	52
3.1 Material und Methoden.....	52
3.1.1 <i>Verwendete Chemikalien</i>	52
3.1.2 <i>Reinigung der Laborgeräte</i>	57
3.1.3 <i>Verwendete Geräte und Parametereinstellungen</i>	58
3.1.4 <i>Kalibrierung</i>	64

3.1.5 Leistungsparameter der Methode	70
3.2 Methodenentwicklung – Durchführung und Ergebnisse	77
3.2.1 Die Extraktion	77
3.2.2 Das Clean-up.....	81
3.2.3 Die Kopplung der Verfahrensschritte	84
3.2.4 Überprüfung der Methode mit Matrix	86
3.2.5 Überprüfungen der Deglucuronidation.....	98
3.2.6 Enzymtest.....	99
3.2.7 Die optimierte Methode.....	101
3.2.8 Übersicht der Versuche	102
4 ESTROGEN WIRKENDE SUBSTANZEN IN DER GALLE VON AALMÜTTERN AUS DER WISMARER BUCHT.....	105
4.1 Probencharakterisierung und Probenahmeort.....	105
4.2 Ergebnisse	108
4.2.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in Realproben	108
4.2.2 Wiederfindung.....	109
4.2.3 Matrixeffekte	110
4.2.4 Blindwerte.....	113
4.2.5 Der Gehalt in Aalmuttergallen.....	114
5 DISKUSSION.....	118
5.1 Bewertung des entwickelten Verfahrens.....	118
5.2 Die hohen Konzentrationen von Bisphenol A und Nonylphenol.....	119
5.3 Vergleich der Proben innerhalb einer Station und Geschlecht.	120
5.4 Vergleich der Stationen Wismar Klärwerk und Salzhaff.....	122
5.5 Vergleich mit Daten aus der Literatur	125
6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	128
7 LITERATUR.....	131
8 ANHANG	147
8.1 Übersichtstabellen: Verwendete Chemikalien und Geräte	147
8.1.1 Die Chemikalien.....	147
8.1.2 Verwendete Dotierungslösungen.....	148
8.1.3 Die verwendeten Geräte.....	148
8.2 Übersichtstabellen: Vorkommen estrogen wirkender Substanzen und Pharmaka in der Umwelt.....	150
8.2.1 Vorkommen in Flüssen	150
8.2.2 Vorkommen in Kläranlagenabläufen.....	151
8.2.3 Vorkommen in Trinkwasser	152

8.3 API3000	152
8.3.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	152
8.3.2 Messparameter API3000	153
8.4 Ergebnisse des Enzymtests	155
8.5 Ergebnistabellen der Untersuchung von Realproben	155
8.5.1 Der Matrixeffekt	156
8.5.2 Rohdaten der aufgearbeiteten Realproben	158
8.6 Ausgewählte Chromatogramme	160

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ausschnitt des hormonellen Regelkreises	8
Abbildung 2: Mögliche Folgen durch Chemikalien im Organismus	14
Abbildung 3: Glucuronidation von 17 β -Estradiol	17
Abbildung 4: Mikrobieller Abbau von Tensiden in Kläranlagen	21
Abbildung 5: Strukturformeln der untersuchten Substanzen	37
Abbildung 6: Deglucuronidation von 17 β -Estradiol	38
Abbildung 7: Die Aalmutter (<i>Zoarces viviparus</i>)	44
Abbildung 8: Aufbau einer ESI-Quelle	48
Abbildung 9: Anordnung der Quadrupole in einem Tandem-MS.	50
Abbildung 10: Schematische Darstellung der MS/MS- Detektionsmöglichkeiten	50
Abbildung 11: Verwendete Gradientenelution	60
Abbildung 12: Beispiel einer Kalibriergrade von 17 β -Estradiol aus der Messung männlicher Aalmuttern vom Salzhaff.	69
Abbildung 13: Verwendete Substanzen als interner Standard	70
Abbildung 14: Bestimmung der Wiederfindung und des Matrixeffektes	71
Abbildung 15: Veranschaulichung der Begriffsdefinitionen	73
Abbildung 16: Wiederfindung über das Gesamtverfahren der Extraktion mit Ethylacetat	78
Abbildung 17: Wiederfindung über das Gesamtverfahren der erneuten Extraktion mit Ethylacetat	80
Abbildung 18: Wiederfindungen über das Gesamtverfahren der Überprüfung mit je 5 und 6 mL Elutionsmittel	83
Abbildung 19: Wiederfindungen über das Gesamtverfahren der Überprüfung mit je 7 und 8 mL Elutionsmittel	83
Abbildung 20: Wiederfindung über das Gesamtverfahren der Versuchsreihe Extraktion, Clean-up und der Kombination	86
Abbildung 21: Matrixeffekte bei der Messung von Flundergalle	88
Abbildung 22: Wiederfindung der Aufarbeitung von Flundergallen	89
Abbildung 23: Wiederfindung über das Gesamtverfahren aller bestimmbarer Substanzen aus Flundergalle	91
Abbildung 24: Matrixeffekte bei der Messung von Flundergalle	92
Abbildung 25: Wiederfindung der Aufarbeitung aus Flundergalle	93
Abbildung 26: Wiederfindungen über das Gesamtverfahren aus Aalmuttergalle	96

Abbildung 27: Matrixeffekte bei der Messung von Aalmuttergalle	97
Abbildung 28: Wiederfindung der Aufarbeitung aus Aalmuttergalle.....	98
Abbildung 29: Schematische Darstellung des Analyseverfahrens.	102
Abbildung 30: Karte der Probenahmeorte.....	105
Abbildung 31: Matrixeffekte der Phytoestrogene und Pharmaka männlicher Aalmuttern der Station Wismar Klärwerk.	111
Abbildung 32: Matrixeffekte natürlicher und synthetischer Estrogene in weiblichen Tieren der Station Salzhaff.....	112
Abbildung 33: Matrixeffekte von Nonylphenol, Bisphenol A, 4 <i>tert</i> -Octylphenol und Gemfibrozil männlicher Aalmuttern der Station Salzhaff..	112
Abbildung 34: Vergleich von Gallen weiblicher Aalmuttern mit unterschiedlicher Ausprägung von Missbildungen	120
Abbildung 35: Vergleich von Nonylphenol und Bisphenol A in Gallen weiblicher Aalmuttern mit unterschiedlicher Ausprägung von Missbildungen	122
Abbildung 36: Vergleich weiblicher Aalmuttern ohne Atresien beider Stationen	123
Abbildung 37: Vergleich von Industriechemikalien weiblicher Aalmuttern ohne Atresien beider Stationen	124
Abbildung 38: Chromatogramm des Kalibrierstandards Nr. 4 im negativen Messmodus	160
Abbildung 39: Chromatogramm des Kalibrierstandards Nr. 4 im positiven Messmodus	160
Abbildung 40: Chromatogramm des undotierten Extraktes von Probe 49 (Wismar Klärwerk) im negativen Messmodus.....	161
Abbildung 41: Chromatogramm des dotierten Extraktes von Probe 49 (Wismar Klärwerk) im negativen Messmodus.....	161
Abbildung 42: Chromatogramm des undotierten Extraktes von Probe 49 (Wismar Klärwerk) im positiven Messmodus	162
Abbildung 43: Chromatogramm des dotierten Extraktes von Probe 49 (Wismar Klärwerk) im positiven Messmodus	162

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wirkstärken endokrin wirksamer Substanzen	11
Tabelle 2: Konzentrationen von Bisphenol A in der wässrigen Phase von Gemüse aus lackierten Dosen	19
Tabelle 3: Tägliche Abgabe von Steroidhormonen von Menschen.....	20
Tabelle 4: Vorkommen und Wirkung estrogen wirksamer Substanzen in Kläranlagen.....	22
Tabelle 5: Konzentrationen von Pharmaka nach einer hessischen Kläranlage	25
Tabelle 6: Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ausgewählter Pharmaka,	25
Tabelle 7: Physikalisch-chemische Eigenschaften von Estrogenen	27
Tabelle 8: Gehalt an Isoflavonen in Lebensmitteln	29
Tabelle 9: Maximale Konzentrationen von Pharmaka in Oberflächengewässern	35
Tabelle 10: Übersicht über die untersuchten Substanzen.....	36
Tabelle 11: Übersicht der analytischen Methoden zur Bestimmung von Estrogenen und estrogen wirkenden Substanzen.....	42
Tabelle 12: Übersicht der analytischen Methoden zur Bestimmung von Estrogenen und estrogen wirkenden Substanzen (Fortsetzung)....	43
Tabelle 13: Übersicht der analytischen Methoden zur Bestimmung von Pharmaka.....	43
Tabelle 14: Verwendete Substanzen und ihre Reinheit.	53
Tabelle 15: Konzentrationen der Stammlösungen	54
Tabelle 16: Einwaagen zum Ansetzen der Ionisierungsmittel im Laufmittel.....	55
Tabelle 17: Verwendete Gradientenelution.....	59
Tabelle 18: MS/MS- Parameter untersuchten Estrogene und estrogen wirkenden Substanzen.....	62
Tabelle 19: MS/MS- Parameter untersuchten Pharmaka und interner Standardsubstanzen.....	63
Tabelle 20: Retentionszeiten und Intensitätsverhältnisse der gewählten Fragmente.....	64
Tabelle 21: Konzentrationen der Kalibrierstandards.....	68
Tabelle 22: Konzentrationsbereiche und Korrelationskoeffizienten.	68
Tabelle 23: Wiederholpräzision der entwickelten Messmethode	75
Tabelle 24: Instrumentelle Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	76

Tabelle 25: Substanzen im vierten Extrakt und dem Blindwert	79
Tabelle 26: Wiederfindung in den Methyl- <i>tert</i> -butylether-Extrakten	81
Tabelle 27: Substanzen in undotierter Aalmuttergalle.	95
Tabelle 28: Kalibrierreihe des Enzymtests.....	100
Tabelle 29: Übersicht über die Versuche der Methodenentwicklung.....	104
Tabelle 30: Übersicht über die Versuche der Methodenentwicklung (Fortsetzung).....	105
Tabelle 31: Auswahl der Gallenproben.....	107
Tabelle 32: Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) in den Realproben [ng/ μ L Gallenflüssigkeit].	109
Tabelle 33: Wiederfindung aus Aalmuttergalle	110
Tabelle 34: Blindwerte der Aufarbeitung von Realproben.....	114
Tabelle 35: Konzentrationen der Substanzen in den weiblichen Aalmuttern der Station Wismar Klärwerk	115
Tabelle 36: Konzentrationen der Substanzen in den weiblichen Aalmuttern der Station Salzhaff	115
Tabelle 37: Konzentrationen der Substanzen in den männlichen Aalmuttern der Station Wismar Klärwerk	116
Tabelle 38: Konzentrationen der Substanzen in den männlichen Aalmuttern der Station Salzhaff	117
Tabelle 39: Konzentrationenausgewählter Substanzen in verschiedenen Gallenflüssigkeiten.....	125
Tabelle 40: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.....	147
Tabelle 41: Konzentrationen der Dotierungsstandardlösungen.	148
Tabelle 42: Übersicht über die verwendeten Geräte.....	148
Tabelle 43: Übersicht über die verwendeten Geräte (Fortsetzung).	149
Tabelle 44: Konzentrationen von Estrogenen und estrogen wirksamen Stoffen in Oberflächengewässern.	150
Tabelle 45: Konzentrationen von Pharmaka in Oberflächengewässern	150
Tabelle 46: Konzentrationen von Estrogenen und estrogen wirksamen Stoffen gemessen in Ausläufen von Kläranlagen	151
Tabelle 47: Trinkwasseranalysen (FENT 2000), verändert.	152
Tabelle 48: Instrumentelle Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Quantifier am API3000	152
Tabelle 49: MS/MS- Parameter untersuchten Estrogene und estrogen wirkenden Substanzen am API3000.....	153

Tabelle 50: MS/MS- Parameter untersuchter Pharmaka und internerer Standards am API3000.....	154
Tabelle 51: Messdaten zur Berechnung der Kalibriergrade des Enzymtests	155
Tabelle 52: Messdaten der dreifachen Enzymaktivitätsbestimmung.	155
Tabelle 53: Matrixeffekte der Substanzen in den weiblichen Aalmuttergallen der Station Wismar Klärwerk	156
Tabelle 54: Matrixeffekte der Substanzen in den weiblichen Aalmuttergallen der Station Salzhaff	156
Tabelle 55: Matrixeffekte der Substanzen in den männlichen Aalmuttergallen der Station Wismar Klärwerk	157
Tabelle 56: Matrixeffekte der Substanzen in den männlichen Aalmuttergallen der Station Salzhaff	157
Tabelle 57: Konzentrationen der Substanzen in den weiblichen Aalmuttern der Station Wismar Klärwerk	158
Tabelle 58: Konzentrationen der Substanzen in den weiblichen Aalmuttern der Station Salzhaff	158
Tabelle 59: Konzentrationen der Substanzen in den männlichen Aalmuttern der Station Wismar Klärwerk	159
Tabelle 60: Konzentrationen der Substanzen in den männlichen Aalmuttern der Station Salzhaff	159

Abkürzungsverzeichnis

a	Jahr
a_0	Untergrund (Signal bei der Konzentration 0)
a_1	Steigung (Empfindlichkeit)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
API	Atmospheric Pressure Ionisation
BCF	Bioconcentration factor
BG	Bestimmungsgrenze
BP A	Bisphenol A
C_{18}	Festphase mit Kohlenstoffketten (18C)
CAD	Collisionally activated dissociation
CAS	Chemical Abstract Service
CE	Collision Energy
CH_3COOH	Essigsäure
CIL	Cambridge Isotope Laboratories
cps	Counts per second
CUR	Curtain gas
CXP	Collision cell exit potential
D	Deuterium
d	Tag
DAD	Dioden-Array-Detektor
DCM	Dichlormethan (Methylenchlorid)
DDE	Metabolit von DDT
DDT	Dichlor-diphenyltrichlorethan (Pestizid)
DES	Diethylstilbestrol
DP	Declustering potential
E1	Estron
E2	Estradiol (17 β -Estradiol)
E3	Estriol
EC_{50}	Effektkonzentration 50 %: Konzentration, die zu 50 % des maximalen Effekts führt
EE2	Ethinylestradiol (17 α -Ethinylestradiol)
ED	endocrine disruptor
EEQ	17 β -Estradiol-Äquivalenzkonzentration
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay

EP	Entrance potential
ER	Estrogen-Rezeptor
ER-CALUX	estrogen receptor-mediated chemical-actiated luciferase gene expression
ESI	Elektrospray Ionisation
Fa.	Firma
FIA	Fließinjektionsanalyse
FP	Focusing potential
FSH	Folikel stimulierendes Hormon
FT-ICR	Fourier-Transform Ion-Cyclotron Resonanz Massenspektrometer
GC	Gaschromatographie
Gen.	Genistein
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
HCl	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie (Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie)
IS	Ion Spray Voltage
ITD	Ion Trap Detektor
IV	Intensitätsverhältnis
K _{ow}	n-Octanol-Wasser- Verteilungskoeffizient
L	Liter
LC	Liquid Chromatographie (Flüssigkeitschromatographie)
LC ₅₀	lethale Konzentration bei 50% der Testorganismen
LC-MS/MS	Kopplung von Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometer
LH	Luteinisierendes Hormon
LLE	Liquid-Liquid-Extraction (Flüssig-Flüssig-Extraktion)
LOD	Limit of detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of quantification (Bestimmungsgrenze)
M	Molekülion
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
MeOH	Methanol
mL	Milliliter
Milli-Q-Wasser	organikfreies Wasser aus einer Millipore-Anlage
min	Minuten

mm	Millimeter
mM	millimolar
mmolar	millimolar
mod	moderate, mittlere
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenpektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
n	Anzahl
NEB	Nebulizer gas
neg.	negativ
NH ₄ ⁺	Ammonium-Kation
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernresonanz-Spektroskopie)
n.n.	nicht nachweisbar (Wert unterhalb der Nachweisgrenze)
NP	Nonylphenol
Nr.	Nummer
o	ortho
OP	Octylphenol
p	para
p. A.	pro analysi (zur Analyse)
pg	Picogramm
pos.	positiv
Probe-Nr.	Probenummer
Q	Quadrupol
Reag. Ph. Eur.	Reagenz Pharmacopoea Europaea
RP	reversed phase (Umkehrphase)
RT	Retentionszeit
SHBG	Sex-hormone-binding-globulin
SIM	Single Ion Monitoring
S/N	Signal to noise ratio (Signal-Rausch-Verhältnis)
SPE	Solid-phase extraction (Festphasen Extraktion)
Std	Standardlösung
Stdabw.	Standardabweichung
STP	Sewage Treatment Plant (Kläranlage)
t	Tonnen

Tab.	Tabelle
techn. Mix	technische Mischung
<i>tert</i>	tertiär (verzweigt)
TEM	Temperatur
u	Umdrehungen
u.a.	unter anderen
u.ä.	und ähnliches
UV	ultraviolett
V	Volt
weibl.	weibliche
x	Konzentration
y	Messsignal
YES-Assay	Yeast-Estrogen Screen Assay (Hefezelltest)
1N	ein normale
<	kleiner als
>	größer als
≤	bis zu, kleiner gleich
μL	Mikroliter
μg	Mikrogramm

1 EINFÜHRUNG UND AUFGABENSTELLUNG

In diesem Kapitel sollen Definitionen der in aktuellen Diskussionen häufig verwendeten Begriffe vorgestellt werden. Es folgt ein Abriss über die aktuelle Diskussion von endokrin wirkende Substanzen und deren Gesundheitsgefährdung des Menschen. Des Weiteren wird eine Übersicht über Wirkungen dieser Substanzen auf die Tierwelt gegeben. Der letzte Teil des Kapitels beinhaltet die Ziele dieser Arbeit.

In der vorliegenden Arbeit wird in Substanzklassen- und Verbindungsamen wie „Östrogene“, „Östradiol“ etc. „E“ statt „Ö“ verwendet. Diese „internationale“ Schreibweise wird daher aus Gründen der Einheitlichkeit auch in Ausdrücken wie „östrogen wirksam“ etc. benutzt.

1.1 Einführung in die Thematik

Im angelsächsischen Sprachraum haben sich die Begriffe „endocrine disruptors“ und der Oberbegriff „endocrine-disrupting chemicals“ für endokrin wirksame Stoffe durchgesetzt (UPMEIER 2001, S. 7). Eine endokrine Wirkung steht dabei für eine hormonelle Wirkung unabhängig davon, ob sie beispielsweise estrogen, antiestrogen, androgen, antiandrogen oder thyroid ist. Chemikalien mit einem speziell estrogenem Wirkpotential werden häufig auch als „Xenoestrogene“ bezeichnet.

Die US-EPA (US-amerikanische Umweltbehörde) hat die Begriffe „endocrine disruptors“ folgendermaßen definiert: Demnach werden „endocrine disruptors“ als exogene Substanz bezeichnet, die in die Synthese, Ausschüttung, Transport, Bindung oder Abbau von natürlichen Hormonen im Körper eingreifen, was wiederum Einfluss auf die Erhaltung der Körperfunktionen, Reproduktion, Entwicklung und Verhalten haben kann (BRUHN ET AL. 1999, S. 8). Nach dieser Definition reicht es aus, dass eine Substanz auf die genannten Teile des Hormonsystems wirkt. Auch BOLT ET AL. (2000) definiert „endocrine disruptor“ allein durch die Wirkung auf das Hormonsystem.

Neuerdings kommen auch die Bezeichnungen „endocrine active compound“ und „hormonally active compound/agent“ auf, die die hormonähnliche Wirkung wertungsfreier zum Ausdruck bringen, denn nicht jede endokrin wirksame Substanz sollte durch den Begriff „Disruptor“ als negativ oder schädlich

angesehen werden. Es gibt auch positive Auswirkungen beispielsweise von Phytoestrogenen, die sogar in der Medizin eingesetzt werden (UPMEIER 2001, S. 7).

Seit einigen Jahren wird nicht nur in der Wissenschaft, sondern auch in der Öffentlichkeit über die Wirkung von Chemikalien auf das Hormonsystem und deren Folge vor allem für die menschliche Gesundheit diskutiert. Diese Diskussion wurde nicht zuletzt durch die so genannte Estrogenhypothese von SHARPE ET AL. (1993) ausgelöst und ist bis heute noch nicht abgeschlossen (BUA 228, 2001, S.1). Diese Estrogenhypothese besagt einen Zusammenhang zwischen den bei Menschen beobachteten Veränderungen verschiedener hormonabhängiger Parameter und einer Exposition mit hormonell wirksamen Substanzen. So soll innerhalb der letzten 50 Jahre laut SHARP ET AL. (1993) die Spermienzahl und -qualität des Mannes stark gesunken sein. Neben dem Auftreten bestimmter hormonabhängiger Krebsarten wie Brust- und Hodenkrebs soll nach die Zahl der Missbildungen der männlichen Fortpflanzungsorgane (zum Beispiel Hodenhochstand) zunehmen (SHARP ET AL. 1993).

Diese beobachteten Veränderungen basieren laut BUA 228 (2001, S.4) aber auf entsprechenden Beobachtungen bei Tierversuchen und wildlebenden Organismen, sowie der Erfahrung aus der Anwendung von Diethylstilbestrol (DES), einer hochpotenten Substanz, analog zu Estradiol, die in hohen Dosen als Arzneimittelwirkstoff verwendet wurde. Von nationalen und internationalen Gremien wird daher die Auffassung vertreten, dass ein Zusammenhang zwischen einigen beim Menschen beschriebenen Veränderungen verschiedener hormonabhängiger Parameter und einer Exposition mit hormonellwirkenden Substanzen aus der Umwelt oder der Nahrung bisher nicht überzeugend belegt, aber auch nicht auszuschließen ist (BUA 228 2001, S. 3). Unter anderen liegen nicht genügend quantitative Daten über derartige Expositionen von Menschen vor. Im Allgemeinen werden laut BUA 228 (2001, S. 3) die Belastungen durch diese Stoffe als relativ gering angesehen. Allerdings bilden dabei die Phytoestrogene aufgrund ihrer höheren estrogenen Wirkstärke und der höheren Aufnahmemenge eine Ausnahme (BUA 222 2000, S.4; BUA 228 2001, S.3; KULLING ET AL. 2003, S. 239). Die Autoren GIES ET AL. (2001) geben eine umfassende Übersicht über die Beeinträchtigungen der menschlichen Gesundheit, die vermutlich auf den Einfluss von estrogen wirkenden Substanzen zurückzuführen sind.

Zwar sind die Veränderungen im Menschen noch nicht endgültig belegt, doch gibt es dagegen für das Auftreten von endokrinen Effekten in der Umwelt bereits mehrere Belege.

Laut TERNES ET AL. (2004, S. 9) werden viele in der Umwelt beobachteten Effekte, die die Reproduktion betreffen, auf das Vorhandensein hormonell wirksamer Substanzen zurückgeführt. Die individuellen Substanzen der Feminisierung konnten bisher aber noch nicht eindeutig zugeordnet werden. Zu den verdächtigten Stoffen zählen natürliche Estrogene aus Mensch und Tier, Phyto- und Mycoestrogene, synthetische Estrogene, aber auch Industriechemikalien und Pestizide wie Bisphenol A oder Dichlor-diphenyltrichlorethan (DDT). Diese gelangen hauptsächlich über den Weg der Kläranlage in die Umwelt, da diese sowohl von häuslichen als auch von industriellen Abwässern passiert werden. Die Autoren GULIETTE ET AL. (1995), COLBORN ET AL. (1993), ORLANDO ET AL. (2002) und SUMPTER (2002) geben einen umfangreichen Überblick über Auswirkungen auf Wildtierpopulationen durch eine erhöhte Kontamination von endokrin wirkenden Substanzen in der Umwelt.

Ein Beispiel für eine endokrine Wirkung auf Wildtierpopulationen ist beispielsweise die vermännlichende Wirkung von Tributylzinn auf Vorderkiemerschnecken. Tributylzinn, unter anderem in Antifoulinganstrichen von Schiffen enthalten, führte bereits in Konzentrationen ab 1 ng/L entlang von stark benutzten Schifffahrtsrouten zum Aussterben ganzer Scheckenpopulationen (TYLER ET AL. 1998; SCHULTE-OELMANN ET AL. 1996a; FENT 2000, S. 14).

Ein Hinweis auf estrogene Wirkungen bei Fischen ist die Induktion bzw. das Vorhandensein von Vitellogenin im Plasma männlicher oder juveniler Fische. Dieses Vitellogenin ist der Vorläufer des Dotterproteins und somit ein spezielles Lipoprotein eierlegender Tiere (GÜLDEN ET AL. 1997, S.16). Estrogene und estrogen wirkende Schadstoffe lösen aber nachweislich auch in männlichen Fischen die Produktion von Vitellogenin aus (LARSSON ET AL. 1998; TRIEBSKORN ET AL. 2002; RASMUSSEN ET AL. 2002; SUMPTER ET AL. 1995a, 1995b).

LEGLER ET AL. (2002) und WHITE ET AL. (1994) stellten eine gute Korrelation zwischen der Vitellogenininduktion und den Estrogen-Äquivalenz-Faktoren (EEQ) bestimmter Substanzen in der Galle derselben Fische fest.

GÜLDEN ET AL. (1997, S.71f) und JOBLING ET AL. (2003), fanden neben der Vitellogen-Induktion gleichzeitig eine Hemmung des Hodenwachstums, erhöhte Ei- und Embryoproduktion bei Fischen. Weitere Feminisierungen stellten

GULIETTE ET AL. (1994) und PURDOM ET AL. (1994) bei männlichen Alligatoren und Fischen in Form von Missbildungen fest.

In der Embryonen der Aalmutter (*Zoarces viviparus*) konnten ebenfalls nach Exposition mit Octylphenol neben einer Wachstumshemmung auch eine Missbildung der Gonaden festgestellt werden (RASMUSEN ET AL. 2002).

Auch in den Aalmuttern der Wismarer Bucht wurden Reproduktionsstörungen nachgewiesen (GERCKEN ET AL. 2002). Diese Reproduktionsstörungen waren zum Beispiel Feminisierungen in männlichen Aalmuttern. Dabei handelt es sich konkret um das Vorkommen weiblicher Keimzellen in männlichem Keimdrüsen-gewebe (Intersex) (GERCKEN ET AL. (2002). Des Weiteren wurden Reproduktionsstörungen in Form von Fehlbildungen von Eizellen (Atresien) und Erhöhung der 17β -Estradiol-Konzentration im Plasma in dortigen weiblichen Aalmuttern von GERCKEN ET AL. (2001) festgestellt. Als Ursache werden ebenfalls estrogen wirksame Substanzen im Wasser der Ostsee vermutet.

Estrogen wirksame Verbindungen sind bereits in einer derzeitig durchgeführten Arbeit von Iris-C. Beck im Wasser der Wismarer Bucht nachgewiesen worden. Es fehlen aber umfangreiche Untersuchungen über einen eventuellen Zusammenhang dieser Substanzen im Ostseewasser und den nachgewiesenen Missbildungen in den Aalmuttern in der Wismarer Bucht.

1.2 Aufgabenstellung

Hintergrund dieser Diplomarbeit waren die oben genannten Untersuchungen der Aalmutter aus der Wismarer Bucht durch Dr. Jens Gercken vom Institut für Angewandete Ökologie in Neu Broderstorf auf Missbildungen in den Tieren. Es wird vermutet, dass diese beobachteten Missbildungen auf endokrin wirksame Verbindungen im Wasser zurückgeführt werden können. Zur Aufklärung der festgestellten Veränderungen der Aalmutter in der Wismarer Bucht soll diese Arbeiten einen Beitrag leisten.

Sie ist ebenfalls ein Teil des Promotionsvorhabens: „Biotest-geleitete chemische Analyse estrogen wirksamer Substanzen in der Wismarer Bucht“ von Iris-C. Beck. Dies ist wiederum ein Aufgabenbereich der Abteilung für Marine bioanalytische Chemie im Institut für Küstenforschung der GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH.

Ziel dieser Arbeit ist der Nachweis von natürlichen und synthetischen Estrogenen sowie estrogen wirkenden Schadstoffen in der Gallenflüssigkeit von Aalmuttern aus der Wismarer Bucht.

Die Galle wurde deshalb als Gegenstand der Untersuchungen ausgewählt, weil dieses Organ zum einen eng mit dem Metabolismus von Fremdstoffen verknüpft ist und zum anderen auch Belege für Anreicherungen estrogen wirkender Stoffe in Gallen vorliegen (LEGLER ET AL. 2002; YING ET AL. 2002; PEDERSEN ET AL. 2002; FERREIRA-LEACH ET AL. 2001).

Obwohl es zu einer Anreicherung in der Galle kommt, liegen die Konzentrationen dieser Substanzen dort nur in geringen Konzentrationen vor. So lagen bei einer zwei- bis vierwöchigen Exposition von Regenbogenforellen im Ablauf einer Kläranlage beispielsweise Konzentrationen für Estron nur bei 0,6–2,5 µg/g Galle, für 17 α -Ethinylestradiol bei 0,4–1,3 µg/g und Nonylphenol bei 10–22 µg/g Galle (LARSSON ET AL. 1998). Der Ablauf einer Kläranlage stellt einen Eintragsweg in die Umwelt mit relativ hohen Konzentrationen dar. In Tieren entfernt einer solchen Eintragsquelle müssen aufgrund einer Verdünnung durch das Oberflächenwasser deshalb mit noch geringeren Konzentrationen gerechnet werden. Um dies zu überprüfen wurden zwei unterschiedliche Stationen der Wismarer Bucht als Probenahmeort gewählt. Die eine Station liegt nahe der Kläranlage Wendorf bei Wismar, die andere etwas entlegen vom anthropogenen Einfluss nahe dem Salzhaff ebenfalls bei Wismar. Ziel einer Nachweismethode muss es also sein, auch geringe Konzentrationen verschiedenster Substanzen nachweisen zu können.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf den Aufbau eines entsprechenden möglichst vollständigen Extraktionsverfahrens für estrogen wirkenden Substanzen aus Gallenflüssigkeiten von Aalmuttern. Die Extraktionsversuche mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion basieren auf einer von LEGLER ET AL. (2002) veröffentlichten Methode. Der Aufreinigungsschritt, das so genannte Clean-up, und die Messmethode dieser Substanzen für die HPLC-MS/MS wurden bereits von Iris-C. Beck im Rahmen ihres Promotionsvorhabens entwickelt und lag somit vor. Die Aufgabe bestand in der Kopplung der einzelnen Verfahrensschritte und der Überprüfung der Geeignetheit für die Anwendung in der Praxis. Es sollten zunächst in Vorversuchen mit Standardlösungen sowohl in Wasser als auch in Gallenflüssigkeiten, die Parameter Wiederfindungen über das Gesamtverfahren bzw. der Aufarbeitung dieses Versuchsaufbaus und der bei der Vermessung mittels HPLC-ESI-MS/MS entstehende Matrixeffekt getestet

werden. Anschließend erfolgte dann die Anwendung der aufeinander abgestimmten Methodenschritte auf Realproben bestehend aus Gallenflüssigkeiten von Aalmuttern der Wismarer Bucht.

Bei den zu untersuchenden Substanzen handelt es sich um das natürliche Estrogen 17β -Estradiol und dessen Metabolite Estriol und Estron, den Phytoestrogenen Genistein und Daidzein, das synthetische Estrogen 17α -Ethinylestradiol und um die Industriechemikalien Nonylphenol, Bisphenol A und 4*tert*-Octylphenol. Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Optimierung des Verfahrens auf die entsprechenden estrogen wirksamen Verbindungen

Zusätzlich sollen ausgesuchte Pharmazeutika, wie Carbamazepin (Antiepileptikum), Diclofenac (Antiphlogistika) und die Lipidsenker Bezafibrat und Gemfibrozil untersucht werden. Eine Aussage über die ökotoxikologische Wirkung dieser Substanzen im marinen Bereich kann nach heutigem Erkenntnisstand noch nicht gemacht werden. Über die Auswirkungen von Pharmaka in der Umwelt ist sehr wenig bekannt. Lediglich für Diclofenac konnte PFLUGER ET AL. (2001, S. 2) eine estrogene Potenz für die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) sowie den Karpfen (*Cyprinus carpio*) festgestellt werden

.

2 THEORETISCHER TEIL

In diesem Teil der Arbeit sollen die Auswirkungen von Hormonen und hormonell wirkende Substanzen im Organismus dargelegt werden. Einen wichtigen Teil nimmt der Fremdstoffmetabolismus ein, auf den in Kapitel 2.2 eingegangen wird. Des Weiteren wird der Eintrag von Substanzen in die Umwelt erläutert und kurz aufgeführt, weshalb Aalmutter als Gegenstand der Untersuchung ausgewählt wurde. Im Unterkapitel „Stand des Wissens zu den Analyten“ soll sowohl die chemische Struktur, die Verwendung, das Vorkommen als auch die analytische Bestimmung der jeweiligen Substanzen aufgezeigt werden.

2.1 Hormone und hormonell wirkende Substanzen im Organismus

In diesem Kapitel werden der natürliche Hormonkreislauf der Sexualhormone und deren Bildung im Körper dargelegt. Es folgen die Voraussetzungen für eine endokrine Wirkung von Substanzen. Des Weiteren werden die Angriffspunkte im Organismus endokrin wirksamer Substanzen aufgezeigt und deren Folgen sowohl auf die Zelle als auch für das Individuum bis hin zur Lebensgemeinschaft beschrieben.

2.1.1 Natürliche Hormone und hormoneller Regelkreis

Hormone sind chemische Signalstoffe des endokrinen Systems, die über die Blutbahn zu den Zielorganen transportiert werden. Dort rufen sie durch eine Bindung an spezifische Rezeptoren eine Reaktion hervor und üben damit bestimmte physiologische und biochemische Regulationsfunktionen aus.

Eine spezielle Gruppe der Hormone sind die Geschlechtshormone. Gelangen diese an ihr Zielorgan, können sie dort estrogene, antiestrogene, androgene oder antiandrogene Wirkungen auslösen. Dabei wirken die weiblichen Geschlechtshormone estrogen, die männlichen androgen. Als antiestrogen bzw. antiandrogen wird die Wirkung bezeichnet, wenn die Folge der hormonellen Reaktion eine entsprechende Hemmung ist.

Zu den wichtigen Funktionen der Geschlechtshormone gehören die Entwicklung und Differenzierung zur Geschlechtsreife sowie die Aufrechterhaltung der sexuellen Funktion (KLOAS, 1998; GÖTZ ET AL. 1998, S.7). Zu den vielfältigen

Aufgaben gehören ebenfalls die Kontrolle der Vitellogeninsynthese, Estrogen-Rezeptor-Synthese und pheromonale Kommunikation, die Calcium-Homeostase und der Knochenbau bzw. die Eischalenproduktion (LARSSON ET AL. 1999). Die Hormonsysteme sind aber nicht völlig unabhängig voneinander. Eine Störung des Schilddrüsenhormonsystems kann ebenfalls nicht zu vernachlässigende negative Auswirkungen hervorrufen. KLOAS (2001) beispielsweise merkt an, dass dieses Hormonsystem die Metamorphose von Amphibien steuert und auch bei Fischen negative Auswirkungen zu befürchten sind.

Der Mensch besitzt zwei verschiedene Estrogen-Rezeptoren (ER). Zum einen ER- α und zum zweiten den erst 1996 entdeckten ER- β (KUIPER ET AL. 1998). Die α -Rezeptoren befinden sich vermehrt in Zellen der Brustdrüsen und des Uterus während die β -Rezeptoren vor allem in Knochen und Blutgefäßen zu finden sind. (ZITTERMANN, 2002, S. 2)

Bei der Bindung der Hormone an die entsprechenden Rezeptoren scheint die Existenz einer phenolischen Hydroxylgruppe, die viele der estrogen wirkenden Substanzen aufweisen, eine Rolle zu spielen (BOLT ET AL. 2000; WIESE ET AL. 1997).

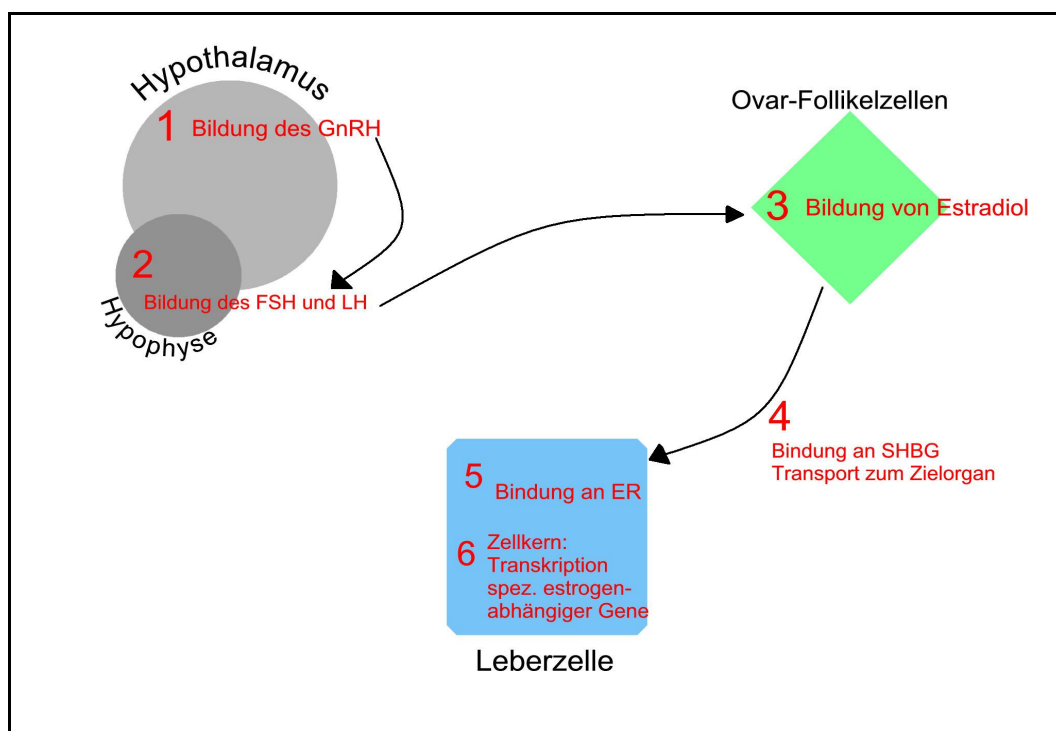


Abbildung 1: Ausschnitt des hormonellen Regelkreises, verändert (Kloas 1998).

Der endokrine Regelkreis des 17β -Estradiols, wie in Abbildung 1 dargestellt, beginnt mit der Bildung des Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) im Hypothalamus des Zentralnervensystems (1). Dieses regt in der Hypophyse die Bildung der Gonadotropine FSH (Follikel stimulierendes Hormon) und des LH (Luteinisierendes Hormons (2) an. Über den Blutkreislauf gelangen FSH und LH zu dem Follikel des Ovars und induzieren dort die Bildung von 17β -Estradiol (3). 17β -Estradiol wird nun freigesetzt, bindet an das sexualhormonbindende Protein (SHBG) und gelangt so zum Zielorgan (4). Die erhöhte Konzentration von 17β -Estradiol im Blut führt zur Rückkopplung im Hypothalamus und der Hypophyse, die eine Verminderung der Ausschüttung der Hormone GnRH, FSH und LH bewirkt. Bei Wirbeltieren ist das Hauptzielorgan für Estrogen die Leber. Dort dissoziiert das Estrogen vom SHBG und diffundiert in die Leberzelle. Das Estrogen bindet im Cytoplasma nun an den Estrogen-Rezeptor (ER) (5). Dieser Estrogen-Estrogenrezeptor-Komplex löst im Zellkern die Transkription von speziellen estrogenabhängigen Genen aus (6). Hierzu gehört neben dem Eidotterprotein Vitellogenin auch die Bildung von Estrogen-Rezeptoren selbst. Das bedeutet, dass Estrogen selbst seine eigenen Rezeptoren in den Zielzellen hochregulieren kann. Das Vitellogenin wird über den Blutkreislauf zur Eizelle befördert und sorgt dort für den Aufbau der Eidotterreserve. (KLOAS 1998; KUNTZSCH 2000 S. 4ff.; WELSHONS ET AL. 2003)

Die Bildung von Steroidhormonen aus Cholesterol verläuft über zahlreiche Reaktionen, die mit Hilfe von Enzymen katalysiert werden. Die letzte Reaktion der Estrogenbildung, nämlich die Umwandlung von dem Androgen Testosteron zum Estrogen 17β -Estradiol, wird durch das Enzym Aromatase herbeigeführt (GEYER ET AL. 2000). Wird also dieses Enzym wie es bei den marinen und limnischen Vorderkiemerschnecken der Fall war, durch Tributylzinn, gehemmt, kann die Bildung des weiblichen Geschlechtshormons nicht bzw. nur minimal stattfinden, was eine Vermännlichung der Tiere zur Folge hat (GÜLDEN ET AL. 1997, S. 7; FENT 1998, S. 228).

2.1.2 Natürliche und anthropogene Stoffe mit endokriner Wirkung

In die Umwelt gebrachte natürliche und synthetische Substanzen können das endokrine Gleichgewicht von Organismen empfindlich stören (JOBLING ET AL. 2003; GILLESBY ET AL. 1998). Umweltchemikalien wie zum Beispiel DDT (Dichlor-diphenyltrichlorethan), Bisphenol A, Nonylphenol, Phthalate oder auch Phytoestrogene besitzen ein endokrines Potential. SAFE ET AL. (1998) geben

einen guten Überblick über die bekanntesten Phytoestrogene und anthropogenen Chemikalien mit estrogenen Wirkung.

Auch einige Pharmaka, wie zum Beispiel Kontrazeptiva und Antidiabetika gehören zu den endokrin wirksamen Verbindungen. Sie werden aufgrund ihrer hormonellen Wirksamkeit gezielt eingesetzt. Phytoestrogene werden ebenfalls aufgrund ihrer estrogenen Aktivität auch in Deutschland als Alternative zu bisherigen Hormonersatztherapien diskutiert (KULLING ET AL. 2003, S. 237).

Für die meisten übrigen Arzneistoffe wurde im Rahmen ihrer Anwendung in der Medizin keine hormonelle Wirkung festgestellt. Allerdings wurden diese Stoffe auch nicht einem Testsystem unterzogen, das die hormonelle Wirksamkeit zum Schwerpunkt hat (TERNES ET AL. 2004, S. 8). Auch werden hormonell wirksame Substanzen häufig auf estrogenartige Wirksamkeit beschränkt. Das liegt teilweise daran, dass sich die herkömmlichen Testsysteme (in-vivo und in vitro) auf die Untersuchung der estrogenähnlichen Wirkeigenschaften beschränken. Das endokrine System ist jedoch so komplex, dass viele verschiedene Einflüsse von Fremdstoffen denkbar sind. So können Fremdstoffe ebenso antiestrogen, androgen, antiandrogen oder auch thyroiden (Wirkung auf die Schilddrüse) wirken (BUA 228 2001, S.1).

All diese Stoffe sind, wie die natürlichen Hormone, meist lipophil, wodurch ihnen ein Diffundieren in die Zellen hinein möglich ist. Hier binden sie aufgrund ihrer Konfiguration an den Estrogen-Rezeptor. Endokrine Disruptoren können, wenn sie an den Estrogen-Rezeptor binden, entweder die Genexpression aktivieren oder blockieren (KLOAS 1998). Sie sind aber auch in der Lage eine negative Rückkopplung zum Hypothalamus bzw. der Hypophyse zu bewirken (KLOAS 1998) und damit Einfluss auf die Synthese der Estrogen-Rezeptoren selbst zu nehmen.

Zwar binden die verschiedenen endokrinen Disruptoren im Vergleich zu 17β -Estradiol nur mit relativ geringer Affinität an den entsprechenden Rezeptor (10^{-2} – 10^{-3} -fach), das natürliche 17β -Estradiol wird aber im Körper durch sexualhormonbindende Proteine zu 90–95 % gebunden und im Blutkreislauf transportiert. Einige endokrine Substanzen, wie beispielsweise 17α -Ethinylestradiol binden an dieses Protein jedoch nicht oder nur unwesentlich (SHARPE ET AL. 1993). Damit erhöht sich die Bioverfügbarkeit der hormonell wirksamen Umweltchemikalien im Körper (KLOAS 1998). Andererseits kann es auch zu einer Konkurrenz von natürlichem Hormon und Umweltchemikalie an einem Bindungsprotein kommen. Da die rezeptorvermittelte Wirkung abhängig

von der Konzentration freier Estrogene im Blut ist, kann diese erhöhte Konzentration freier Estrogene im Plasma eher zu einer estrogene Wirkung am Rezeptor führen (GÜLDEN ET AL. 1997, S. 7).

Auch ist zu berücksichtigen, dass chemische Stoffe mit estrogener Aktivität teilweise in sehr viel größeren Mengen hergestellt und in den Stoffkreislauf eingebracht werden, als die natürlichen und synthetischen Estrogene (ARGE ELBE, 2000, S.4). Bezüglich des Eintragsweg über die Nahrung in den Körper stellten SAFE ET AL. (1995) aber fest, dass die Aufnahme natürlicher Estrogene über die Nahrung weitaus höher ist, als die Aufnahme von Xenoestrogenen, die beispielsweise durch das Herauslösen aus Verpackungen oder Pestizideintrag in die Nahrung gelangen (BROTONS ET AL. 1995).

Auch eine mögliche Bioakkumulation dieser lipophilen Stoffe in Organismen und der damit verbundenen Anreicherung entlang der Nahrungskette ist von Bedeutung (AHEL ET AL. 1993; SUMPTER ET AL. 1996, S. 212; SUMPTER 1998).

GAIDO ET AL. (1997) haben die estrogene Potenz verschiedener Substanzen mit Hilfe eines Hefetests (YES-Assay, Yeast-Estrogen Screen Assay) untersucht. In der folgenden Tabelle sind die Werte einiger Substanzen aufgeführt. EC_{50} ist dabei die Konzentration, die zu 50 % der maximalen estrogene Aktivität führt. Die angegebene relative Wirkstärke errechnet sich daraus nach folgender Formel:

$$EC_{50} \text{ Testsubstanz} / EC_{50} \text{ Estradiol}$$

Tabelle 1: Wirkstärken endokrin wirksamer Substanzen nach GAIDO ET AL. (1997), verändert.

Substanz	EC_{50} [mol/L]	Relative Wirkstärke
Estradiol	$2,25 \times 10^{-10}$	1
Estriol	$6,16 \times 10^{-8}$	273
p-Nonylphenol	$1,10 \times 10^{-6}$	5 000
Bisphenol A	$3,40 \times 10^{-6}$	15 000
Testosteron	$5,09 \times 10^{-5}$	226 000
o,p'-DDT	$1,81 \times 10^{-3}$	8 000 000
o,p'-DDE	$5,34 \times 10^{-3}$	24 000 000

Besonders die natürlichen Steroidhormone haben bereits in extrem geringen Konzentrationen eine starke Wirkung. Bei anderen estrogen wirksamen Verbindungen ist eine deutlich höhere Konzentration erforderlich (SPENGLER 2001, S. 5).

Es müssen aber zwei Begriffe unterschieden werden: Das estrogene Potential und die estrogene Potenz. Eine Substanz hat dann ein estrogenes Potential, wenn sie in einem Organismus, einem Organ oder einer Zelle, eine estrogenspezifische Wirkung auslösen kann. Die estrogene Potenz einer Substanz aber ist abhängig von der Konzentration bzw. Dosis. Reicht beispielsweise eine geringe Konzentration aus, um die estrogene Wirkung hervorzurufen, ist die estrogene Potenz der Substanz hoch. Die estrogene Potenz ist somit keine Substanzeigenschaft, sondern beschreibt eine estrogene Wirkstärke in einem spezifischen biologischen System (GÜLDEN ET AL. 1997, S. 9f).

Die estrogene Potenz verschiedener Pharmaka und Estrogene wurde beispielsweise bei PFLUGER ET AL. (2001, S. 2) für die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) sowie den Karpfen (*Cyprinus carpio*) bestimmt. Die *in vitro* Testsysteme ergab folge Hierarchie von estrogenen Potenzen: 17 β -Estradiol > 17 α -Ethinylestradiol > Estron > Genistein - Estriol > Bisphenol A > Nonylphenol > Diclofenac. Keine estrogenen Effekte zeigten dagegen Bezafibrat und Carbamazepin.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Chemikalien an drei Stellen im hormonellen System angreifen können:

1. direkte Reaktion mit dem Hormonrezeptor,
2. Änderung der Hormonkonzentration,
3. Änderung der Hormonrezeptorkonzentration.

Inwieweit und in welcher Art hormonelle Wirkungen dieser Substanzen den Organismus reversibel oder sogar irreversibel schädigen, ist abhängig von der Art, dem Zeitpunkt, der Dauer und der Intensität der Wirkung. (BRUHN ET AL. 1999, S.3; DÖTSCH ET AL. 2001; WARD ET AL. 2001; FENT 1998, S. 211f.).

2.1.3 Folgen der anthropogenen, endokrinen Wirkung

Für die Folge hormoneller Wirkung durch Estrogene oder estrogen wirkende Stoffe kann besonders der Zeitpunkt der Einwirkung entscheidend sein. Bei Organismen, bei denen die Geschlechtsdifferenzierung durch ein Geschlechtschromosom festgelegt ist, wird die Entwicklung der Geschlechtsorgane und spezieller Gehirnzentren während der frühen Entwicklungsphase durch die Geschlechtshormone gesteuert. Eine Störung in dieser hochsensiblen Phase durch estrogen wirksame Stoffe kann daher zu dauerhaften Defekten und

Funktionsstörungen beispielsweise der Geschlechtsorgane führen (FENT, 2000).

Diese Störungen beim Individuum können weitreichende Folgen haben. Treten diese Defekte bei mehreren Individuen auf, werden ihre Gene beispielsweise durch den Verlust der Fortpflanzungsfähigkeit, dem Genpool der Population entzogen. Diese Kaskade, die damit in Gang gesetzt werden kann, könnte letztendlich sogar zum Aussterben ganzer Populationen in den betroffenen Gebieten führen, da der Austausch von Genmaterial innerhalb der Population eingeschränkt ist.

Bei Wirbeltieren wie beispielsweise Amphibien und Fischen kommt es während der Lavalentwicklung durch den Einfluss der vorhandenen Hormone zur Geschlechtsspezifizierung. Zusätzliche Estrogene können somit zum erhöhten Anteil an Weibchen in der Generation führen. Dieses einseitig verschobene Geschlechterverhältnis kann damit Auswirkungen auf die ganze Population haben (KLOAS 2001). Ein Beispiel für Auswirkungen durch ein einseitig verschobenes Geschlechterverhältnis ist der vermännlichende Effekt von Tributylzinn auf Vorderkiemerschnecken entlang von stark benutzten Schifffahrtsrouten. Dies führte dort zum Aussterben ganzer Scheckenpopulationen (TYLER ET AL. 1998; SCHULTE-OELMANN ET AL. 1996a + 1996b; FENT, 2000; FENT 1998, S. 228f.).

Auch die Induktion von Vitellogenin und ein erhöhter Metabolismus durch Fremdstoffe im Organismus bei Fischen ist ein beträchtlicher energetischer Aufwand und wird auf Kosten der Synthese essentiell notwendiger Stoffe vorgenommen. Langfristig kann es ebenfalls zu Schädigungen des Organismus durch eine dauerhafte Induktion von Vitellogenin kommen (FENT, 1998, S. 237; TRIEBSKORN ET AL. 2002). Die damit verbundene schlechtere Kondition durch Energieaufwendung hat wiederum Einfluss auf die Population. Das wiederum wirkt auf den Zustand der ganzen Lebensgemeinschaft. Folgende Abbildung 2 soll diesen Zusammenhang der Wirkung auf Molekülebene und der damit verbundenen möglichen Auswirkung auf die Lebensgemeinschaft verdeutlichen.

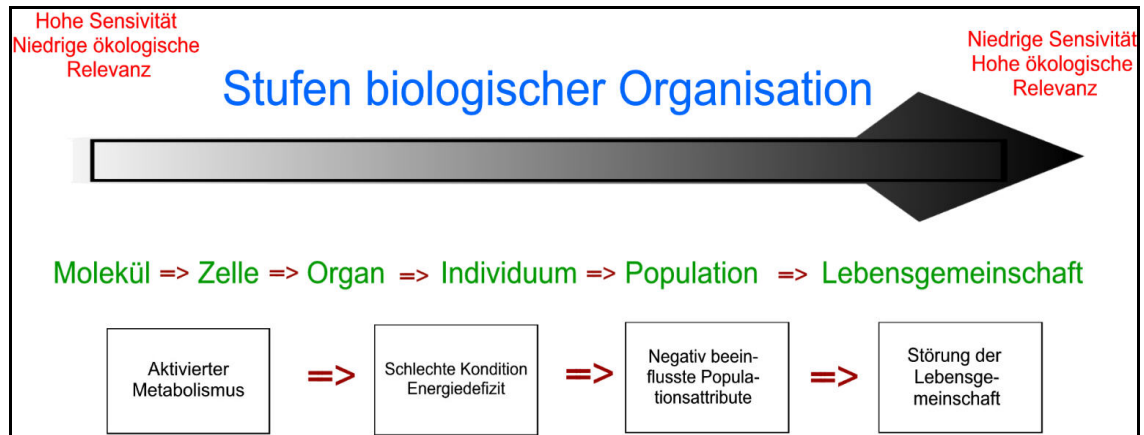


Abbildung 2: Mögliche Folgen durch Chemikalien im Organismus, aus TRIEBSKORN ET AL. (2002) verändert.

Wie in der Abbildung 2 dargestellt, kann die Wirkung in der Zelle eine Kaskade von negativen Folgen auf die nächsthöhere Ebene auslösen, was wiederum Folgen für die anderen Ebenen haben kann.

Eine gute Übersicht über die verschiedenen Auswirkungen hormonell wirkender Stoffe auf zellulärer Ebene bis hin zur Population geben die Autoren GULIETTE ET AL. (1995), COLBORN ET AL. (1993), ORLANDO ET AL. (2002), KNÖRR (2001, S. 1), HOCK ET AL. (2000) und SUMPTER (2002).

Festgestellt wurde beispielsweise ein negativer Reproduktionserfolg von Seevögeln an der Ostsee und Weißkopfsaadlern aufgrund einer Belastung durch endokrin wirksame Organochlorverbindungen in den Eiern dieser Tiere. (HELANDER ET AL. 1982; FALANDYSZ ET AL. 1994). Bei Möwen lösten diese Organochlorverbindungen zusätzlich Missbildungen und ein verändertes Brutverhalten aus (FRY 1995).

Ein Hinweis auf estrogene Wirkungen bei Fischen ist die Induktion bzw. das Vorhandensein von Vitellogenin im Plasma männlicher oder juveniler Fische. Dieses Vitellogenin ist der Vorläufer des Dotterproteins und somit ein spezielles Lipoprotein eierlegender Tiere. Es ist vornehmlich im Plasma weiblicher, geschlechtsreifer Fische zu finden und ist kommt in männlichen Tieren und nicht geschlechtsreifen Weibchen natürlicherweise nicht vor (GÜLDEN ET AL. 1997, S.16). Estrogene und estrogen wirkende Schadstoffe lösen aber nachweislich auch in männlichen Fischen die Produktion von Vitellogenin aus (LARSSON ET AL. 1998, TRIEBSKORN ET AL. 2002, RASMUSSEN ET AL. 2002; SUMPTER ET AL. 1995a, 1995b; LECH ET AL. 1996).

LEGLER ET AL. (2002) und WHITE ET AL. (1994) stellten eine gute Korrelation zwischen der Vitellogenin-Induktion und den Estrogen-Äquivalenz-Faktoren (EEQ) bestimmter Substanzen in der Galle derselben Fische fest. Auch TRIEBSKORN ET AL. (2002) fanden bei Untersuchungen in Fließgewässern heraus, dass die im biologisch relevanten Bereich liegende estrogene Aktivität im Wasser von mehreren ng EEQ/L mit einem erhöhten Vitellogeninspiegel von männlichen Regebogenforellen, einhergeht. Eine gute Korrelation von Octylphenolkonzentration im Wasser und Vitellogenininduktion in Aalmuttern konnte ebenfalls durch RASMUSSEN ET AL. (2002) bestätigt werden.

GÜLDEN ET AL. (1997, S.71f) und JOBLING ET AL. (2003), stellten neben der Vitellogen-Induktion auch eine Hemmung des Hodenwachstums, erhöhte Ei- und Embryoproduktion bei Fischen fest. Auf weitere Feminisierungen machten GULIETTE ET AL. (1994) nach einem Industrieunfall, bei dem große Mengen der Pestizide Dicofol und DDT in Gewässer von Florida gelangten, aufmerksam. Bei dortigen männlichen Alligatoren wurden beispielsweise kleinere Penisse und bei den Weibchen vermehrt unbefruchtete Eier nachgewiesen.

In der Embryonen der Aalmutter (*Zoarces viviparus*) konnten durch RASMUSEN ET AL. (2002) ebenfalls nach Exposition mit Octylphenol neben einer Wachstumshemmung auch eine Missbildung der Gonaden festgestellt werden.

Auch in den Aalmuttern der Wismarer Bucht konnten Reproduktionsstörungen nachgewiesen werden (GERCKEN ET AL. 2002). Als Ursache werden ebenfalls estrogen wirksame Substanzen im Wasser der Ostsee vermutet. Diese Reproduktionsstörungen waren zum Beispiel Feminisierungen in männlichen Aalmuttern. Dabei handelt es sich konkret um das Vorkommen weiblicher Keimzellen in männlichem Keimdrüsengewebe (Intersex) (GERCKEN ET AL. (2002). Die Aalmutter scheint davon besonders betroffen zu sein. Im Vergleich zum Dreistacheligen Stichling (*Gasterosteus aculeatus*) und zum Barsch (*Perca fluviatilis*) wiesen die untersuchten Aalmuttern aus den gleichen Gebieten das höchste Intersex-Vorkommen auf. So wurden zum Beispiel bei den Aalmuttern bis zu 27,8 %, bei den Stichlingen nur bis zu 12,5 % Intersexualität festgestellt (GERCKEN ET AL. 2002).

Des Weiteren wurden Reproduktionsstörungen in Form von Fehlbildungen von Eizellen (Atresien) und Erhöhung der 17β -Estradiol-Konzentration im Plasma in weiblichen Aalmuttern der Ostsee festgestellt (GERCKEN ET AL. 2001). Auch Vitellogeningehalte im Blutplasma männlicher Organismen, verschiedene Anzeichen früher Reifung, Zunahme von Lavalmortalität und Missbildungen, vermindertes Lavalwachstum und degenerierte Eier bzw. nicht entwickelte Eier

in weiblichen Ovarien sind Störungen, die in Fischen der Wismarer Bucht festgestellt worden sind.

Diese Aufzählung hormoneller Auswirkungen auf Tierpopulationen ließe sich aus der wissenschaftlichen Literatur beliebig erweitern.

2.2 Fremdstoffmetabolismus

In diesem Abschnitt wird der Abbau von Substanzen im Organismus beschrieben. Dabei wird auf die besondere Rolle der Galle in diesem Prozess eingegangen. Schließlich wird aufgezeigt, weshalb die Galle als Untersuchungsgegenstand zum Nachweis von Fremdstoffen geeignet ist.

2.2.1 Metabolismus in der Leber

Estrogene werden in Säugetieren und Fischen vornehmlich in der Leber metabolisiert. (LEGLER ET AL. 2002; YING ET AL. 2002; CLARKE ET AL. 1991). Dort werden sie beispielsweise oxidiert, hydroxiliert oder deoxiliert und methyliert (GÜLDEN ET AL. 1997, S.7).

Der Metabolismus in der Leber findet in zwei Phasen statt (FENT 1998, S. 133 ff.):

- Phase I: Entgiftung und Inaktivierung der Fremdstoffe durch Oxidation, Reduktion, Hydrolyse u.ä.,
- Phase II: Verbesserung der Wasserlöslichkeit der Metabolite zum Beispiel durch Anlagerung von Glucuronsäure (Glucuronidierung), Sulfatresten (Sulfatierung) oder Glutathionkonjugation.

Die Ausscheidung erfolgt dann über die Niere mit dem Harn oder bei größeren Molekülen – bei Menschen beispielsweise ab 475 Da – über die Galle und den Darm. (NAU, 1994, S.49)

Gallengängige Stoffe müssen aber nicht nur eine bestimmte Mindestgröße, sondern auch eine polare Gruppe aufweisen. Nach der Metabolisierung in der Phase II können diese Bedingungen erfüllt sein. Die quantitativ größte Bedeutung hat hier die Konjugation mit Glucuronsäure (UPMEIER, 2001, S. 15). Laut CLARKE ET AL. (1991) und THIBAUT ET AL. (2002) stellt die Glucuronidation den Hauptmetabolismusweg für viele Xenobiotica wie zum Beispiel Nonylphenol in Fischen dar. Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft die Glucuronidation von 17 β -Estradiol.

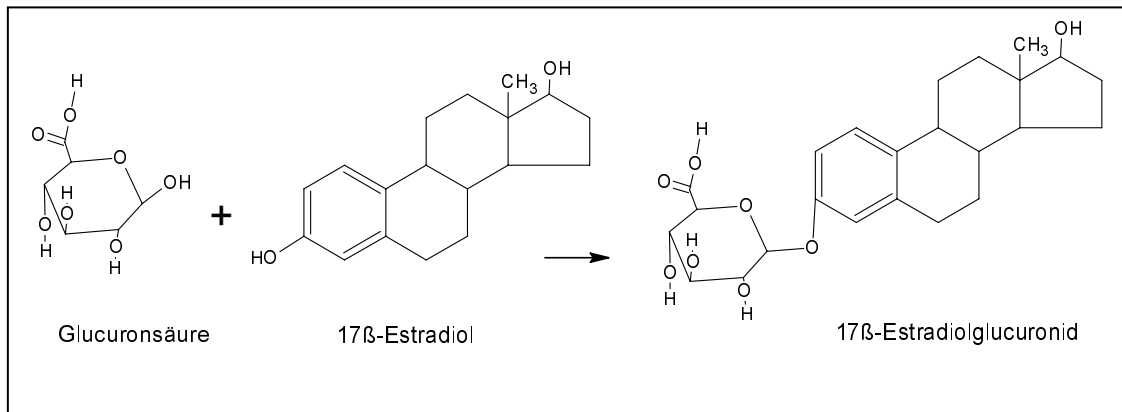


Abbildung 3: Glucuronidation von 17β-Estradiol.

Zwar sind die glucuronidierten und sulfatierten Estrogene inaktiv, doch können sie als „Reservoir“ dienen. Diese können nämlich durch Umwandlung mit Hilfe von Bakterien (u.a. in Kläranlagen oder im Darm zu finden) wieder in ihre aktive Form gebracht werden (YING ET AL. 2002; TERNES ET AL. 1999a).

2.2.2 Anreicherung in der Galle

In der Gallenflüssigkeit sind Fremdstoffe und damit auch Xenoestrogene im Organismus besonders gut nachweisbar, da zum einen die Leber der Hauptmetabolismusort für Fremdstoffe ist und es zum anderen zu einer Anreicherung durch den enterohepatischen Kreislauf kommen kann (FENT, 1998, S.156).

Die glucuronidierten und sulfatierten Estrogene werden in diesem Kreislauf zunächst als Glucuronide und Sulfate über die Galle zurück in den Darm transportiert. Hier werden sie vorzugsweise ausgeschieden. Sie können aber auch durch Rückreaktion von Darmbakterien als Ursprungssubstanz wiederum der Leber zugeführt werden. Es kommt dann zu einer verzögerten Anreicherung in der Leber und damit auch der Galle, was eine erhöhte Konzentration des Stoffs in dem Organismus zur Folge hat (SHARPE ET AL. 1993; UPMEIER 2001, S.15).

Von PEDERSEN ET AL. (2002) und SAKAMOTO ET AL. (2002) wurden beispielsweise bei der Untersuchung festgestellt, dass die höchste Konzentration von Industriechemikalien in der Galle zu finden ist. Auch nach zwei Tagen der Ausscheidungsphase im Experiment war kein signifikanter Rückgang der Konzentration in der Galle nachweisbar.

Zudem stellten sowohl PEDERSEN ET AL. (2002) als auch FERREIRA-LEACH ET AL. (2001) den höchsten BCF (Biomkonzentrationsfaktor) von *tert*-Octylphenol in der

Galle fest. In Weibchen lag der BCF bei 148, in Männchen bei 70, während im Muskel nur BCFs von 22–25 nachgewiesen wurden (PEDERSEN ET AL. 2002).

Auch LARSSON ET AL. (1999) und TRUSCOTT (1983) fanden in der Galle von Fischen 10^4 – 10^6 mal höhere Konzentrationen von endokrinen Substanzen als im Wasser. Laut FERREIRA-LEACH ET AL. (2001) sei die Messung von Alkylphenolmetaboliten in Gallenflüssigkeit nach einer Hydrolyse mit Enzym ein gutes Werkzeug, die Exposition von Organismen mit Alkylphenolen festzustellen.

2.3 Eintrag in die Umwelt

Im folgenden Abschnitt sollen die verschiedenen Quellen estrogener Substanzen aufgezeigt werden. Im Besonderen wird auf den Eintrag durch Kläranlagen eingegangen. Anschließend folgt ein eigener Abschnitt zu dem Eintrag und dem Vorkommen von Pharmaka in der Umwelt.

2.3.1 Quellen von Estrogenen und estrogen wirkenden Stoffen

Generell wird der Aufenthaltsort von Substanzen in der Umwelt vornehmlich durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Stoffe bestimmt. Besonders die Adsorptionsfähigkeit an Feststoffen und die Wasserlöslichkeit sind von entscheidender Bedeutung. Die Wasserlöslichkeit ist abhängig von der Polarität der Substanz und nimmt in der Regel mit zunehmender Polarität des Stoffes zu. Polare Verbindungen sind demnach hydrophil. Im Gegensatz dazu sind unpolare Verbindungen schlecht oder gar nicht wasserlöslich und somit hydrophob bzw. lipophil. Diese Substanzen neigen zur Adsorption an Feststoffen wie Sedimenten oder der Akkumulation in fetthaltigen Matrices wie zum Beispiel einem Organismus. Die Lipophilität einer Substanz wird durch ihren Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten beschrieben. Dabei stellt der verwendete $\log K_{ow}$ den dekadischen Logarithmus dieses Koeffizienten dar. Die Verteilung einer Substanz in den Phasen Wasser und Octanol gibt nicht nur Auskunft über die Lipophilität und damit auch der Wasserlöslichkeit und Sorptionsfähigkeit der untersuchten Substanz, sondern auch ihrer Fähigkeit zur Bioakkumulation im Organismus. Je lipophiler die Substanz ist, desto größer ist ihr Potential, sich in einem fettreichen Gewebe anzureichern (FENT 1998, S. 35f). Untersuchungen von LAI ET AL. (2000) beispielsweise zeigen, dass Estrogene hydrophobe organische Verbindungen mit geringem Dampfdruck sind. Daraus schlussfolgern YING ET AL. (2002), dass die Sorption dieser

Substanzen an Boden und Sediment ein signifikanter Faktor für ihre geringe Konzentration in Wasser ist.

KLOAS (1998) geht von drei Quellen estrogener Substanzen aus, die vorwiegend in Oberflächengewässer eingebracht und somit zur Gefahr von Fischen werden.

Als eine Quelle nennt KLOAS (1998) die Umweltchemikalien mit estrogener Wirkung wie zum Beispiel Bisphenol A oder Nonylphenol, die in nicht direkt toxischen Konzentrationen in die Umwelt abgegeben werden. Das sind zum Beispiel Bestandteile von Wasch-, Spül- oder Körperpflegemittel oder Ab- bzw. Auswaschungen von behandelten Lebensmitteln und deren Verpackungen, Gebrauchsgegenständen und Textilien (KLOAS 1998; KRISHNAN ET AL. 1993; BROTONS ET AL. 1995; GÜNTHER 1998).

BROTONS ET AL. (1995) untersuchten beispielsweise das Herauslösen von Bisphenol A aus lackierten Dosen. Folgende Tabelle 2 gibt die Konzentrationen von Bisphenol A in dem Inhalt (Gemüse) der Dosen wieder.

Tabelle 2: Konzentrationen von Bisphenol A in der wässrigen Phase von Gemüse aus lackierten Dosen, aus BROTONS ET AL. (1995), verändert.

Gemüse	Dosengewicht [g]	Flüssigkeitsmenge [mL]	Bisphenol A [µg/Dose]
Erbsen	300	50	~22.9
Artischocken	390	150	~18.6
Grüne Bohnen	400	190	~11.9
Mischgemüse	450	220	~10.1
Pilze	350	145	~4.2

Daneben zählt KLOAS (1998) auch hormonelle Kontrazeptiva wie 17α -Ethinylestradiol zu dieser Quelle. Allein in Deutschland liegt eine jährliche Produktionsmenge dieser Substanz in Deutschland bei 60 kg/a und ist damit limitiert, da sie natürlich nicht vorkommt. Die tägliche Anwendungsdosis liegt bei Hormonpräparaten für diesen Wirkstoff zwischen 10 und 50 µg (KALBFUS, 1998).

Eine natürliche Quelle stellen laut KLOAS (1998) die Phyto- und Mycoestrogene dar. Sie gelangen nicht zuletzt durch die Nahrungskette über Mensch und Tier in die Gewässer. In Soja, einem bedeutenden Nahrungsmittelbestandteil, sind Phytoestrogene besonders zahlreich zu finden (KLOAS 2001). In Deutschland

liegt die tägliche Aufnahme von Isoflavonen, zu denen auch die Phytoestrogene Genistein und Daidzein gehören, bei 2 mg. Im Gegensatz dazu liegt die Aufnahme von Isoflavonen in asiatischen Ländern bedingt durch die sojareichere Ernährung bei 15–40 mg pro Tag (KULLING ET AL. 2003, S. 239).

Zum anderen sind es die natürlichen Quellen von Mensch und Tier, die selbstsynthetisierte Estrogene oder deren Metabolite über den Harn abgeben.

JOHNSON ET AL. (2000) untersuchten die Exkretion von Steroidhormonen von Menschen in Flüssen Englands. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Ergebnisse. Dabei ist 17α -Ethinylestradiol zwar kein selbstsynthetisiertes Estrogen, wird aber aufgrund seiner Relevanz zum Vergleich an dieser Stelle mit aufgeführt.

Tabelle 3: Tägliche Abgabe von Steroidhormonen von Menschen JOHNSON ET AL. (2000), [$\mu\text{g}/\text{d}$].

[$\mu\text{g}/\text{d}$]	17β -Estradiol	Estron	Estriol	17α -Ethinylestradiol
Männer	1.6	3.9	1.5	-
Menstruierende	3.5	8	4.8	-
Menopausale	2.3	4	1	-
Schwangere	259	600	6000	-
Frauen mit Einnahme von Kontrazeptiva	-	-		35

Auch der Eintrag von Estrogenen aus der Viehzucht ist eine nennenswerte Quelle. Vor allem Schafe, Kühe, Schweine und Geflügel geben Steroidhormone durch Faeces und Urin ab (YING ET AL. 2002; BLOK ET AL. 2000 S. 5).

2.3.2 Eintragspfade von Estrogenen und estrogen wirkenden Stoffen

Zwei Eintagspfade sollen hier näher beleuchtet werden, da sie die Hauptpfade sowohl für natürliche, als auch für industrielle estrogene Substanzen darstellen. Dies ist zum einen das Kläranlagenabwasser und zum anderen die Klärschlamm- und Gülleverwertung als Dünger in der Landwirtschaft.

Nach SPENGLER ET AL. (2002) stellt besonders die Kläranlage bzw. deren Abwasser einen relevanten Eintragspfad für Estrogene und estrogen wirkende Substanzen in Oberflächengewässer und damit in die Umwelt dar. Zwar würden durch die in Deutschland praktizierte Abwasserreinigung ein Großteil der organischen Spurenstoffe aus dem Abwasser entfernt, trotzdem seien aber

messbare Konzentrationen estrogen wirkender Substanzen in den Kläranlagen-
ausläufen feststellbar. SPENGLER ET AL. (2002) kamen bei Untersuchungen von
Kläranlagen auf estrogen wirkende Stoffe zum Ergebnis, dass die technische
Ausstattung der Kläranlage Einfluss auf die gefundenen Konzentrationen in
deren Abläufen hat.

Durch das Vorhandensein von Enzymen, zum Beispiel von Glucuronidasen und
Sulfatasen, in der Kläranlage, können selbst inaktiv ausgeschiedene estrogen
wirksame Substanzen während der Reinigungsschritte in der Kläranlage zu den
ursprünglich aktiven Formen umgewandelt werden.

Auch die Nonylphenoethoxylate der Tenside sind nicht estrogen wirksam. Erst
durch den Abbau in der Kläranlage zu Nonylphenol wird eine hormonell
wirksame Substanz gebildet (SPENGLER 2001, S. 15). Die folgende Abbildung
zeigt den mikrobiellen Abbau der Nonylphenoethoxylate zu Nonylphenol in
vereinfachter Form.

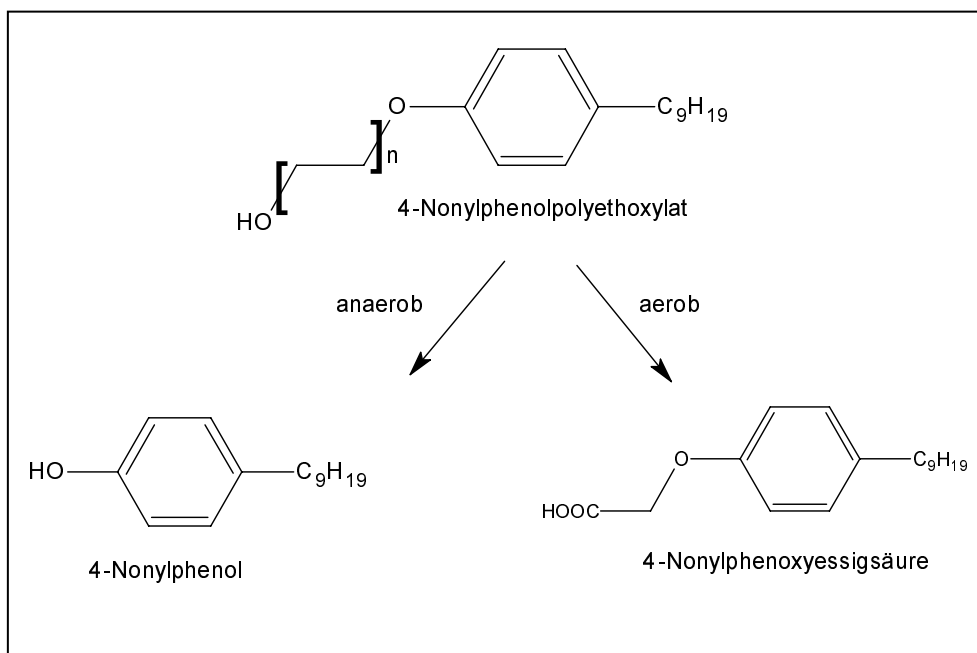


Abbildung 4: Mikrobieller Abbau von Tensiden in Kläranlagen (vereinfacht dargestellt) (SPENGLER 2001, S. 16).

Dieser mikrobielle Abbau, dargestellt in Abbildung 4, beruht auf der Abspaltung der Ethoxygruppen. Die nun entstandenen Nonylphenolmonoethoxylate und -diethoxylate sind biologisch schwerer abbaubar. Sie adsorbieren aufgrund ihrer höheren Lipophilität überwiegend an Feststoffen. Im Klärschlamm von Klär-

anlagen erfolgt nun der weitere Abbau zu Nonylphenol. (ARGE ELBE 2000, S. 5)

WELTIN ET AL. (2001) gaben eine Übersicht über das Vorkommen und die Abbaubarkeit von einigen endokrin wirkenden Substanzen in Kläranlagen an. Die folgende Tabelle gibt diese Daten wieder. E2 steht dabei für 17 β -Estradiol und EE2 für 17 α -Ethinylestradiol. NP ist die Abkürzung für Noylphenol, OP für 4*tert*-Octylphenol; BP A bedeutet Bisphenol A.

Tabelle 4: Vorkommen und Wirkung estrogen wirksamer Substanzen in Kläranlagen (WELTIN ET AL. 2001).

Substanz -----	Einheit	E2	EE2	NP	OP	BP A
Vorkommen						
im Abwasser	[ng/L]	1.1-5.8	1-42	im Mittel 2.3	im Mittel 1.2	≤0.7
im Klärschlamm	[μ g/kg]	>3.5	>255	≤360	≤20	≤1
im Gewässer	[ng/L]	>5.5	>0.3	0.2-60	≤21	≤0.2
Wirkschwelle	[ng/L]	1	2.5	20	5	25
Abbaubarkeit in Kläranlagen	[%]	64-99	0-78	Adsorption an Schlamm	Adsorption an Schlamm	92-96

Die Tabelle 4 zeigt, dass die Alkylphenole Nonylphenol (NP) und 4*tert*-Octylphenol (OP) am Klärschlamm adsorbieren. Die Anreicherung vom relativ persistenten und lipophilen Nonylphenol an Klärschlamm stellten auch SCHIEWER ET AL. (2001) fest. Die Autoren sprechen hier sogar von einem Risikopotential bei der landwirtschaftlichen Klärschlammverwertung, obwohl Nonylphenol eine viel geringere estrogen Aktivität als 17 β -Estradiol besitzt.

Eine Untersuchung von WELTIN ET AL. (2001) über Mobilität endokrin wirksamer Substanzen im Boden nach Klärschlammaufbringung ergab, dass es zwar zu einer langsamen Verlagerung solcher Substanzen in größere Bodentiefen kommt, eine Grundwassergefährdung aber nicht festzustellen ist. Ein erheblicher Austrag sei durch oberflächlich abfließendes Wasser von statten gegangen. Auch wäre das natürliche 17 β -Estradiol im Boden nicht mehr feststellbar gewesen (WELTIN ET AL. 2001).

Laut WEGENER ET AL. (1999) haben besonders synthetische Estrogene für den Austrag über das abfließende Wasser eine Bedeutung, da sie offenbar eine

höhere Persistenz als die natürlichen Estrogene besitzen. Die Autoren konnten für 17α -Ethinylestradiol nur eine Abbaurate von 15 % nach 12 Tagen feststellen. Neben der Aufbringung von Klärschlamm auf Äcker, ist der Eintrag von Estrogenen aus der Viehzucht durch Gülleaufbringung ebenfalls ein nennenswerter Eintagspfad. Vor allem Schafe, Kühe, Schweine und Geflügel geben Steroidhormone durch Faeces und Urin ab (YING ET AL. 2002; BLOK ET AL. (2000) S. 5, SHORE ET AL. 1993). Bei einer Studie in Neuseeland fanden SARMAH ET AL. (2004) 19–1360 ng/L 17β -Estradiol und 41–3123 ng/L an Estron als Eintrag von Milchkuhfarmen in die Umwelt. Diese Ausscheidungen könnten laut BLOK ET AL. (2000 S. 25) durch Gülleausbringung auf Äcker über den Boden ins Grundwasser oder durch Oberflächenabfluss direkt in Gewässer gelangen.

2.3.3 Vorkommen

Trotz der scheinbar guten Abbaubarkeit in der Tabelle 4 genannter Substanzen in Kläranlagen stellte BOLZ ET AL. (2002) und KÖRNER ET AL. (2001) dennoch bei Untersuchungen von Kläranlagen eine estrogene Gesamtaktivität zwischen 13 ng EEQ/L und 82 ng EEQ/L im Kläranlagenzulauf und 0,2 ng EEQ/L und 7,8 ng EEQ/L in Kläranlagenablauf fest. Dabei bezeichnen die Autoren die estrogene Gesamtaktivität als Summenparameter, der alle an den Estrogen-Rezeptor bindenden Substanzen summarisch unter Berücksichtigung der individuellen substanzspezifischen Wirkstärke erfasst.

Ein Vergleich der Ergebnisse verschiedener Untersuchungen zeigt auch, dass die große Mengen von Estrogenen und estrogen wirksamen Stoffen im Wasser von Kläranlagenausläufen zu finden sind. Eine Tabelle mit Ergebnissen von entsprechenden Studien befindet sich unter Punkt 8.2.2 im Anhang dieser Arbeit.

PURDOM ET AL. (1994) identifizierten Abläufe von Kläranlagen und Industriebetrieben ebenfalls als Hauptquelle für estrogene Effekte auf dortige Fische. Die Untersuchungen ergaben in männlichen Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), die in verdünntem Kläranlagenablaufwasser exponiert wurden, eine Induktion von Vitellogenin und ein verlangsamtes Hodenwachstum.

Trotz einer Verdünnung durch das Umgebungswasser, in das die Kläranlagenausläufe münden, sind die estrogen wirkenden Substanzen in Oberflächengewässern in nicht geringen Mengen nachweisbar. Eine Tabelle mit Ergebnissen von entsprechenden Studien befindet sich ebenfalls unter Punkt 8.2.1 im Anhang dieser Arbeit.

Studien ergaben, dass der Vitellogeninspiegel direkt mit der Entfernung der Organismen zum Kläranlagenablauf korreliert. SUMPTER ET AL. (1995a) fanden heraus, dass nach wenigen hundert Metern unterhalb der Kläranlage bei guter Wasserqualität die hormonelle Wirkung nachlässt. Bei belasteten Flüssen tritt die Wirkung auch nach einigen Kilometern flussabwärts noch auf.

Auch in der Wismarer Buch konnten durch Iris-C. Beck bereits estrogen wirksame Verbindungen im dortigen Ostseewasser nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von Iris-C. Beck). Besonders die Industriechemikalien Nonylphenol und Bisphenol A sind in nicht geringen Mengen nach einer Kläranlage im Oberflächenwasser zu finden.

FENT (2000) konnte estrogen wirkende Substanzen im Trinkwasser nachweisen. Diese Ergebnisse von FENT (2000) sind beispielhaft in einer Tabelle im Anhang unter 8.2.3 aufgeführt.

2.3.4 Arzneimittel in der Umwelt – Eintragswege und Vorkommen

Arzneimittel werden in Mitteleuropa aufgrund des ausgedehnten Gesundheitswesens in beträchtlichen Mengen verabreicht. Allein in Deutschland sind rund 3000 verschiedene Arzneimittelwirkstoffe auf dem Markt. Viele Wirkstoffe werden in der Größenordnung von Tonnen pro Jahr, einzelne Wirkstoffe gar bis zu mehrere hundert Tonnen pro Jahr verabreicht (LEHMANN, 2002, S. 1). Die eingenommenen Arzneimittel werden vom Patienten unverändert oder durch den Stoffwechselprozess verändert (metabolisiert) wieder ausgeschieden und gelangen in der Regel über die natürlichen Ausscheidungen wie Urin oder Faeces in das Abwassersystem (STAN ET AL. (1997). Pharmaka wie zum Beispiel Diclofenac, die als Inhaltsstoffe von Salben zur äußerlichen Anwendung eingesetzt werden, können auch direkt durch Abwaschen der Haut in das Abwasser gelangen. Auch die unsachgemäße Entsorgung abgelaufener Arzneimittel über die Toilette stellt einen nicht zu vernachlässigenden Anteil für den Eintrag von Arzneistoffen in das Abwasser dar. Über die kommunalen Kläranlagen können die Arzneistoffe in Fließgewässer gelangen. Das Grundwasser kann durch Einsickern von belastetem Oberflächenwasser oder durch beschädigte Abwasserleitungssysteme mit Arzneimitteln verunreinigt werden (TERNES 1998b; TERNES ET AL. 1999b; HEBERER ET AL. 1998).

TERNES ET AL. (1998b) untersuchten verschiedene Pharmaka im Auslauf einer hessischen Kläranlage. Tabelle 5 mit den Ergebnissen soll einen Einblick in die

Konzentrationsbereiche von Arzneimitteln im Wasser nach der Reinigung durch eine Kläranlage geben.

Tabelle 5: Konzentrationen von Pharmaka nach einer hessischen Kläranlage (TERNES ET AL. 1998b), verändert.

Substanz	Mittlere Konzentration im Zulauf [µg/L]	Mittlere Konzentration im Ablauf [µg/L]
Bezafibrat	5.6 ± 1.6	0.92 ± 0.24
Carbamazepin	2.2 ± 0.4	2.0 ± 0.2
Diclofenac	1.9 ± 0.2	0.58 ± 0.03
Gemfibrozil	0.94 ± 0.11	0.29 ± 0.06

Im Vergleich zum Kläranlagenzulauf fällt auf, dass Carbamazepin in der Kläranlage nicht abgebaut wird. Anders dagegen Bezafibrat, Diclofenac und Gemfibrozil. TERNES ET AL. (1998b) stellten bei diesen Arzneistoffen eine Eliminierungsrate von ca. 69–75 % fest. Arzneistoffe mit lipophilen Eigenschaften adsorbieren an dem Klärschlamm und werden bei der Sedimentation in der Kläranlage so dem Abwasser entzogen. Pharmaka, die polar sind adsorbieren nicht oder nur unwesentlich am Klärschlamm und können vermehrt die Kläranlage im Wasser passieren. Betrachtet man die Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten der Arzneimittel, so stellt man fest, dass Bezafibrat, Diclofenac und Gemfibrozil mit einem $\log K_{ow} > 2.5$ Eigenschaften zur Adsorption an Sedimenten aufweisen. Carbamazepin dagegen mit einem $\log K_{ow} < 2.5$ zeigt eine geringere Adsorptionsfähigkeit an Feststoffe, was die Ergebnisse der Eliminierungsraten in der Kläranlage unterstützen. Die genauen Werte von $\log K_{ow}$ sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ausgewählter Pharmaka, aus ARGE ELBE 2003, S. 32, verändert.

Substanz	Log K_{ow}
Bezafibrat	4.25
Carbamazepin	2.45
Diclofenac	4.51
Gemfibrozil	3.90

Besonders im Hinblick auf eine Klärschlammverwertung in der Landwirtschaft und der damit eventuell bestehenden Gefahr für das Grundwasser sind die Ergebnisse von SACHER (2002) von Untersuchungen von Pharmaka im

Grundwasser Baden-Württembergs ernst zu nehmen. Carbamazepin wurde von SACHER (2002) im Grundwasser mit einer Maximalkonzentration von 900 ng/L und Diclofenac mit 590 ng/L nachgewiesen.

Untersuchungen von Wasser der Wismarer Bucht auf Pharmaka ergaben für Carbamazepin eine mittlere Konzentration von 0.69 ng/L, für Gemfibrozil 0.035 ng/L und für Bezafibrat 0.2 ng/L. Diclofenac dagegen konnte im Wasser der Wismarer Bucht nicht nachgewiesen werden (DORKA 2004 S. 80, 76).

2.4 Stand des Wissens zu den Analyten

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit den untersuchten Analyten und soll ihre Struktur, ihre Eigenschaften, ihr Vorkommen und Verwendung darstellen. Dabei sind die Substanzen unterteilt in natürliche Estrogene (tierischen und pflanzliche hormonartige Stoffe), sowie den synthetischen Estrogenen. Des Weiteren werden die Industriechemikalien Bisphenol A und zwei Alkylphenole vorgestellt. Anschließend sind die Pharmaka aufgeführt. Schließlich erfolgt eine Übersicht über die bisherige Analytik, mit denen sowohl die estrogen wirksamen Substanzen als auch die Pharmaka nachgewiesen worden sind.

2.4.1 Chemische Struktur, Verwendung und Vorkommen der Substanzen

In diesem Abschnitt soll auf die Eigenschaften, das Vorkommen in der Umwelt und die Herstellung bzw. die Verwendung der untersuchten Substanzen eingegangen werden. Daneben werden auch die Beziehungen bestimmter Stoffe zueinander aufgezeigt.

Die in der Umwelt gemessenen Konzentrationen der einzelnen Substanzen sind in Form von Tabellen im Anhang unter Punkt 8.2 angeführt.

Natürliche Estrogene

Natürliche Estrogene können in drei Gruppen unterteilt werden: Estrogene in Tier und Mensch sowie in Pflanzen (Phytoestrogene) und Pilzen (Mycoestrogene).

Die bekanntesten Estrogene mit Steroidstruktur in Mensch und Tier sind das natürliche weibliche Geschlechtshormon 17 β -Estradiol und seine Metabolite Estron und Estriol. Diese Substanzen werden bereits vollsynthetisch hergestellt. Natürlicherweise werden sie hauptsächlich in den Ovarien von reifenden Follikeln und der Plazenta gebildet. In geringen Mengen findet die Bildung auch

im Fettgewebe, den Nebennieren und den Hoden statt. Aber auch durch den Metabolismus werden Estron und Estriol als Abbauprodukt in der Leber gebildet. Dabei sind Estron und 17 β -Estradiol enzymatisch wechselseitig ineinander umwandelbar. Da die Metabolisierung in der Leber schnell verläuft, wirkt 17 β -Estradiol nach oraler Aufnahme nur bei hoher Dosierung, so dass zum Beispiel die Konzentration von 17 β -Estradiol als natürlicher Inhaltsstoff im Fleisch bei dessen Verzehr für eine hormonelle Wirkung nicht ausreicht. (FALBE ET AL. 1995). Von den natürlichen Steroid-Estrogenen besitzt 17 β -Estradiol die höchste hormonelle Aktivität. Estriol dagegen weist nur noch 1/10 der Estradiol-Aktivität auf. Die Halbwertszeit von 17 β -Estradiol im Plasma einer Frau beträgt ca. 20 Minuten. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von einigen Estrogenen wurden vom LAI ET AL. (2000) untersucht. In Tabelle 7 sind diese Eigenschaften aufgeführt.

Tabelle 7: Physikalisch-chemische Eigenschaften von Estrogenen, LAI ET AL. (2000), verändert.

Substanz	Wasserlöslichkeit [mg/L bei 20°C]	Dampfdruck [mm Hg]	Log K_{ow}
Estron	13	2.3 x 10 ⁻¹⁰	3.43
17β-Estradiol	13	2.3 x 10 ⁻¹⁰	3.94
Estriol	13	6.7 x 10 ⁻¹⁵	2.81

17 β -Estradiol findet Verwendung als Anabolikum in der Tiermast, was allerdings in Deutschland verboten ist. Des Weiteren dient 17 β -Estradiol in Medikamenten der Vermeidung von Fehlgeburten und nach der Menopause zur Behandlung von Brustkrebs und Osteoporose. Estron dagegen findet Verwendung als Ausgangsmaterial für die Synthese von 17 α -Ethinylestradiol und ähnlichen Derivaten (FALBE ET AL. 1995).

Natürliche Estrogene und ihre Metabolite sind in Ausläufen von Kläranlagen in größeren Mengen nachweisbar. Untersuchungen von Kläranlagenabflüssen in Deutschland ergaben Konzentrationen für 17 β -Estradiol von 0.15–21 ng/L und für Estron von 0–37 ng/L (STUMPF ET AL. 1996; KUCH ET AL. 2001; SPENGLER ET AL. 2002). Der Metabolit Estriol im Kläranlagenauslauf konnte bei STUMPF ET AL. (1996) nicht nachgewiesen werden.

Im Oberflächenwasser konnte von KUCH ET AL. (2001) 17β -Estradiol in Höhe von 0.15–3.6 ng/L und Estron in Höhe von 0.1–4.1 ng/L in Flüssen nachgewiesen werden. Selbst im Trinkwasser ist Estron mit 0.2–0.6 ng/L und 17β -Estradiol mit 0.3–2.1 ng/L zu finden (KUCH ET AL. 2001).

Neuste Untersuchungen von TERNES ET AL. (2004, S. 70–72) zeigen, dass in Aalgalle aus süddeutschen Flüssen zwar das natürliche Estrogen 17β -Estradiol mit bis zu 0.49 $\mu\text{g/ml}$ aber kein Estron zu finden ist.

Phytoestrogene

Viele der aus Pflanzen bekannten Verbindungen weisen in ihrer chemischen Struktur phenolische und aliphatische Hydroxylgruppen auf, die den Estrogenen und Androgenen sehr ähneln. Diese so genannten Phytoestrogene gehören zu den Polyphenolen und lassen sich im Wesentlichen drei Strukturklassen zuordnen: Den Isoflavonen, den Lignanen und den Coumestanen

Die Isoflavone Genistein und Daidzein kommen überwiegend in Schmetterlingsblütlern (Fabaceae) und hier besonders bei den Hülsenfruchtartigen (*Leguminosae*) vor. Einige Isoflavone zeigen estrogene Wirkung auf Weidetiere und können gegebenenfalls zu Fortpflanzungsstörungen führen (FALBE ET AL. 1995; GREIM 1998). Auch SOTO ET AL. (1992) wiesen beispielsweise durch einen Bioassay eine estrogenen Aktivität von Sojamilch nach. Die Sojabohne ist eine besonders reichhaltige Quelle von Genistein und Daidzein. Je nach natürlichen Schwankungen konnte ein Gesamtgehalt von 300 mg an Isoflavonen in 100 g Sojabohnen festgestellt werden, wobei ein Verhältnis von Genistein zu Daidzein von 10:8 vorliegt (ZITTERMANN 2002, S. 1; KULLING ET AL. 2003, S. 234). Tabelle 8 zeigt eine Auswahl von Lebensmitteln und deren Gehalt an Genistein und Daidzein.

Tabelle 8: Gehalt an Isoflavonen in Lebensmitteln in mg/100g Frischgewicht, aus USDA-Datenbank; Kulling et al. (2003, S. 234).

Lebensmittel	Genistein [mg/100g]	Daidzein [mg/100g]
Sojabohnen	30–92	20–52
Sojamilch	3–17	1–13
Tofu	8–20	7–11
Sojasprossen	2	2,5
Kleesprossen	0,1–0,4	0,0–0,1
Bohnen*	0,0–0,7	0,0–0,02
Erbsen*	0,0–0,6	0,0–7,3
Obst/Gemüse	0,0–0,2	0,0–0,2

*Verschiedene Sorten

Über die Nahrung werden weit größere Mengen dieser Phytoestrogene aufgenommen als durch das Trinkwasser zugeführt werden könnte. HELMREICH (2001) sieht daher geringen Konzentrationen von Isoflavonen in Trinkwasser für die Gesundheit des Menschen als vernachlässigbar an. Verglichen mit 17 β -Estradiol ist die estrogene Wirkung von Isoflavonen, zu denen auch Genistein und Daidzein gehören, zwar mindestens um den Faktor 1000–10000 geringer, aber dafür können Phytoestrogene im Körper in einer 100–10000fach höheren Konzentration als die endogenen Estrogene vorkommen. GREIM (1998) spricht sogar von ganzen Größenordnungen, die der Plasmaspiegel dieser Substanzen höher liegen soll als der Estradiolspiegel. Gerade bei Neugeborenen, die eine weitaus geringere Metabolisierungsleistung als Erwachsene haben, konnten bei sojareicher Ernährung hohe Isoflavonkonzentrationen im Urin festgestellt werden. Auch können Phytoestrogene, je nach Höhe des endogenen Estrogen-spiegels sowohl eine estrogene als auch eine antiestrogene Wirkung hervorrufen (KULLING ET AL. 2003, S. 234; METZLER ET AL. 2001).

Im Organismus werden Genistein und Daidzein relativ schnell abgebaut. Untersuchungen von ZITTERMANN (2002, S. 1) ergaben, dass bereits zwei Tage nach oraler Verabreichung von Genistein und Daidzein im Harn wieder die Konzentrationen vorlagen, die vor der Einnahme feststellbar waren. Dabei erfolgte die Ausscheidung zu 10–20 % über den Harn. Allerdings unterliegen diese durch den enterohepatischen Kreislauf einem den Steroidhormonen ähnlichen Kreislauf (KULLING ET AL. 2003, S. 235)

KULLING ET AL. (2003, S. 234) fanden heraus, dass die maximale Plasmakonzentration von Genistein und Daidzein nach 6–8 Stunden erreicht wird und sich daraus eine Halbwertszeit von Genistein zwischen 6–8 Stunden und von Daidzein von 5–6 Stunden ergibt.

Genistein und Daidzein wurden von TERNES ET AL. (2004, S. 70–72) in der Aalgalle untersucht. Dabei konnte Daidzein nicht, aber Genistein mit bis zu 0.15 µg/mL nachgewiesen werden. SPENGLER ET AL. (2001) konnten an Kläranlagenabläufen zwischen 2.7 und 38 ng/L Genistein nachweisen.

Synthetische Estrogene

Als synthetisches Estrogen wurde 17 α -Ethinylestradiol untersucht. Es kommt in der Umwelt nicht natürlich vor, sondern wird aus Estron durch die Einführung der 17 α -Ethinyl-Gruppe synthetisch hergestellt. Der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient von 17 α -Ethinylestradiol liegt wie die der natürlichen Estrogenen bei 3.7–3.9 (YOON ET AL. 2003). Durch seine geringe Wasserlöslichkeit und dem relativ hohen Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten besteht die Wahrscheinlichkeit einer Adsorption an Sedimenten und, wenn kein Metabolismus stattfindet, ein Potential zur Bioakkumulation. Eine Beurteilung der Verteilung von 17 α -Ethinylestradiol zum Beispiel in Kläranlagen wird durch die Ausscheidung aus dem Organismus als wasserlöslicher Metabolit erschwert (SCHWEINFURTH ET AL. 1997).

Verwendung findet es in Kontrazeptiva. Zudem dient es der Synthese anderer synthetischer Estrogene und Gestagene. HELMREICH (2001, S. 8) sieht selbst niedrige Konzentrationen dieses synthetischen Estrogens kritisch, da es im Gegensatz zum 17 β -Estradiol ein viermal höheres Wirkungspotential besitzt. Durch die Ethinyl-Gruppe wird die Estrogenität des Grundkörpers 17 β -Estradiol nicht verringert, aber der Stoffwechsel in der Leber hingegen deutlich verlangsamt. Damit wird der Abbau der Substanz erschwert. Dies führt zu einer längeren Verweildauer im Körper und damit zu einem erhöhtem Wirkpotential (FALBE ET AL. 1995). PURDOM ET AL. (1994) beispielsweise fanden heraus, dass eine Konzentration von 0.1–0.5 ng/l ausreicht, um bei männlichen Fischen eine Induktion von Vitellogenin auszulösen.

Zwar ist 17 α -Ethinylestradiol für die Veterinärmedizin nicht zugelassen, aber FALBE ET AL. (1995) vermuten trotzdem einen illegalen Einsatz in der Tiermast. Die Produktionsmenge dieser Substanz in Deutschland liegt bei 60 kg/Jahr. Die

tägliche Anwendungsdosis liegt bei Hormonpräparaten für diesen Wirkstoff zwischen 10 und 50 µg (KALBFUS, 1998).

Bei einer Untersuchung TERNES ET AL. (1999a) über den abiotischen Abbau von Estrogenen in Klärschlamm erwies sich 17 α -Ethinylestradiol als persistent.

17 α -Ethinylestradiol konnte von verschiedenen Autoren in Kläranlagenabläufen mit einer Konzentration von 0.1–62 ng/L nachgewiesen werden (SPENGLER ET AL. 2002, S. 30; LARSSON ET AL. 1999; KUCH ET AL. 2001; STUMPF ET AL. 1996).

In Oberflächengewässern lag die Konzentration laut STUMPF ET AL. (1996) und KUCH ET AL. (2001) bei 0.1–5.1 ng/L. Berücksichtigt man, dass für synthetische Estrogene bei Fischen eine estrogene Aktivität bereits im unteren ng/L-Bereich möglich ist, so kann bei diesen Konzentrationen in Oberflächengewässern eine estrogene Wirkung nicht ausgeschlossen werden (ARGE ELBE, 2000, S. 4). Im Trinkwasser wurden 0.15–0.5 ng/L nachgewiesen (KUCH ET AL. 2001).

In den Gallen von Aalen in der Studie von TERNES ET AL. (2004, S. 70–72) konnte 17 α -Ethinylestradiol allerdings nicht festgestellt werden.

Industriechemikalien:

Von estrogen wirksamen Industriechemikalien wurden Bisphenol A und die Alkylphenole Nonylphenol und 4*tert*-Octylphenol ausgewählt.

Bisphenol A

Bisphenol A gehört zu den weltweit meistproduzierten Chemikalien (GÜLDEN ET AL. 1997, S.135). Verwendung findet es als Antioxidant für Weichmacher und als Fungizid. Des Weiteren entsteht es als Zwischenprodukt bei der Herstellung von Epoxid-, Polycarbonat- und Phenol-Harzen, Gerbstoffen, Farbstoffen und ähnlichen. Bisphenol A ist auch Bestandteil von Zahnfüllmaterialien (FALBE ET AL. 1995). Laut BOLZ (2000, S. 9) lag die Weltproduktion von Bisphenol A 1993 bei 640000 t.

Bei GÜLDEN ET AL. (1997, S. 136) wird die Wasserlöslichkeit mit 120 mg/L bei 25 °C angegeben und ist damit gering. Durch seine mittlere Lipophilität bindet es mehr oder weniger stark an Feststoffen wie Boden-, Schwebstoff- und Sedimentpartikeln. Aufgrund des Fehlens von hydrolysierbaren funktionellen Gruppen am Molekül scheint ein abiotischer Abbau im Wasser unbedeutend.

In der Literatur sind Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten zwischen 2.2 und 3.83 zu finden (DORN ET AL. 1987). Der rechnerisch ermittelte Biokonzentrationsfaktor von Bisphenol A liegt bei 42 bzw. 196 (GÜLDEN ET AL. 1997, S. 137) und seine estrogene Aktivität ist 15000-fach geringer als die des 17 β -

Estradiols (GAIDO ET AL. 1997). Es wird eine Halbwertszeit von Bisphenol A von bis zu vier Tagen in Abwasser angegeben (STAPLES ET AL. 1998). Diese Werte verweisen auf eine geringe Bioakkumulation in aquatischen Organismen und eine relativ schnelle biologische Abbaubarkeit hin. Eine Elimination von Bisphenol A wurden von WELTIN ET AL. (2002) in elf deutschen Kläranlagen mit 61–98 % nachgewiesen.

Bisphenol A konnte in Kläranlagenausläufen mit einer Konzentration von 4.8–1000 ng/L nachgewiesen werden, während in Oberflächengewässern nur 0.5–150 ng/L zu finden waren (KUCH ET AL. 2001; HEISTERKAMP, 2003, S 61; LARSSON ET AL. 1999; SPENGLER ET AL. 2002; ARGE ELBE 2000; SACHER 2002, S.63f). Im Trinkwasser konnte Bisphenol A aber immer noch mit 0.5–2 ng/L gefunden werden (KUCH ET AL. 2001)

Alkylphenole

GÜLDEN ET AL. (1997, S.77) stellten fest, dass Alkylphenole nur dann estrogen aktiv sind, wenn sich die Alkylgruppe in *para*-Stellung befindet. Auch ist die Länge der Alkylkette für die estrogen Aktivität bedeutend. Gruppen mit weniger als vier Kohlenstoffatomen sind demnach ebenfalls inaktiv. Bei Phenolen mit Alkylgruppen mit vier oder mehr Kohlenstoffatomen sind aber festgestellten die estrogenen Potenzen nicht einheitlich. Festzustellen war lediglich, dass Octylphenol eine größere estrogen Potenz besitzt als Nonylphenol.

Das technische Gemisch Nonylphenol besteht zu 85 % aus p-Nonylphenol (verschiedenen verzweigten Seitenketten), zu 10 % aus o-Nonylphenol und zu 5 % aus Decylphenol. Es ist wirtschaftlich das bedeutendste Alkylphenol. Es wird zur Herstellung von Tensiden, Emulgatoren, Kunstharzen, Antioxidantien, Stabilisatoren sowie von Fungiziden und Bakteriziden verwendet. Die Verwendung von Alkylphenolethoxylaten in Wasch- und Reinigungs- sowie Putzmitteln ist allerdings in Deutschland seit 1986 durch freiwilligen Verzicht der Industrie eingestellt worden (GÜNTHER 1998). Trotzdem beläuft sich der jährliche Verbrauch von Nonylphenolpolyethoxylaten (Tenside) in Europa auf 75000 t, denn diese finden weiterhin in einigen Reinigungsmitteln und anderen Produkten Verwendung (JOBILING ET AL. 1993; FENT, 1998, S. 233).

4*tert*-Octylphenol findet Verwendung als Desinfektionsmittel, zur Herstellung von Kunstharzen, Korrosionsverhütungsmitteln, Weichmachern, Schmieröl-zusätzen, Arzneimitteln und Antioxidantien. Produziert wird 4*tert*-Octylphenol in wesentlich geringeren Mengen als Nonylphenol ist aber in dem technischen

Gemisch von Nonylphenol in geringen Anteilen enthalten.

Der biologische Abbau von Nonylphenol in Gewässern ist langsam. Durch seinen lipophilen Charakter besitzt es ein Bioakkumulationspotential, und wird daher in fettreichen Geweben akkumuliert. (THIBAUT ET AL. 1999, ARUKWE ET AL. 2000 ; SNYDER ET AL. 2001b). EKELUND ET AL. (1990) und VILLENEUVE ET AL. (2002) wiesen bei Laborexperimenten an Stichlingen einen Biokonzentrationsfaktor von 550–1300 in den Fischen nach.

Nonylphenol kann in Wasser auch abiotisch durch Photolyse abgebaut werden. An der Oberfläche natürlicher Gewässer wurde eine Halbwertszeit von 10–15 Stunden durch AHEL ET AL. (1994) festgestellt.

Nonylphenol und 4*tert*-Octylphenol wurde in besonders großen Mengen an Kläranlagenabläufen gefunden. Untersuchungen von SPENGLER ET AL. (2002, S.30) ergaben eine Konzentration von bis zu 3100 ng/L Nonylphenol, während HEISTERKAMP (2003, S. 61) und KUCH ET AL. (2001) nur 42–770 ng/L feststellten. Während KUCH ET AL. (2001) in Kläranlagenabläufen 2.2–7.3 ng/L Octylphenol fanden, wurden im Oberflächenwasser von verschiedenen Autoren Konzentrationen von 0.4–54 ng/L nachgewiesen. (ARGE ELBE 2000).

In Oberflächenwasser wurde Nonylphenol mit Konzentrationen zwischen 7 und 134 ng /L nach (SACHER 2002, S. 63f; ARGE ELBE 2000; KUCH ET AL. 2001).

In Trinkwasser wurden immer noch 2.5–16 ng/L 4-Nonylphenol und bis zu 4.9 ng/L 4*tert*-Octylphenol gefunden (KUCH ET AL. 2001).

Arzneimittelwirkstoffe

Wirkstoffe sind Substanzen, die in lebenden Organismen eine biologische Wirkung hervorrufen. Dabei ist die biologische Wirkung die Gesamtheit der durch den Wirkstoff hervorgerufenen Veränderung in einem biologischen System. Arzneistoffe sind Wirkstoffe, die zur Vorbeugung, Linderung, Heilung und Erkennung von Krankheiten dienen können. Unter Arzneimitteln versteht man eine bestimmte Zubereitungsform von Arzneistoffen, die bei Menschen oder Tieren angewendet werden können. (MERSMANN 2003, S. 20). Die untersuchten Pharmaka gehören zu den Human-Pharmaka und sind polare bis mittelpolare, organische Verbindungen. Diclofenac wird auch in der Tiermedizin eingesetzt.

Im Folgenden sollen nun die untersuchten Substanzen nach Indikatorgruppen vorgestellt werden.

Lipidsenker

Gemfibrozil und Bezafibrat gehören zur Gruppe der Fibrate und sind Arzneimittelwirkstoffe zur Senkung der Blutfettwerte. Sie senken sowohl den Triglyceridspiegel als auch den Cholesterinspiegel im Blut und zählt somit zu den Lipidsenkern. Der genaue Wirkmechanismus dieser Arzneimittelwirkstoffe ist noch nicht genau geklärt. In diesem Zusammenhang werden jedoch die Aktivierung und auch Hemmung bestimmter Enzyme, die bei der Umwandlung und Entstehung der Blutfette eine wichtige Rolle spielen, diskutiert.

Bezafibrat wurde 1973 gegen Hyperlipidämien von Boehringer Mannheim (Cedur[®]) und Gemfibrozil 1969 und 1972 von Parke, Davis (Gevilon[®]) patentiert (FALBE ET AL. 1995). Diese Substanzen sind aber inzwischen generikfähig und in verschiedensten Medikamenten enthalten (FALBE ET AL. 1995).

Bei PFLUGER ET AL. (2001, S. 2) konnte für Bezafibrat keine estrogenere Potenz für die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) sowie den Karpfen (*Cyprinus carpio*) nachgewiesen werden.

Antirheumatika

Antirheumatika gehören zu den verordnungstärksten Arzneimittelwirkstoffen in Deutschland. Diclofenac gehört zu dieser Wirkstoffgruppe. Dieser Wirkstoff führt zur Verringerung oder Unterdrückung des Schmerzempfindens und wird u.a. bei der Behandlung von Rheuma durch seine entzündungshemmende Eigenschaft bei degenerativen Veränderungen eingesetzt.

Diclofenac gehört zu den Phenyllessigsäurederivaten und kommt in pharmakologischen Präparaten als Mononatrium- oder Monokaliumsalz vor. Dieser „saure“ Wirkstoff weist eine pH-Abhängigkeit auf. (RÁFOLS ET AL. 1997; MERSMANN 2003, S. 25). Als Voltaren[®] wurde es 1966 und 1971 von Geigy patentiert. In die Umwelt gelangen laut MERSMANN (2003, S. 21) 21–64 t/a an Diclofenac. Diese Substanz wird fast vollständig im Körper metabolisiert. Nur 1 % wird unverändert über die Niere ausgeschieden. Die Halbwertszeit beträgt etwa 2 Stunden und die Bioverfügbarkeit dieser Substanz liegt bei 55 %. Bei PFLUGER ET AL. (2001, S. 2) wurde eine estrogenere Potenz für Diclofenac für die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) sowie den Karpfen (*Cyprinus carpio*) nachgewiesen.

Antiepileptika

Carbamazepin gehört zu der Wirkstoffklasse der Harnstoffderivate und wurde als Antiepileptikum 1960 von Geigy patentiert (Tegretal[®]). Dieser Arzneimittel-

wirkstoff ist inzwischen ebenfalls generikfähig (FALBE ET AL. 1995).

Carbamazepin wird zur Behandlung von verschiedenen anfallsartig auftretenden Krankheiten mit gesteigerter Erregbarkeit zentraler Neuronen verwendet. Carbamazepin ist eins der meistverordneten Antiepileptika und gelangt laut MERSMANN (2003, S. 21) mit 14–108 t/a in die Umwelt.

Generell weisen aromatische Stickstoffverbindungen, wie sie bei Carbamazepin vorliegen, ein Potential für photochemischen Abbau auf. Carbamazepin besitzt eine Halbwertszeit im Körper von 18–65 Stunden bei Einzeldosis und nur 10–20 Stunden bei Dauergabe aufgrund von Enzyminduktion (MERSMANN, 2003, S. 22).

Pharmaka in der Umwelt

Diverse Arzneimittelwirkstoffe konnten in der Umwelt bereits nachgewiesen werden. In Oberflächengewässern konnten SACHER und TERNES ET AL. Arzneimittel feststellen. Die Tabelle 9 soll einen Überblick über die gefundenen Konzentrationen geben.

Tabelle 9: Maximale Konzentrationen von Pharmaka in Oberflächengewässern, [ng/L].

Substanzen [ng/L]	Neckar	Rhein	Elbe	Elbe
Carbamazepin	290	180	170	1.1
Diclofenac	200	150	420	1.20
Bezafibrat	190	67	75	3,1
Gemfibrozil	36	45	220	0.51
Referenz	SACHER (2002)	SACHER (2002)	SACHER ET AL. (1998)	TERNES (1998a)

In einer Studie von TERNES ET AL. 1998a konnten diese auch verschiedene Pharmaka in deutschen Kläranlagenausläufen nachweisen.

Bezafibrat wurde beispielsweise mit einer Konzentration von 4.6 ng/L, Gemfibrozil mit 1.5 ng/L, Diclofenac mit 2.1 ng/L und Carbamazepin mit 3.7 ng/L gefunden. Selbst im Grundwasser konnte SACHER (2002) Carbamazepin mit einer Konzentration von 900 ng/L und Diclofenac mit einer Konzentration von 590ng/L nachweisen.

Untersuchte Gallen von Aalen (TERNES ET AL. 2004, S. 70–72) in Flüssen Süddeutschlands dagegen wiesen keinerlei Pharmaka auf.

Übersicht der untersuchten Substanzen

Die wichtigsten Daten der untersuchten Substanzen werden hier in Form einer Tabelle (Tab. 10) zusammengefasst. Die Strukturformeln werden in der darauffolgenden Abbildung 5 aufgezeigt.

Tabelle 10: Übersicht über die untersuchten Substanzen.

Substanz	Zugehörigkeit	Summenformel	CAS-Nr.
17β-Estradiol	Natürliches Estrogen, Steroidhormon	$C_{18}H_{24}O_2$	50-28-2
Estron	Natürliches Estrogen, Steroidhormon	$C_{18}H_{22}O_2$	53-16-7
Estriol	Natürliches Estrogen, Steroidhormon	$C_{18}H_{24}O_3$	50-27-1
Genistein	Natürliches Estrogen, Phytoestrogen	$C_{15}H_{10}O_5$	446-72-0
Daidzein	Natürliches Estrogen, Phytoestrogen	$C_{15}H_{10}O_4$	446-72-0
17α-Ethinylestradiol	Synthetisches Estrogen	$C_{20}H_{24}O_2$	57-63-6
Bisphenol A	Industriechemikalien	$C_{15}H_{16}O_2$	80-05-7
Nonylphenol	Industriechemikalien, Alkylphenole	$C_{15}H_{24}O$	25154-52-3
4tert-Octylphenol	Industriechemikalien, Alkylphenole	$C_{14}H_{22}O$	27193-28-8
Gemfibrozil	Pharmaka, Lipidsenker	$C_{15}H_{22}O_3$	25812-30-0
Bezafibrat	Pharmaka, Lipidsenker	$C_{19}H_{20}ClNO_4$	41859-67-0
Diclofenac	Pharmaka, Antirheumatika	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	15307-86-5
Carbamazepin	Pharmaka, Antiepileptika	$C_{15}H_{12}N_2O$	298-46-4

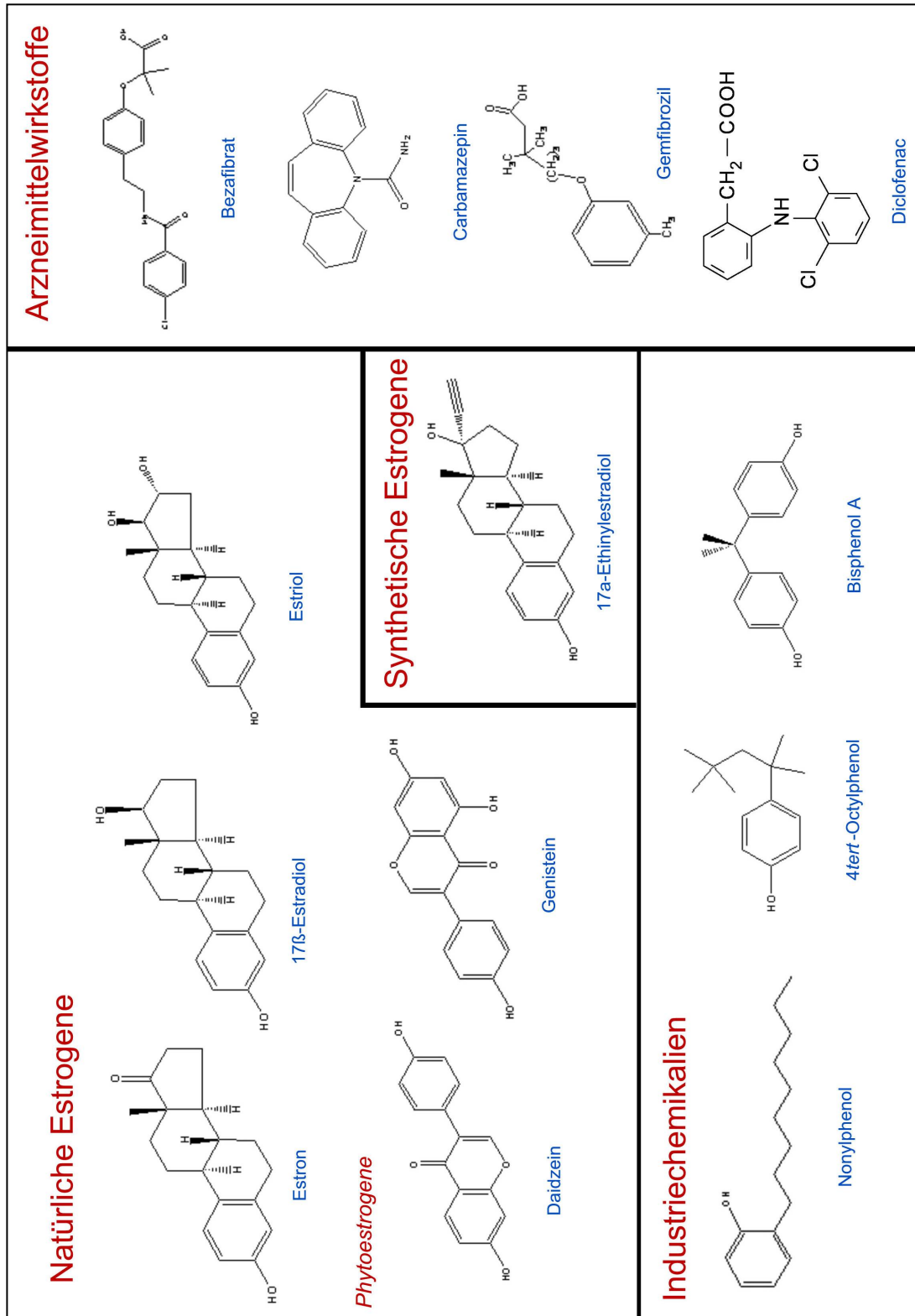


Abbildung 5: Strukturformeln der untersuchten Substanzen.

2.4.2 Analytische Bestimmung der Substanzen.

Dieser Abschnitt soll einen Überblick über die analytische Bestimmung der Estrogene und estrogen wirkenden Stoffe geben. Dabei wird auf die Deglucuronidierung, die Extraktion und auf die chromatographischen Möglichkeiten der Bestimmung aus Biomatrices und Wasser eingegangen. Aufgrund der Methodenoptimierung für die estrogen wirkenden Substanzen und nicht für die Pharmaka, wird der Schwerpunkt in diesem Kapitel auf Analysemethoden zum Nachweis estrogen wirksamer Substanzen gelegt. Eine gute Übersicht über die Analytik von Estrogenen und estrogen wirkenden Stoffen geben LOPEZ DE ALDA ET AL. (2001b) und SNYDER ET AL. (1999).

Deglucuronidation

Für die Messung von Substanzen aus der Gallenflüssigkeit muss zunächst eine Umwandlung der Substanzen durchgeführt werden. Die gesuchten Substanzen liegen in der Gallenflüssigkeit also in metabolisierter Form vor. Diese Metabolisierung muss insbesondere für Extraktionen mit unpolarem Lösungsmittel zunächst rückgängig gemacht werden. Dafür werden in der Regel Enzyme wie β -Glucuronidase und Arylsulfatase aus der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*) oder *Escherichia coli* verwendet (LEGELER ET AL. 2002; TERNES ET AL. 2004, S.31; UPMEIER 2001, S. 50; THIBAUT ET AL. 1999; SNYDER ET AL., 2000; INOUE ET AL. 2003).

Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft die Deglucuronidation von 17β -Estradiol.

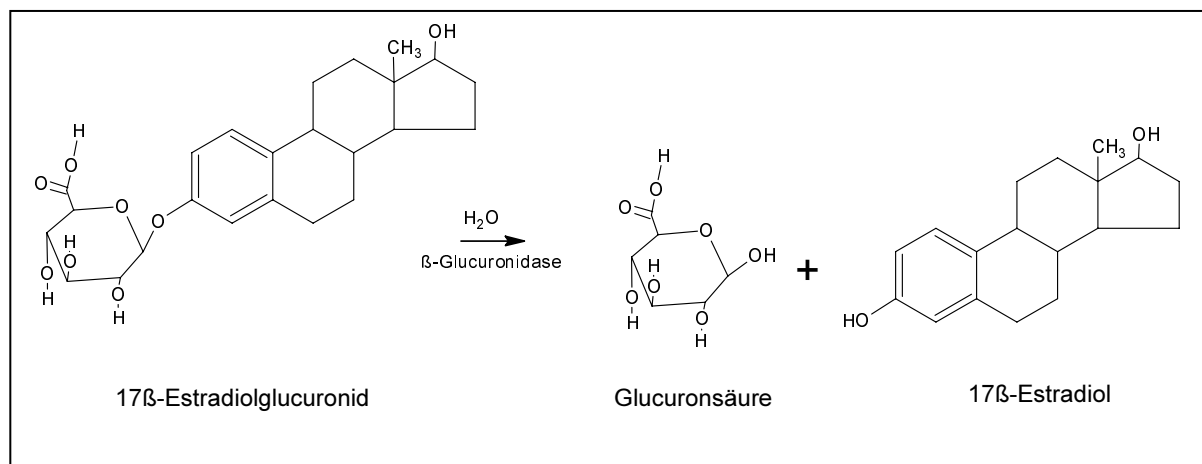


Abbildung 6: Deglucuronidation von 17β -Estradiol.

Da zur optimalen Aktivität dieser Enzyme ein bestimmter pH-Wert und eine Optimum-Temperatur erforderlich ist, wird mit einem Acetatpuffer, meist Natriumacetat, mit einem pH-Wert von 5–5.5 und einer Inkubationstemperatur von 37 °C gearbeitet (LARSSON ET AL. 1999; TERNES ET AL. 2004, S.31; LEGLER ET AL. 2002; UPMEIER 2001, S. 46ff; ADLER ET AL. 2001).

PEDERSEN ET AL. (2002) und GREEN ET AL. (2003) dagegen verwenden einen Phosphat- bzw. Kaliumpuffer mit einem pH-Wert von 6.8 bzw. 6.5. Die Inkubationsdauer der Deglucuronidierung schwankt dabei zwischen 12 und 18 Stunden (TERNES ET AL. 2004, S.31; LEGLER ET AL. 2002; FERREIRA-LEACH ET AL. 2001).

Die Extraktion

Die Verwendung des Extraktionsmittels für Estrogene und estrogen wirkende Stoffe aus Gallenflüssigkeit ist häufig abhängig von der weiteren Aufarbeitung und dem verwendeten Messgerät. So wurden für die Messung mittels GC-MS mit Methyl-*tert*-butylether bzw. Methyl-*tert*-butylether/Hexan extrahiert. Die Extraktion mit Ethylacetat erfolgte bei anschließender Messung mittels HPLC (LARSSON ET AL. 1999; UPMEIER 2001, S. 50; TERNES ET AL. 2004, S.31). LAMOREE ET AL. (2004) allerdings verwendeten Dichlormethan zur Extraktion von Bisphenol A aus Fischgalle um den Extrakt anschließend mittels ER-CALUX und GC-ITD zu vermessen.

Das Clean-up

Zur Aufreinigung von Gallenproben für die Untersuchung von Estrogenen verwenden TERNES ET AL (2004, S. 31) nach der Extraktion mit Methyl-*tert*-butylether ein Clean-up mit ausgeheiztem Kieselgel. Konditioniert wurde die Kieselgelsäule mit dem späteren Elutions- und Laufmittel Hexan/Aceton im Verhältnis 65:35. Nach dem Einengen des Eluats und einer Derivatisierung erfolgte die Messung der Probe mittels GC-MS.

Die Messung

Bestimmung von organischen Spurenstoffen, zu denen auch die Estrogene und die estrogen wirkenden Substanzen gehören, erfordert im Allgemeinen eine hochempfindliche Analytik, da die Konzentrationen zumeist im ng und µg-Bereich liegen. Hierfür wird heutzutage vor allem die GC bzw. HPLC gekoppelt mit der MS bzw. Tandem-MS eingesetzt (SPENGLER ET AL. 2002). Für eine gaschromatographische Messung ist eine Derivatisierung der Analyte notwendig, die bei der Messung mit der flüssigkeitschromatographischen Methode entfällt.

Untersuchungen von JEANNOT ET AL. (2002) ergaben, dass GC-MS, GC-MS/MS und LC-ESI-MS sowohl im negativen als auch im positiven Messmodus für die Analyse von Estrogenen und estrogen wirkenden Stoffen in Oberflächen-, Abwasser und Schlamm geeignet sind. Dabei wurden Nonylphenol und Octylphenol mittels LC-ESI-MS und Bisphenol A, 17β-Estradiol, Estriol, Estron und 17α-Ethinylestradiol mittels GC-MS und GC-MS/MS analysiert (JEANNOT ET AL. 2002).

Natürliche und synthetische Estrogene sowie Industriechemikalien wurden von verschiedenen Autoren mit Hilfe eines GC-MS oder GC-MS/MS-Systems nach-

gewiesen (SPENGLER ET AL. 2002; TERNES ET AL. 2004, S.31; LARSSON ET AL. 1999; TERNES ET AL. 1999a). Doch liegen auch Untersuchungen estrogener Substanzen mittels HPLC-MS,- MS/MS bzw. HPLC-DAD (Dioden-Array-Detektor) vor (LOPEZ DE ALDA ET AL. 2001a+ 2000; ADLER ET AL. 2001; TERNES ET AL. 2004, S.36; BELFROID 1999; PEDERSEN ET AL. 1999). Auf zwei dieser Messmethoden soll im Folgenden näher eingegangen werden.

ADLER ET AL. (2001) verwendeten ein HPLC-MS-System um natürliche und synthetische Estrogene aus Wasser nachzuweisen. Als Laufmittel wurde ein Methanol-Wasser-Gemisch gewählt, welches im Gradientenprogramm ausgehend von 40 % Methanol und 60 % Wasser mit einem Fluss von 0.25 ml/min eingesetzt wurde (ADLER ET AL. 2001). Die Identifikation der Peaks durch das MS erfolgte dann durch einen Vergleich der Retentionszeit von Probe und einem Standard. Zur Absicherung wurden neben den charakteristischen Hauptmetaboliten auch Neben-metabolite herangezogen.

Für den Nachweis von Phytoestrogenen aus Fischgalle verwenden TERNES ET AL. (2004, S. 36) ein HPLC-ESI-MS/MS-System. Zum Laufmittel, bestehend aus Wasser/Acetonitril (68,5:31,5 v/v), wurde als Ionisierungshilfe noch Ammoniumacetat (10 mmol/L) zugefügt.

Die nachfolgenden Tabellen 11 und 12 sollen den Stand der Wissenschaft bezüglich der Analytik von natürlichen und synthetischen Estrogenen, sowie einigen estrogen wirkenden Umweltchemikalien zusammenfassend darstellen.

Tabelle 11: Übersicht der analytischen Methoden zur Bestimmung von Estrogenen und estrogen wirkenden Substanzen.

Detektion	Demeatbo- lisierung	Extraktion	Matrix	Analyte	Referenz
GC-MS	ja	LLE mit Methyl- <i>tert</i> -butylether, Ethylacetat	Galle, Vollblut, Gewebe (Ratte)	Nonyl- und Octylphenol, Daidzein	UPMEIER (2001)
Estrogene: GC-Ion-trap-MS/MS Phytoestrogene: LC-Electospray-MS/MS	ja	LLE mit Methyl- <i>tert</i> -butylether	Galle (Fisch)	17 β -Estradiol, Estron, 17 α -Ethinylestradiol, Genistein, Daidzein	TERNES ET AL. (2004)
GC-MS	ja	Festphase, Elution mit Ethylacetat	Plasma (Fisch)	17 β -Estradiol, Estron, 17 α -Ethinylestradiol, Nonylphenol, Bisphenol A	LARSSON ET AL. (1999)
ER-CALUX	ja	LLE mit Ethylacetat	Galle, Urin (Fisch)	Estrogenkonjugate	LEGLER ET AL. (2002)
APCI-LC-MS/MS	nein	C ₁₈ -Kartusche	Serum (Rind)	17 β -Estradiol, 17 α -Ethinylestradiol	DRAISCI ET AL. (1998)
Radio-HPLC, GC-MS	ja	Messung von Aliquot	Urin (Fisch)	Nonylphenol-Metabolite	THIBAUT ET AL. (1999)
HPLC-DAD, NMR	ja	C ₁₈ -Kartusche	Urin (Ratte)	Bisphenol A, Metabolite	SNYDER ET AL. (2000)
LC-ESI-MS, Column-switching LC-MS	ja	Festphase	Urin (Mensch)	Nonyl- und Octylphenol	INOUE ET AL. (2003)
Radio-HPLC, GC-EI-MS	ja	Ethylacetat	Gewebe (Fisch)	4 <i>tert</i> -Octylphenol	FERREIRA-LEACH ET AL. (2001)
RP-HPLC, GC-MS	ja	Oasis-Festphase	Galle, Gewebe (Fisch)	4 <i>tert</i> -Octylphenol	PEDERSEN ET AL. (2002)
HPLC-UV-Detektor	ja	Acetonitril	Gewebe (Ratte)	Bisphenol A-Gucuronide	SAKAOTO ET AL. (2002)
ELISA, GC-MS/MS	ja	C ₁₈ -Kartusche	Oberflächen- und Abwasser	17 β -Estradiol, 17 α -Ethinylestradiol	HUANG ET AL. (2001)

Tabelle 12: Übersicht der analytischen Methoden zur Bestimmung von Estrogenen und estrogen wirkenden Substanzen (Fortsetzung).

Detektion	Demetabolisierung	Extraktion	Matrix	Analyte	Referenz
GC-MS	ja	Mikrowellenextraktion/C ₁₈ /Oasis Kartusche	Gonaden, Galle, Plasma (Fisch)	17 α - Ethinyloestradiol, Bisphenol A, Nonylphenol	LABADIE ET AL. (2004)
GC-MS	ja	Hexan/Methyl-tert-butylether	Galle (Fisch)	Estradiol, Estron, Nonyl- und Octylphenol Bisphenol A	PETTERSSON ET AL. (2004)
ER-CALUX GC-ITD	ja	LLE mit Dichlormethan	Galle (Fisch)	Bisphenol A	LAMOREE ET AL. (2004)
GC-MS/MS	nein	RP-C ₁₈	Wasser	Estradiol, Estron, 17 α - Ethinyloestradiol	TERNES ET AL. (1999b)
HPCL, GC-MS/MS	ja	Varian disk extraction	Oberflächen- und Abwasser	17 α -Estradiol, 17 β -Estradiol, Estron, 17 α -Ethinyloestradiol	BELFROID ET AL. (1999)
GC-MS	nein	RP- C ₁₈ -Kartusche	Abwasser	17 β -Estradiol, Estron, 17 α - Ethinyloestradiol, Bisphenol A, 4-Nonylphenol	SPENGLER ET AL. (2002)
HPLC-MS	ja	C ₁₈ -Festphase und LLE mit Dichlormethan	Wasser	17 β -Estradiol, Estron, 17 α - Ethinyloestradiol, Estriol	ADLER ET AL. (2001)
SPE-LC-DAD UV	nein	Online-Extraktion mit C ₁₈ -Festphase	Wasser	17 β -Estradiol, Estron, 17 α - Ethinyloestradiol, Estriol	LOPEZ DE ALDA ET AL. (2001a)

Bestimmung von Pharmaka

Die Bestimmung von Pharmaka in Umweltproben erfolgten ebenfalls in der Regel entweder mittels GC-MS bzw. GC-MS/MS oder LC-MS/MS.

TERNES ET AL. (2001c) untersuchten einige Pharmaka aus Wasser sowohl mit der einen als auch mit der anderen Methode und kamen zu dem Schluss, dass die Bestimmungsgrenzen bei einer Messung mittels LC-MS/MS niedriger waren. Beispiele für die Untersuchung von Pharmaka mit einer flüssigkeitschromatographischen Methode sind die Studien von SACHER (2002) und TERNES ET AL. (1998a). Die Autoren verwendeten für Wasserproben ein HPLC-ESI-MS/MS-System.

Eine gute Übersicht über die Methoden zur Bestimmung von Pharmaka gibt TERNES (2001b). Eine detaillierte Beschreibung der Messung von Pharmaka mittels LC-MS ist ebenfalls bei NIESSEN (1998) zu finden.

Die nachfolgende Tabelle 13 soll den Stand der Wissenschaft bezüglich der Analytik von ausgewählten Pharmaka zusammenfassend darstellen.

Tabelle 13: Übersicht der analytischen Methoden zur Bestimmung von Pharmaka.

Referenz	Analyten	Matrix	Detektion
SACHER (2002)	Carbamazepin, Bezafibrat, Diclofenac, Gemfibrozil	Oberflächen- und Grundwasser	GC-MS
TERNES (1998a)	Carbamazepin, Bezafibrat, Diclofenac, Gemfibrozil	Kläranlagenablauf, Oberflächenwasser	GC-MS, LC-ESI- MS/MS
TERNES ET AL. (2004)	Carbamazepin	Galle (Fisch)	LC-MS/MS
SACHER ET AL. (2001)	Carbamazepin, Bezafibrat, Diclofenac, Gemfibrozil	Kläranlagenablauf, Oberflächenwasser	GC-MS
TERNES (2001b)	Carbamazepin, Bezafibrat, Diclofenac, Gemfibrozil	Kläranlagenablauf	GC-MS, GC- MS/MS, LC-ESI- MS/MS

2.5 Gegenstand der Untersuchung: Die Aalmutter

Die Aalmutter (*Zoarces viviparus*) ist auch unter den Namen Aalquappe, Aalputen (Fehmarn), Jelmodder (Föhr) oder Tug (Helgoland) bekannt. Im angelsächsischen Raum wird sie „eelpout“ oder „greenbone“ genannt.

Charakteristisch für die Aalmutter ist ihr aalartigen Körper mit auffallend dickem Kopf und einem aus Rücken-, Schwanz- und Afterflosse zusammengewachsenen Flossensaum. Die Aalmutter erreicht eine Körperlänge von 60 cm und ist ein gründelnder Fisch, dessen Nahrung hauptsächlich aus wirbellosen Bodentieren wie Würmer, Muscheln und Schnecken besteht. Der ortstreue Fisch bevorzugt Gebiete, die seinem Bedürfnis nach Deckung entsprechen. An der Ostseeküste sind dies vor allem die Seegrasregionen und Tangfelder. Nach der Paarung im August bis September, mit innerer Befruchtung, entwickeln sich innerhalb von 5 Monaten dotterarme Eier in den lebendgebärenden Weibchen. Pro Weibchen können 30 bis 400 aalförmige Jungtiere zur Welt gebracht werden. Bei der Geburt sind die Jungen 3.5 bis 5.5 cm groß, und ernähren sich sofort von Kleinkrebsen, Würmern und Schnecken und Jungfischen. Die folgende Abbildung 7 zeigt die Aalmutter in ihrem natürlichen Lebensraum.

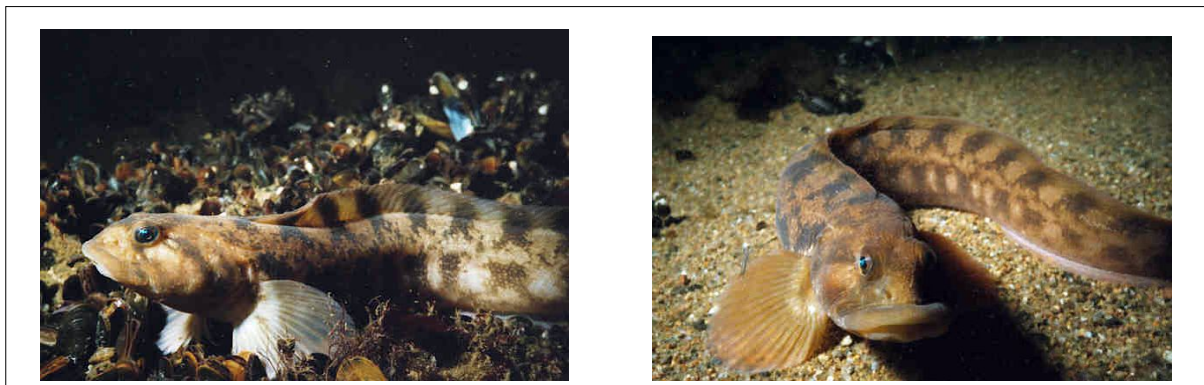


Abbildung 7: Die Aalmutter (*Zoarces viviparus*), Fotos von Lutz Drößler.

Die Aalmutter ist durch ihre standorttreue und lebendgebärende Reproduktion und damit auch der Möglichkeit von Studien des Larvenwachstums und deren Mortalität für Untersuchungen von hormonellbedingten Veränderungen sehr geeignet. (GERCKEN ET AL. 2002; RASMUSSEN ET AL 2002). Ihre Jungtiere sind bereits voll entwickelt und geschlechtsspezifiziert was für die Bestimmung des Verhältnisses der männlichen und weiblichen Jungen und eventuelle Verschiebungen dieses Verhältnisses durch endokrine Disruptoren dienlich ist. Im Gegensatz zu eierlegenden Fischen erreichen die Schadstoffe die Jungtiere während ihrer Lavalentwicklung nur durch das Muttertier. Diese lebendgebärende Fische sind ebenfalls für Studien der

Wirkung von endokrinen Disruptoren auf die Mutter-Embryo-Ernährungsbeziehung und die direkten Auswirkungen auf die Embryos geeignet (RASMUSSEN ET AL 2002). Ein Lebensraum der Aalmutter, die Ostsee, ist aufgrund der starken physikalischen und chemischen Fluktuationen und den variablen klimatischen und ozeanographischen Bedingungen durch wenige Arten aber einer hohen Individuenanzahl gekennzeichnet. Diese sind durch oft recht einfache Nahrungsnetze miteinander verbunden. Die Ostsee ist dabei als Lebensraum für marine Organismen nicht salzhaltig genug, für limnische Tiere und Pflanzen wiederum zu salzhaltig, was die Artenanzahl erheblich einschränkt. Die Organismen leben teilweise an der Grenze ihrer physiologischen Toleranz. Kommen nun zu diesen natürlichen Stressfaktoren noch anthropogene Belastungen beispielsweise durch Eutrophierung oder Schadstoffeintrag, kann es zu einer Bedrohung der Arterhaltung führen, da der wichtigste Faktor der Arterhaltung die Möglichkeit der Fortpflanzung im Lebensraum darstellt. Die Ostsee ist daher ein empfindliches Ökosystem und äußere Einflüsse haben oft gravierende Auswirkungen. (BENGTSSON ET AL. 1996, S. 217)

2.6 Die Geräte

Das vorliegende Kapitel befasst sich mit den verwendeten Messgeräten im Allgemeinen. Eine genaue Angabe der Geräte erfolgt in Kapitel 3.1.3.

An dieser Stelle werden insbesondere das Flüssigkeitschromatographiesystem, das Tandem-Massenspektrometer sowie die Kopplung beider Geräte behandelt.

2.6.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Flüssig-Flüssig-Chromatographie, zu der auch die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zählt, bedient sich dem Prinzip der Verteilung zwischen zwei Phasen. Die Retention des zu untersuchenden Stoffs beruht auf dessen unterschiedlicher Löslichkeit in der mobilen und stationären Phase.

In der Verteilungschromatographie unterscheidet man wiederum zwei Arten: Die Normalphasen- und die Umkehrphasenchromatographie, auch Reversed-Phase (RP) genannt. Diese beiden Verfahren unterscheiden sich in der Polarität der beiden Phasen. Bei der Umkehrphasenchromatographie, welche in dieser Arbeit verwendet wurde, wird mit einer Säule gearbeitet, die eine unpolare, stationäre Phase besitzt, während die mobile Phase eine polare Flüssigkeit ist. Diese Chromatographie macht ca. 75 % der HPLC-Anwendungen aus.

In dieser Arbeit wurde mit einer Säule mit chemisch gebundener Phase, mit der eine Gradientenelution möglich ist. Das Trägermaterial einer solchen Säule besteht aus unelastischem silanisierendem Kieselgel. Da die Silanisierung des Kieselgels nur zu

50 % stattfindet und die übrigen Restsilanolgruppen stark polar sind, können sie zur Adsorption von polaren Verbindungen führen. Aus diesem Grund ist eine Nachreaktion mit Trimethylchlorsilan, dem so genannten Endcapping, nötig. Zusätzlich werden Vorsäulen zum Schutz der Säule verwendet. Vorsäulen bestehen aus nichtporösem Glas- oder Polymerkugeln mit einem Durchmesser von ca. 30 µm als Trägermaterial. Deren Oberfläche wird mit Schichten aus porösem Kieselgel oder Aluminiumoxid überzogen.

Bei der Wahl der mobilen Phase ist zu beachten, dass sich die Retentionszeit der Stoffe in der mobilen Phase verkürzt, wenn die Polarität der Substanzen der Polarität der stationären Phase zu ähnlich ist. Umgekehrt verlängert sich die Retentionszeit bei zu unterschiedlichen Polaritäten der beiden Phasen.

Generell wird zwischen einer isokratischen Elution und einer Gradientenelution unterschieden. Während bei einer isokratischen Elution mit einer gleichbleibenden, konstanten Zusammensetzung der mobilen Phase eluiert wird, erfolgt bei der Gradientenelution mit Hilfe eines Lösungsmittel-Mischprogramms eine Veränderung der Eluentenzusammensetzung während der Trennung. Dafür werden Lösungsmittel mit unterschiedlicher Polarität verwendet. Durch die Verwendung einer Gradientenelution kann die Trennung der Analyte und die Analysezeit einer flüssigkeitschromatographischen Trennung optimiert werden. Entsprechend der Gradientenelution wird für die Optimierung bei einer gaschromatographischen Trennung ein Temperaturprogramm verwendet.

Das HPLC-Gerät besteht aus vier Hauptteilen: Pumpe, Einspritzsystem, Trennsäule und Detektor. Die Verwendung von Trennmaterialien mit einem Teilchendurchmesser von 3–10 µm in relativ dünnen Säulen von 2–4 mm Innendurchmesser erfordert bei der Förderung der mobilen Phase die Überwindung eines relativ hohen Gegendrucks. Alle Teile müssen möglichst totvolumenfrei bzw. -arm miteinander verbunden werden und druckstabil sein. Hochdruckpumpen müssen eine konstante und pulsationsfreie Strömung der mobilen Phase gewährleisten. Die Probenaufgabe erfolgt durch ein 6-Wege-Ventil (Probeschleife), in das zunächst die Probe gegeben wird, die wiederum anschließend durch Umschalten des Ventils mit Hilfe des Elutionsmittelstroms drucklos in die Säule überführt wird.

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie findet ihre Anwendung bei der Analytik komplexer Gemische sowohl von wenig polaren Substanzen als auch von anorganischen und organischen Ionen. Sie hat in vielen Fällen vor allem dort die GC-Verfahren verdrängt, wo aufwendige Derivatisierungen erforderlich sind, um Stoffe in unzersetzbare, flüchtige Formen zu bringen. Die HPLC-Methode zählt somit zu den „schonenden“ Verfahren, bei dem es lediglich erforderlich ist, dass sich die Substanzen in der mobilen Phase lösen.

2.6.2 Interface und Ionisierungshilfsmittel

Bei der Verwendung einer HPLC in Verbindung mit einem massenspektrometrischen Detektor ist, anders als bei der GC, für die Überführung der Analyte in den gasförmigen Zustand ein sogenanntes Interface notwendig. Bei der GC befinden sich die Analyte bereits im gasförmigen Zustand wenn sie den Detektor erreichen.

Als Interface wurde das Elektrospray-Ionisierungs-System (ESI) „Turbo Ion Spray“ ausgewählt. Es zeichnet sich durch die Ionisierung in der flüssigen Phase unter atmosphärischem Druck aus. Die ESI-Technik wird in der Regel für die Bestimmung mäßig bis stark polarer, ionischer und makromolekularer Analyten verwendet.

Die Flüssigkeit aus der HPLC-Säule strömt durch eine Stahlkapillare. Unterstützt durch einen Stickstoffstrom (Nebulizer Gas), der an der Kapillare entlang führt, wird nun die Flüssigkeit versprüht. Zwischen dieser Kapillare und einer Gegenelektrode wird eine Potentialdifferenz von ca. 3 kV angelegt. Die Ionisation der Flüssigkeit erfolgt durch einen Ladungsaustausch. Voraussetzung ist aber, dass sich Ionen in der Flüssigkeit befinden. Diese werden durch die Zugabe von Salz, meist Ammoniumacetat unter der Bildung von NH_4^+ -Addukten, erzeugt. Die entstandenen Ionen werden durch ein Spannungsgefälle in Richtung Massenspektrometer beschleunigt. Während sich die Flüssigkeit in Form feinsten Tröpfchen durch das Interface bewegt, wird mit Hilfe eines beheizten Stickstoffstroms (Turbogas), der senkrecht auf die Probetröpfchen trifft, die Flüssigkeit verdampft. Dadurch kommt es durch die Verkleinerung der Tröpfchen zu einer höheren Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche bis es schließlich zur so genannten Coulomb-Explosion kommt, bei der Ionen emittiert werden. Es entstehen freie Analytionen, die dann in das Massenspektrometer gelangen (OTTO 2000, S. 511f.). Die Vorgänge in der ESI-Quelle sind in der folgenden Abbildung 8 veranschaulicht.

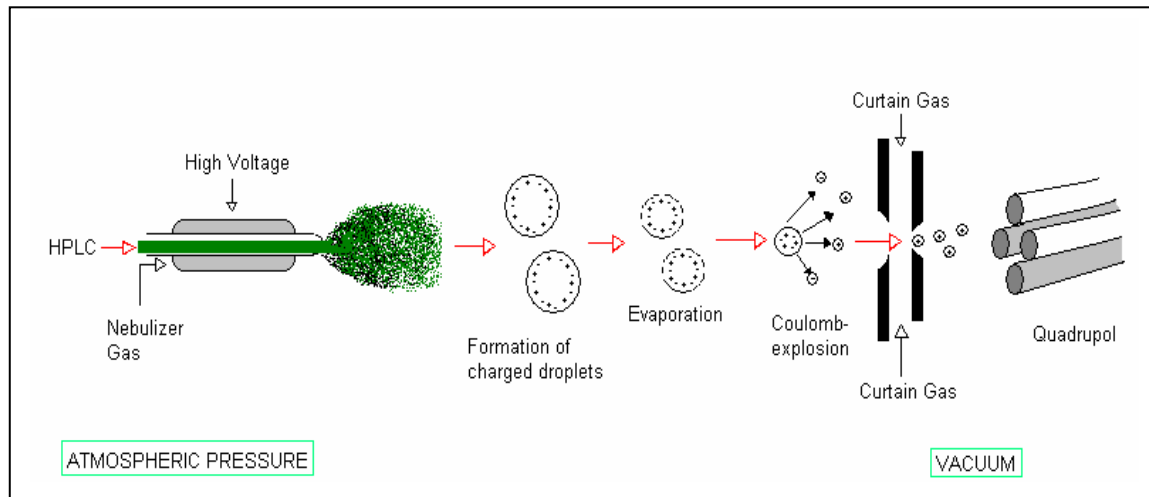


Abbildung 8: Aufbau einer ESI-Quelle nach Applied Biosystems (2002), verändert.

Der Nachteil der ESI-Technik ist die geringe Flussrate (5–500 $\mu\text{L}/\text{min}$). Auch können zu hohe Salzkonzentrationen in der mobilen Phase die Ionisierung der Analyte hemmen oder die Signalintensität destabilisieren (DiCORCIA 1998).

Eine Voraussetzung für die gewollte Ionisierung im Interface ist die Zugabe von Ionisierungsmitteln. Als Ionisierung bezeichnet man die Bildung von Ionen unter Abtrennung oder Anlagerung eines oder mehrerer Ionen an ein zuvor neutrales Atom bzw. Molekül. Dabei wird bei der positiven Ionisierung ein Kation an den Analyten angelagert, während bei der negativen Ionisierung vom Analyten in der Regel ein H^+ -Ion abgespalten wird.

Durch die Zugabe von Ionisierungsmitteln kann die Bildung bestimmter Molekülionen unterstützt werden. Ansonsten würden nämlich verschiedene Molekülionen unterschiedlicher Häufigkeit entstehen. So tauchen meist Natrium-Addukte auf, denn Natrium ist ubiquitär, also auch in vielen Lösungsmitteln, zu finden. Laut Houde et al. (2002) ist aber der Nachteil dieser Natrium-Addukte ihre Stabilität, so dass es zu Als Ionisierungsmittel werden schwache Säuren (zum Beispiel Essigsäure), Ammoniumacetat aber auch Kalium- und Natriumsalze verwendet. Dabei ist das Ammoniumacetat als Ionisierungsmittel am gebräuchlichsten (REEMTSMA ET AL. 2001).

2.6.3 Massenspektrometrie

Massenspektrometrie ist ein physikalisches Verfahren, das Ionen nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung trennt. Dafür werden die zuvor ionisierten Moleküle in einem gasförmigen Strahl in ein Hochvakuum überführt und dort fragmentiert. Im Massenspektrum wird dann die Intensität als Maß für die Häufigkeit eines bestimmten Ions in Abhängigkeit vom Masse-Ladungs (m/z)-Verhältnis ausgewertet.

Um eine Kollision der Ionen und Moleküle weitestgehend zu vermeiden, wird im Massenspektrometer mit Drücken von 10^{-3} bis 10^{-8} Pa gearbeitet.

Die oben erklärte Ionenquelle ist für die Erzeugung von Ionen aus neutralen Probemolekülen nötig. Am Ausgang der Ionenquelle erhält man überwiegend positiv geladene Ionen, die anschließend beschleunigt werden.

Das Trennsystem, in dem die Ionen nach dem Masse-Ladungs-Verhältnis aufgetrennt und gegebenenfalls fragmentiert werden, wird auch als Massenanalysator bezeichnet. Die Trennleistung eines Quadrupolmassenspektrometers, das für diese Arbeit verwendet wurde, beruht auf der Verwendung eines hochfrequenten Quadrupolfeldes, einer Einheit aus vier Metallstäben mit unterschiedlichen Ladungen, durch die die ankommenden Ionen fokussiert und auf oszillierende Kreisbahnen gezwungen werden. Die zylinderförmigen Stäbe sind dabei parallel angeordnet und bilden eine Art Quader, daher auch der Name „Quadrupol“. Auf den jeweils gegenüberliegenden Stäben liegt ein positives bzw. negatives Gleichstrompotential an. Durch die Kombination der beiden Stäbepaare können nur Ionen in einem schmalen Bereich vom Masse-Ladungs-Verhältnis den Quadrupol passieren. Durch die Variation der Gleich- und Wechselstromspannung wird der gewünschte Massenbereich abgetastet. Alle Ionen mit einem anderen Masse-Ladungs-Verhältnis prallen an einen der Pole, werden dort entladen und somit dem Ionenpfad entzogen.

Man unterscheidet zwischen einem Single-Quadrupol- und einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer, auch Tandem-Massenspektrometer genannt. Letzteres besteht aus zwei hintereinander geschalteten Massenspektrometern, weshalb man auch die Abkürzung MS/MS benutzt. Solch ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer besteht demnach aus vier Quadrupolen, wobei das erste Q0 keine Nummerierung erhält, weil es nur einer Fokussierung der Ionen dient. In den Quadrupolen Q1 und Q3, die als Massenfilter fungieren, werden die elektrisch geladenen Molekülionen gemäß ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis aus dem Ionenstrom herausgefiltert. Im Quadrupol Q2, auch Kollisionszelle genannt, findet mit Hilfe einer Kollisionsenergie (collision energy, CE) durch den Zusammenstoß der Ionen mit einem dort befindlichem Gas (CAD-Gas, meist N_2) die Fragmentierung der sogenannten Mutterionen statt. Die entstandenen Tochterionen werden in einem zweiten Massenfilter Q3 wie oben beschrieben entsprechend der Einstellungen des Gerätes gefiltert bevor sie zum Detektor gelangen. Die genaue Anordnung der vier Quadrupole ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

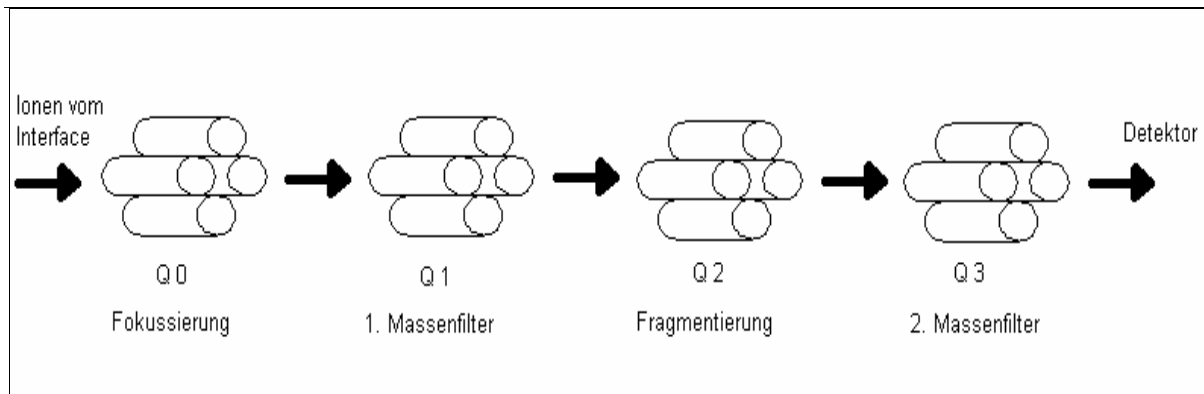


Abbildung 9: Anordnung der Quadrupole in einem Tandem-MS.

Der Einsatz der vier Quadrupole ist abhängig vom gewünschten Messmodus. Bei einem Tandem-MS unterscheidet man nach SCHREIBER (2001, S. 28f) u.a. folgende Messmodi:

- Multiple Reaction Monitoring (MRM): Für Q1 und Q3 werden feste Massen eingestellt. Nur wenn das Mutterion (Precursor) und das Tochterion (Produktion) gebildet werden, findet eine Detektion statt. Dies ist der empfindlichste und selektivste Modus eines Tandem-MS.
- Produktionen-Scan: Hierbei wird ein bestimmtes Mutterion in Q1 herausgefiltert, anschließend in Q2 fragmentiert und schließlich die gesamten Tochterionen in Q3 detektiert.
- Precursorionen-Scan: Hier wird ein bestimmtes Tochterion im Massenfilter Q3, das im Q2 bei einer Fragmentierung entsteht, zurückverfolgt. Dieser Modus dient besonders der Identifizierung von Molekülen in der Metabolismusforschung.

Die nachfolgende Abbildung soll die hier beschriebenen unterschiedlichen Messmodi eines Tandem MS veranschaulichen.

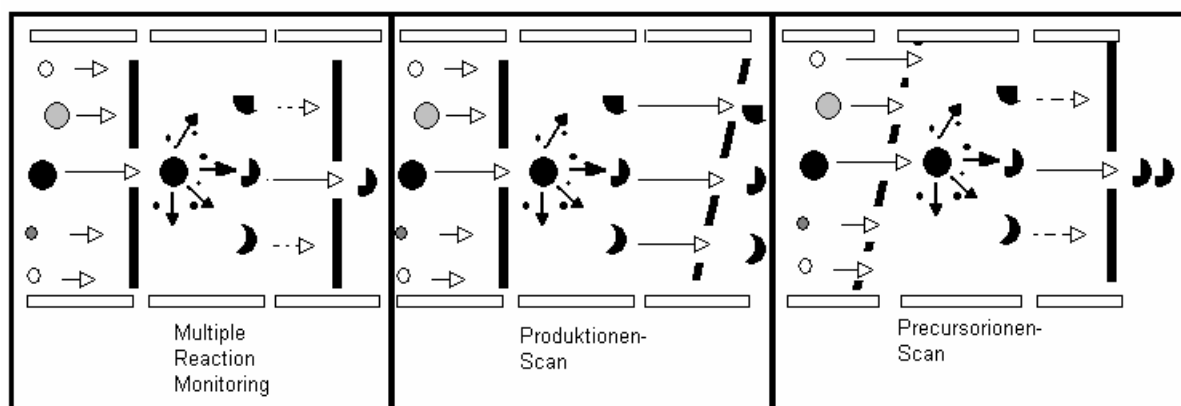


Abbildung 10: Schematische Darstellung der MS/MS- Detektionsmöglichkeiten, nach Schreiber (2001, S. 28), verändert.

Als Detektor eines Quadrupolmassenspektrometers wird meist ein Sekundärelektronen-Vervielfacher (SEV) oder ein Faraday-Detektor verwendet.

Ein SEV arbeitet mit Dynoden, aus denen die aus dem Quadrupol kommenden Ionen Elektronen herausschlagen. Diese wiederum bewirken bei den nächsten kaskadisch angeordneten Dynoden den gleichen Effekt, was zu einer Signalverstärkung von bis zu 10^6 führt (FRAUNHOFER INSTITUT, 2004, S. 5). Beim Faraday-Detektor dagegen wird die Ladung der ankommenden Ionen über einen hochohmigen Widerstand abgeleitet. Der dadurch auftretende Spannungsabfall ist ein Maß für die Intensität der Ionen. Dieser Detektor liefert zwar gut reproduzierbare Werte, ist allerdings recht unempfindlich (OTTO 2000, S. 318).

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Material und Methoden

In den folgenden Kapiteln werden die verwendeten Materialien und Methoden beschrieben. Dabei werden verwendeten Chemikalien und Geräte aufgeführt. Anschließend werden die Messparameter sowohl für die HPLC als auch für das Tandem-MS sowie die Kalibrierung vorgestellt. Es folgt die Darstellung der Leistungsparameter der Methode. Anschließend werden die Durchführung und die Ergebnisse der Methodenentwicklung gezeigt. Der letzte Teil dieses Kapitels befasst sich schließlich mit der Charakterisierung ausgewählter Realproben und deren Ergebnisse.

3.1.1 Verwendete Chemikalien

In diesem Unterkapitel sind die Chemikalien aufgeführt, die sowohl für die Aufarbeitung der Proben als auch für deren Messung in allen Versuchen benutzt wurden. Zusätzlich sind Substanzen aufgeführt, die für die Überprüfung der Enzymaktivität Verwendung fanden. Eine detaillierte Liste der verwendeten Chemikalien ist im Anhang unter 8.1.1 zu finden.

Standardsubstanzen

Die im Rahmen dieser Diplomarbeit verwendeten Standardsubstanzen und ihre Reinheit sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Verwendete Substanzen und ihre Reinheit.

Substanz	Reinheit [%]	Hersteller
17β-Estradiol	99,8	Riedel-de Haën
Estron	99,6	Riedel-de Haën
Estriol	99,7	Riedel-de Haën
Genistein	100	Fluka
Daidzein	100	Fluka
17α-Ethinylestradiol	98,9	Riedel-de Haën
4$tert$- Octylphenol	99,0	Dr. Ehrenstorfer
Bisphenol A	95	Sigma-Aldrich
Nonylphenol	94	Riedel-de Haën
Gemfibrozil	99,9	Sigma-Aldrich
Bezafibrat	99	Universität Hamburg (Überlassen von Stefan Weigel)
Carbamazepin	98,6	Synopharm
Diclofenac-Natrium	99,89	Synopharm
10,11-Dihydrocarbamazepin	99	Sigma-Aldrich
17β-Estradiol D3	99,7	Supelco
Bisphenol A D16	98	Cambridge Isotope Laboratories

Die Abkürzung D (in der Tabelle) steht für die Deuterierung der Substanz. Hierbei handelt es sich um den Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium, einem Wasserstoffisotop mit dem Symbol D. Dieses auch als „schwerer“ Wasserstoff bezeichnete Deuterium hat im Kern zusätzlich ein Neutron und damit die Masse 2. Im Wasserstoff kommen natürlicherweise ca. 0,015 % Deuterium vor. (MORTIMER 1987, S. 348). Deuterierte Substanzen sind zur Verwendung als Interner Standard sehr gut geeignet. Da sie meist sehr ähnliche Eigenschaften wie die entsprechenden nicht deuterierten Substanzen aufweisen, aber durch ihre unterschiedlichen Massen trotzdem eindeutig bestimmt werden können.

Das Ansetzen der Standardlösungen (Dotierungslösungen) erfolgte gravimetrisch aus den vorhandenen Stammlösungen. Die Konzentrationen der Stammlösung in dem Lösungsmittel Methanol (MeOH) sind der folgenden Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: Konzentrationen der Stammlösungen (in MeOH).

Substanz	Konz [mg/mL]
17β-Estradiol	1.070
Estriol	1.014
Estron	1.033
Genistein	1.018
Daidzein	1.057
17α-Ethinylestradiol	1.072
4tert-Octylphenol	1.079
Bisphenol A	0.791
Nonylphenol (techn. Mix)	3.000
Gemfibrozil	1.233
Bezafibrat	1.079
Diclofenac	1.282
Carbamazepin	1.633
Dihydrocarbamazepin	1.097
Estradiol D3	1.064
Bisphenol A D16	1.067

Aus den Stammlösungen wurde zunächst eine Standardlösung mit ca. 20 ng/ μ L als Ausgangslösung für weitere Verdünnungen angesetzt. Da die Stammlösungen in Methanol vorlagen, die Dotierungsstandards aber aufgrund der empfindlichen Enzyme in Ethanol angesetzt werden mussten, wurde nach Einfüllen der einzelnen Stammlösungen erst möglichst viel des Methanols mit Stickstoff abgeblasen bevor eine entsprechende Menge an Ethanol zugegeben wurde. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte durch die einzelnen Einwaagen der Stammlösungsaliquote. Aus dieser Standardlösung wurden durch Verdünnung alle weiteren Dotierungsstandards angesetzt und lagen in Ethanol vor. Die Konzentrationen der Standardlösungen bzw. der Dotierungslösungen sind in Form einer Tabelle im Anhang unter 8.1.2 zu entnehmen.

Lösungsmittel

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Lösungsmittel verwendet. Für die Reinigung der Glasgeräte wurde Aceton (Picograde, Promochem) und Milli-Q-Wasser (Reinstwasseranlage „Milli-Q Plus 185“, Elix, Fa. Millipore) verwendet. Zum Ansetzen der Standardlösungen wurde Ethanol (pro analysi, Merck) und Methanol (SupraSolv®, Merck) benutzt.

Für die Extraktion, das Clean-up und die Flüssigkeitschromatographie fanden zusätzlich Ethylacetat (SupraSolv®, Merck), Methanol (SupraSolv®, Merck), Dichlormethan (Picograde, Promochem) und einmalig Methyl-*tert*-butylether (SupraSolv®, Merck) Verwendung.

Weitere Chemikalien

Als Ionisierungsmittel und Laufmittel der HPLC wurden Ammoniumacetat (Fractopur®, Merck) in Milli-Q-Wasser und Methanol benutzt. Hierfür wurde je nach molarer Stärke eine entsprechende Menge an Ammoniumacetat in Methanol und Milli-Q-Wasser gelöst. Die Mengen für einen Liter Laufmittel, also Methanol oder Milli-Q-Wasser sind der folgenden Tabelle 16 zu entnehmen:

Tabelle 16: Einwaagen zum Ansetzen der Ionisierungsmittel im Laufmittel MeOH und Milli-Q-Wasser für je 1 Liter Flüssigkeit.

Molare Stärke der Lösung	Menge an NH₄Ac [g]	Menge an CH₃COOH [g]
0.6 mmol	0.0462	0.03603
1.2 mmol	0.0924	-
2.5 mmol	0.1927	-

Die Änderungen der Ionisierungsmittel erfolgten durch den Wechsel der Messgeräte vom HPLC-ESI-API3000 zum HPLC-ESI-API4000 aufgrund der besseren Messempfindlichkeiten des API4000. Am API3000 wurde zunächst mit einer 0.6 mmolaren Ionisierungsmittel bestehend aus Ammoniumacetat und Essigsäure im Laufmittel gearbeitet. In fortgeschrittenen Versuchen wurde auf die Zugabe der Essigsäure verzichtet, um die Intensität bei der Messung der Estrogene zu erhöhen. Da bei der Methodenentwicklung der Schwerpunkt bei den Estrogenen und estrogen wirksamen Substanzen liegt, wurde ein Intensitätsverlust der sauren Pharmaka in Kauf genommen. Versuche von Iris-C. Beck am API4000 ergaben höhere Intensitäten bei der Messung mit reinem Methanol und Milli-Q-Wasser als Laufmittel und einer externen Zuführung von Ionisierungsmittel. Für die Messung des Kopplungsversuchs wurde eine 1.2 mmolare Ammoniumacetat-Methanollösung als Ionisierungsmittel verwendet, die kurz vor dem Interface extern zugegeben wurde. Bei dieser externen Zugabe des Ionisierungsmittels wurde eine stärkere Ammoniumacetatlösung verwendet, als es sonst im Laufmittel der Messungen mittels des API3000 der Fall war. Spätere Versuche von Iris-C. Beck am API4000 ergaben noch bessere Intensitäten bei Messungen mit 2.5 mmolarer Ammoniumacetatkonzentration im Laufmittel. Eine externe Zuführung des Ionisierungsmittels bedeutet eine größere Menge an Lösungsmittel in der Ionenquelle und kann die Intensität der Substanzen negativ beeinflussen. Deshalb wurde bei den folgenden Messungen wieder Abstand von einer externen Zugabe des Ammoniumacetats kurz vor dem Interface genommen.

Für die Aufarbeitung der Proben wurden noch folgende Lösungen verwendet:

- Natriumacetatpuffer (100 mmolar)
Für 50 mL dieses Puffers wurden 0.6799 g Natriumacetat-Trihydrat (Reag. Ph. Eur., Merck) eingewogen und mit 50 mL Milli-Q-Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung auf 37 °C erhitzt und mit 1 molarer Salzsäure auf einen pH-Wert von 5 eingestellt. Dieser Natriumacetatpuffer wurde sowohl für die Aufarbeitung der Proben, für die Enzymlösung als auch für den Enzymtest verwendet.
- Enzymlösung (400 units/mL)
Für die Enzymlösung wurden 10 g des Natriumacetatpuffers (pH 5 bei 37 °C) mit 30 µL Enzymen versetzt, was einer Konzentration von ca. 400 units/mL entspricht. Die Enzyme β -Glucuronidase (Typ: H-3, 145700 units/mL aus *Helix pomatia*) kamen von der Fa. Sigma

Des Weiteren wurden für die Extraktion Salzsäure (Suprapur®, Merck), 2-Propanol (pro analysi, Merck) und Estradiol-17 β -D-Glucuronid ebenfalls von der Fa. Sigma verwendet. Das Kieselgel (Kieselgel 60, Merck) wurde vor der Verwendung für das Clean-up in einem Muffelofen über Nacht bei 450 °C ausgeheizt.

Für die Überprüfung der Aktivität der β -Glucuronidase fanden zusätzlich Glycin (pro analysi, Merck), Natriumchlorid (pro analysi, Merck), Ethanol, Phenolphthalein (Reag. Ph. Eur.) und Phenolphthalein-mono- β -Glucuronsäure (Fa. Sigma) Verwendung. Die entsprechenden Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

- Phenolphthalein-Glucuronid-Lösung (1.2 mmolar)
Für diese Lösung wurden 0.01988 g Phenolphthalein-Glucuronid-Kristalle (beinhaltet 2 mol H₂O/mol) eingewogen und mit 30 mL Milli-Q-Wasser aufgenommen.
- Glycinpuffer (200 mmolar, pH 10.4)
Für diesen Puffer wurden 3.0028 g Glycin eingewogen und mit 200 mL Milli-Q-Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 5 eingestellt.
- Salzlösung (0.2 % (w/v))
Die Salzlösung zur Herstellung der Enzymlösung wurde mit 0.1 g Natriumchlorid auf 50 mL Milli-Q-Wasser angesetzt.
- β -Glucuronidase-Enzymlösung (400 units/mL)
Die Enzymlösung für diese Überprüfung wurde in der gleichen Konzentration angesetzt wie sie auch für die Aufarbeitung benötigt wird. Die Aktivität der Stammlösung lag bei 145700 units/mL. Für die Enzymlösung wurden nun

30 μL dieser Enzyme in 10 mL Salzlösung gegeben, was einer Aktivität von ca. 400 units/mL ergibt.

- Ethanol (95 % (v/v))

Für die Phenolphthalein-Standardlösung wurde diese Ethanollösung benötigt. Hierfür kamen auf 75,05 g Ethanol 4 g Milli-Q-Wasser, um 95 mL Ethanollösung herzustellen.

- Phenolphthalein-Standardlösung (0.05 % (w/v))

1 mg Phenolphthalein wurde in 2 mL Ethanollösung zur Herstellung dieses Standards gelöst.

3.1.2 Reinigung der Laborgeräte

In der quantitativen und qualitativen Spurenanalytik ist die sorgfältige Reinigung der Laborgeräte ein unverzichtbarer Schritt vor der eigentlichen Aufarbeitung oder Messung. Da die in dieser Arbeit untersuchten Industriechemikalien Bestandteile von Kunststoffen darstellen, wurde möglichst auf die Verwendung von Laborgeräten aus diesem Material verzichtet. So wurden beispielsweise alle Gefäße mit Kunststoffdeckel mit einem Teflon-Liner zwischen Deckel und Glas versehen.

Alle metallischen Spatel, Löffel und größeren Glasgefäße wie Bechergläser, Glassäulen und Kolben zur Aufbewahrung von Lösungsmitteln wurden in einem Geschirrspüler für Laborgeräte mit einem entsprechenden Laborreiniger gespült. Anschließend wurden alle nicht graduierten Gefäße bei 250 °C und alle graduierten bei 60 °C im Trockenschrank für mehrere Stunden ausgeheizt. Bis zur endgültigen Benutzung wurden alle Öffnungen zum Schutz mit Alufolie versiegelt.

Die Probengläser mit Schraubdeckelverschluss, die Zentrifugengläser und Vollpipetten wurden über Nacht in einem fünf prozentigem Reinigungsbad (RBS-Bad der Fa. Roth) gereinigt. Anschließend wurden die Gefäße mehrfach zunächst mit Leitungswasser, dann mit Milli-Q-Wasser gespült und ebenfalls im Trockenschrank bei 250 °C bzw. 60 °C ausgeheizt.

Pasteur-Pipetten und Messvials wurden vor der Benutzung zweimalig mit Aceton und Ultraschallbad gereinigt und anschließend bei 250 °C ausgeheizt.

Pasteurpipetten, Messvials und Probengläser wurden zudem nur einmalig verwendet.

Die Wheatonvials – Einenggefäße mit genauer Graduierung – wurden nach Benutzung dreimalig mit Aceton und anschließend dreimalig mit Methanol und Ultraschallbad gereinigt. Gelagert wurden die ebenfalls indem sie mit Methanol gefüllt wurden.

Spritzen und Transferpetteoren wurden vor und nach der Benutzung mehrfach mit Lösungsmittel gespült. Die Prozedur fand folgendermaßen statt: In vier Bechergläser

wurden je zweimal Aceton und zweimal das Lösungsmittel gegeben, welches in den zu pipettierenden Standardlösungen vorlag. Hintereinander wurden nun die Präzisionsgeräte jeweils zehnmal aus jedem Lösungsmittelbehälter aufgezogen und das Lösungsmittel verworfen.

Alle Laborgeräte wurden zusätzlich vor der Benutzung dreimalig mit dem jeweiligen Lösungsmittel gespült.

3.1.3 Verwendete Geräte und Parametereinstellungen

Hier sollen die verwendeten Geräte und die Messparameter aufgeführt werden. Dabei werden lediglich die Parameter für die Messungen am HPLC-API4000-System genannt, da diese für die Vorversuche ab der Überprüfung des Clean-ups sowie der Realproben verwendet worden sind. Eine Tabelle des Messparameter für das API3000 ist im Anhang unter 8.3.2 zu finden. Ebenfalls im Anhang unter 8.1.3 ist eine detaillierte Liste aller verwendeten Geräte aufgeführt.

HPLC-MS/MS

Als Flüssigkeitschromatographiesystem wurde in dieser Arbeit das HP 1100 der Fa. Agilent Technologies mit entsprechender HPLC-Pumpe, AutoSampler, integriertem Lösungsmittelentgaser und HPLC-Säulen-Ofen verwendet.

Die verwendete Trennsäule Synergi™ 4 μ Hydro-RP 80 A der Firma Phenomenex ist sehr hydrophob und besitzt als chemisch gebundene Phase (Partikelgröße: 2,4-10 μ) mit C₁₈-Ketten, die mit einem Endcapping zur Säulenstabilität versehen wurde. Es ist eine Säule für die Umkehrphasenchromatographie und hat eine Länge von 150 mm. der Durchmesser beträgt 2 mm. Zum Schutz der Säule wurde zusätzlich die Vorsäule Security Guard™ C₁₈ 4x2 mm (Fa. Phenomenex) verwendet (PHENOMENEX 2003).

Das HPLC-System war mit Hilfe des Interface „Turbo Ion Spray“ (ESI-System) an das MS/MS gekoppelt.

Das verwendete Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems/MDS Sciex (API4000) war ein Triple Quadrupole (MS/MS) Massenspektrometer. Die Stickstoffversorgung für das API4000 erfolgte mittels Gasgenerator Firma Peak Scientific, Serie API Systems.

Software

Für die Steuerung der HPLC-MS/MS, die Auswertung der Massenspektren und deren Quantifizierung wurde die Software „Analyst“ von Applied Biosystems/MDS Sciex verwendet. Zu Beginn wurde die Version 1.2, später dann Version 1.4 benutzt. Für die weiteren Berechnungen wurde Microsoft Excel verwendet.

HPLC-MS/MS- Parameter des API4000.

Das HPLC-Programm sah wie folgt aus:

Säule: Synergi™ 4 µ Hydro-RP 80 A (Phenomenex)
Vorsäule: Security Guard™ C₁₈ 4x2 mm
Eluenten: A: 2,5 mM NH₄Ac in Milliporewasser
B: 2,5 mM NH₄Ac in Methanol
Fluss: 200 µL/min
Equilibrierzeit: 5 min
Laufzeit: 30 min
Ofentemperatur: 23 °C
Injekt-Volumen: 10 µL.

Es wurde mit einer Gradientenelution gearbeitet. Die Parameter der Gradientenelution sind Tabelle 17 und Abbildung 11 zu entnehmen.

Tabelle 17: Verwendete Gradientenelution.

Zeit [min]	Laufmittel	
	A [%] Wasser	B [%] Methanol
0	70	30
5	70	30
8	10	90
23	0	100
28	0	100
30	70	30

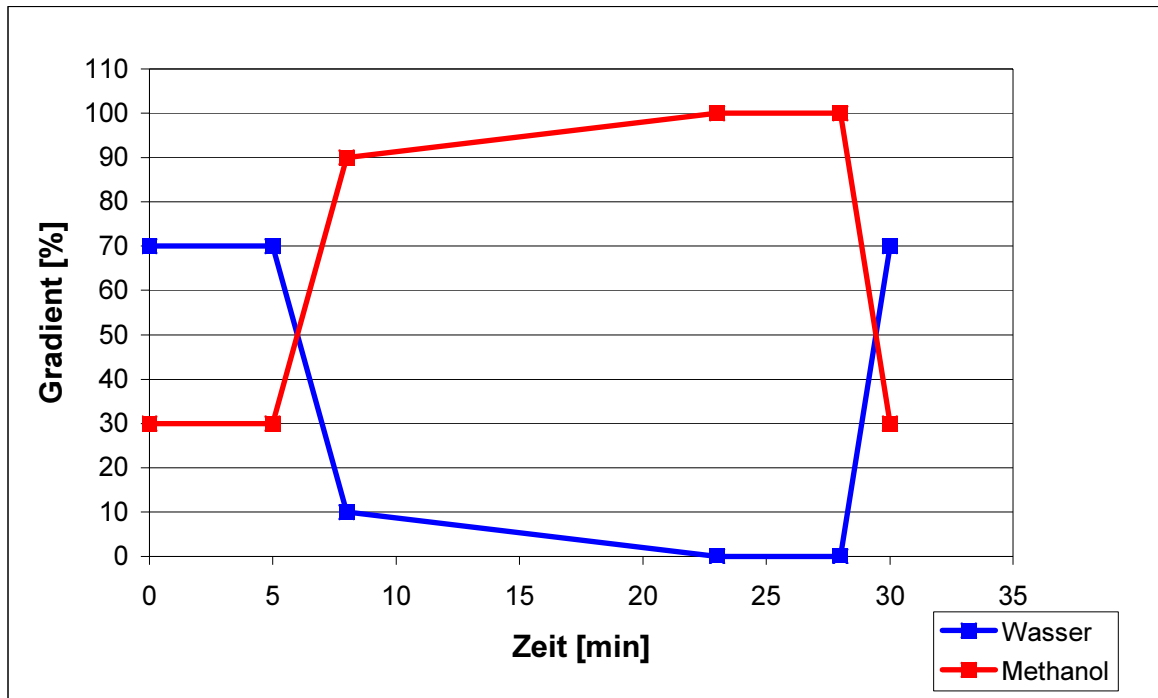


Abbildung 11: Verwendete Gradientenelution.

Die obige Abbildung 11 stellt die Gradientenelution zur Veranschaulichung nochmals graphisch dar. Das Gradientenprogramm jeder Messung begann mit der Einstellung der Säule auf das anfängliche Lösungsmittelverhältnis von 70 % Wasser und 30 % Methanol für einen Zeitraum von fünf Minuten bis zum eigentlichen Beginn der Elution.

Die Analyte wurden im MRM-Modus mit zwei Übergängen vermessen; ein Mutterion mit zwei Tochterionen. Die folgenden Tabellen 18 und 19 geben eine Übersicht über die Parameter MS/MS bezüglich der gemessenen Analyte.

Tabelle 18: MS/MS- Parameter untersuchten Estrogene und estrogen wirkenden Substanzen.

Substanz	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MRM	NEB	CUR	IS (V)	CAD	TEM (°C)	EP (V)	DP (V)	FP (V)	CE (V)	CXP (V)
17β-Estradiol		271.2	145.0	50	10	-4500	6	250	-10	-121	-240	-58	-9
			183.0										-58
Estron		269.1	145.0	50	10	-4500	6	250	-10	-106	-250	-52	-7
			142.9										-78
Estriol		287.3	145.0	50	10	-4500	6	250	-10	-111	-240	-62	-7
			170.9										-52
Genistein	271.0		91.0	50	10	5500	4	250	10	70	170	63	6
			153.1										39
Daidzein	255.1		199.1	50	10	5500	4	250	10	80	180	37	14
			152.2										61
17α-Ethinyl- estradiol		295.2	145.0	50	10	-4500	6	250	-10	-110	-280	-54	-7
			142.9										-74
			159.0										-52
			183.9										-55
4tert- Octylphenol		205.2	132.9	50	10	-4500	6	250	-10	-80	-140	-34	-7
			116.9										-82
Bisphenol A		227.1	211.9	50	10	-4500	6	250	-10	-70	-270	-30	-15
			132.9										-32
Nonylphenol (techn. Mix.)		219.0	132.9	50	10	-4500	6	250	-10	-70	-160	-42	-7
			116.9										-84

Tabelle 19: MS/MS- Parameter untersuchten Pharmaka und interner Standardsubstanzen.

Substanz	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MRM	NEB	CUR	IS	CAD	TEM	EP	DP	FP	CE	CXP
						(V)		(°C)	(V)	(V)	(V)	(V)	(V)
Gemfibrozil	249.5		120.8	50	10	-4500	6	250	-10	-40	-100	-22	-7
			126.8									-16	-7
Bezafibrat	362.2		316.1	50	10	5500	4	250	10	70	140	23	10
			139.0									27	10
Diclofenac	296.2		214.0	50	10	5500	4	250	10	50	90	47	14
			250.1									19	8
Carbamazepin	237.1		194.0	50	10	5500	4	250	10	60	120	29	10
			179.0									49	12
Dihydrocarbamazepin	239.2		194.0	50	10	5500	4	250	10	80	120	33	12
			179.1									51	12
Estradiol D3	274.2		145.0	50	10	-4500	6	250	-10	-110	-240	-56	-7
			185.0									-58	-13
Bisphenol A D16	242.2		142.9	50	10	-4500	6	250	-10	-70	-210	-36	-7
			97.0									-34	-7

Identifizierung und Quantifizierung der Substanzen

Die Identifizierung der Analyte erfolgte über das gleichzeitige Vorhandensein der beiden Tochterionen (Quantifier und Qualifier). Um andere Substanzen mit gleichen Massenübergängen auszuschließen wurde zusätzlich überprüft, ob sowohl das Intensitätsverhältnis von Quantifier zu Qualifier als auch deren Retentionszeit übereinstimmen. Da es gerade in Proben mit viel Matrix oder bei Temperaturschwankungen zu Retentionszeitverschiebungen kommen kann, dient die Überprüfung der Intensitätsverhältnisse der Fragmente der zusätzlichen Absicherung. Die Quantifizierung der Substanzen erfolgte über das intensivste Fragment (Quantifier). Das zweite Fragment (Qualifier) wurde zur Überprüfung und Absicherung des Analyten detektiert. Für die Substanz 17 α -Ethinylestradiol wurden nach Versuchen von Iris-C. Beck mit Realproben zusätzlich zwei weitere Massenübergänge vermessen, damit eine Verwechslung mit der Matrix in dem Retentionszeitraum ausgeschlossen werden konnte.

Die Retentionszeit der Substanzen verschob sich im Laufe der Versuche immer weiter nach hinten. Als Grund hierfür konnte ein defektes Kugelventil im HPLC-System ausgemacht werden. Aufgrund des Einbeziehens des Intensitätsverhältnisses der Fragmente, war aber eine eindeutige Identifizierung der Analyte trotzdem möglich.

Die folgende Tabelle 20 zeigt die anfänglichen Retentionszeiten (RT) und die Intensitätsverhältnisse (IV) der gewählten Fragmente sowohl in Standardlösungen als auch in Gallenflüssigkeiten. Ermittelt wurden sie durch eine Messung mittels HPLC-API4000.

Tabelle 20: Retentionszeiten und Intensitätsverhältnisse der gewählten Fragmente.

	Mutterion	Tochterion	IV	IV	RT [min]	RT [min]
			Standard	Galle	Standard	Galle
17β-Estradiol	271.20	145.00	1.26	1.32	14.7	14.4
		183.00				
Estron	269.10	145.00	2.59	2.58	14.7	14.3
		142.90				
Estriol	287.30	144.90	0.93	0.51	12.6	12.2
		170.90				
Genistein	271.00	91.00	0.87	0.98	12.7	12.8
		153.10				
Daidzein	255.10	199.10	1.97	1.92	11.9	12.2
		152.20				
17α-Ethinylestradiol	295.20	145.00	1.82	1.69	14.5	14.1
		142.90				
4tert-Octylphenol	205.20	132.60	9.62	7.49	17.0	16.9
		116.90				
Bisphenol A	227.10	211.90	0.46	0.53	13.5	13.2
		132.9				
Nonylphenol	219.20	132.90	6.75	7.12	18.2	18.5
		116.90				
Gemfibrozil	249.50	120.80	11.8	12.55	14.8	15.4
		126.80				
Bezafibrat	362.20	316.10	1.29	1.41	11.1	12.2
		139.00				
Diclofenac	296.20	214.00	1.16	1.17	11.9	12.9
		250.10				
Carbamazepin	237.10	179.10	1.42	1.44	12.9	12.7
		194.00				
Dihydrocarbamazepin	239.20	194.00	4.04	4.20	13.2	13.0
		179.10				
Estradiol D3	274.20	145.00	1.39	1.31	14.7	14.4
		185.00				
Bisphenol A D16	242.20	142.90	8.05	1.70	13.5	13.1
		97.00				

3.1.4 Kalibrierung

Für die Quantifizierung der Analyte bedient man sich im Allgemeinen einer externen Kalibrierung, der Verwendung von internen Standards oder dem Standard-additionsverfahren.

Bei einer externen Kalibrierung wird durch Vermessen von Kalibrierstandards (Referenzstandards unterschiedlicher Konzentrationen) eine Kalibriergerade ermittelt. Dabei wird die Konzentration gegen die gemessene Peakfläche graphisch über die wahrscheinlichste Gerade als lineare Regression aufgetragen. Die Kalibrier-

funktion stellt somit die Intensität des Messsignals in Abhängigkeit der Konzentration der Analyten in den Referenzstandards dar.

In einer separaten Messung werden nun Konzentrationen der Analyte in den Proben durch den Vergleich mit den Flächen- bzw. Höhenintensitäten der Kalibrierstandards ermittelt. Ungenauigkeiten ergeben sich hierbei durch die Unterschiede der Lösungen in denen die Proben und die Kalibrierstandards vorliegen. So werden Matrixeffekte, die auf die Analyte in den Proben wirken, bei Kalibrierstandards nicht berücksichtigt.

Bei der Kalibrierung mit internen Standards werden die Proben vor Beginn der Probenaufarbeitung mit einer definierten Menge von Standardsubstanzen (interner Standard) versehen, die nicht in der Probe vorkommen. Dabei ist aber zu beachten, dass die Standardsubstanzen den Eigenschaften gesuchten Analyten sehr ähneln sollten, damit eine Vergleichbarkeit gegeben ist. Hier kommen zum Beispiel isotopen-markierte zum Beispiel deuterierten Substanzen zum Einsatz. Diese Substanzen unterscheiden sich nicht chemisch und strukturell von den gesuchten Analyten, sondern lediglich durch ihre Masse, da ein oder mehrere Atome im Molekül durch schwerere analoge Isotope ausgetauscht wurden. Die Quantifizierung erfolgt bei der Kalibrierung mit internen Standards durch einen Vergleich der Peakflächen von internen Standards und den zu untersuchenden Analyten. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Standards den gleichen Matrixeffekten unterliegen wie die Analyte in den Proben. Zudem treten bei beiden die gleichen Verluste während der Probenaufarbeitung auf, so dass durch die definierte Zugabe der Standardsubstanzen auf die ursprünglichen in der Probe vorliegenden Analytmengen geschlossen werden kann. Ein Nachteil besteht allerdings darin, dass solche Standardsubstanzen meist sehr teuer sind.

Für das Standardadditionsverfahren werden der Probe verschiedene definierte Mengen der gesuchten Analyte zugegeben. Die entstehende Kalibriergrade ist dabei um den Substanzgehalt der Probe vom Nullpunkt nach oben verschoben. Der Vorteil ist die Tatsache, dass die Ergebnisse realistischer sind, da sowohl die Standards als auch die Analyte der Probe denselben Bedingungen unterliegen. Der Nachteil dieser Methode ist, dass eine größere Probemenge erforderlich ist, da verschiedene Konzentrationen zur Aufstockung empfehlenswert sind. Zudem ist dieses Verfahren sehr zeitintensiv.

In dieser Arbeit wurde die Quantifizierung der Analyte an hand einer externen Kalibrierung vorgenommen. Für das Ansetzen von Kalibrierlösungen wurden die vorhandenen Stammlösungen (vergleiche Kapitel 3.1.1) entsprechend verdünnt. Da die Proben nach der Aufarbeitung in einem Lösungsmittelverhältnis

Methanol/Wasser (70:30) vorliegen, wurden die Kalibrierlösungen ebenfalls in diesem Lösungsmittelgemisch angesetzt.

Für die externe Kalibrierung musste zunächst der lineare Bereich der Methode bestimmt werden. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe über einen großen Konzentrationsbereich (2 ng/μL-0,005ng/μL) in einem Lösungsmittelgemisch entsprechend der vorliegenden Probenextrakte angesetzt und vermessen. Der Konzentrationsbereich der Kalibrierstandards wurde so gewählt, dass sie den erwarteten Konzentrationsbereich in den Proben abdecken. Die genauen Konzentrationen der Kalibrierlösungen sind in der folgenden Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: Konzentrationen der Kalibrierstandards.

Substanzen	KAL 1	KAL 2	KAL 3	KAL 4	KAL 5	KAL 6	KAL 7	KAL 8	KAL 10ng
	2 ng/ μ L	1 ng/ μ L	0,5 ng/ μ L	0,25 ng/ μ L	0,1 ng/ μ L	0,05 ng/ μ L	0,01 ng/ μ L	0,005 ng/ μ L	10 ng/ μ L
17β-Estradiol	2.471	1.098	0.520	0.253	0.100	0.050	0.010	0.005	
Estron	2.391	1.062	0.503	0.245	0.097	0.048	0.010	0.005	
Estriol	2.351	1.045	0.495	0.241	0.095	0.047	0.010	0.005	
Genistein	1.166	0.518	0.246	0.120	0.047	0.023	0.005	0.002	
Daidzein	1.179	0.524	0.248	0.121	0.048	0.024	0.005	0.002	
17α-Ethinyloestradiol	2.456	1.092	0.517	0.252	0.099	0.049	0.010	0.005	
4tert-Octylphenol	2.483	1.104	0.523	0.255	0.100	0.050	0.010	0.005	
Bisphenol A	1.801	0.801	0.379	0.185	0.073	0.036	0.007	0.004	7.205
Nonylphenol	3.385	1.504	0.713	0.347	0.137	0.068	0.014	0.007	13.54
Gemfibrozil	2.779	1.235	0.585	0.285	0.112	0.056	0.011	0.006	
Bezafibrat	2.470	1.098	0.520	0.253	0.100	0.050	0.010	0.005	
Diclofenac	3.003	1.335	0.632	0.308	0.121	0.060	0.012	0.006	
Carbamazepin	3.811	1.694	0.802	0.391	0.154	0.077	0.015	0.008	
Dihydrocarbamazepin	2.568	1.142	0.541	0.263	0.104	0.052	0.010	0.005	
Estradiol D3	2.447	1.088	0.515	0.251	0.099	0.049	0.010	0.005	
Bisphenol A D16	2.441	1.085	0.514	0.250	0.099	0.049	0.010	0.005	

Erste Versuche mit Gallenflüssigkeiten ergaben, dass die Konzentration von Nonylphenol und Bisphenol A außerhalb des Kalibrierbereichs lagen. Für diese Substanzen wurde daraufhin der Kalibrierbereich bis auf ca. 10 ng/μL ausgedehnt. Für Nonylphenol konnte bis in diesen Konzentrationsbereich hinein eine gute Korrelation gezeigt werden.

Tabelle 22: Konzentrationsbereiche und Korrelationskoeffizienten.

Substanz	Bereich [ng/μL]	Korrelationskoeffizient
17β-Estradiol	0–0.25	0.9984
Estron	0–0.25	0.9994
Estriol	0–0.24	0.9968
Genistein	0–0.12	0.9917
Daidzein	0–0.12	0.9938
17α-Ethinylestradiol	0–0.25	0.9979
4tert Octylphenol	0–0.26	0.9990
Bisphenol A	0–3.6	0.9835
Nonylphenol	0–13.5	0.9979
Gemfibrozil	0–0.3	0.9981
Bezafibrat	0–0.25	0.9947
Diclofenac	0–0.31	0.9914
Carbamazepin	0–0.39	0.9905

In der obigen Tabelle 22 sind Konzentrationsbereiche und Korrelationskoeffizienten der Kalibrierung eines Vorversuches mit Aalmuttergalle aufgeführt. Lediglich für die Substanzen Bisphenol A und Nonylphenol wurde eine Messung von Realproben vom Salzhaff aufgrund des erweiterten Kalibrierbereichs verwendet.

Für eine quantitative Auswertung mittels Kalibriergrade ist die eindeutige Beziehung zwischen Substanzmenge und Detektorsignal über dem gesamten Kalibrationsbereich hinweg von großer Bedeutung. Diese Beziehung ist durch eine Kalibrierfunktion beschrieben.

$$y = a_0 + a_1 x$$

- y = Messsignal
 a₀ = Untergrund (Signal bei Konzentration 0)
 a₁ = Steigung (Empfindlichkeit)
 x = Konzentration

Den Kalibriergeraden liegt dabei eine Wichtung von „1/x“ zugrunde. Niedrige Konzentrationen erhalten somit gegenüber hohen Konzentrationen bei der Berechnung der Kalibriergeraden ein stärkeres Gewicht. Der Grund dafür ist die höhere Präzision hochkonzentrierter Lösungen und deren geringere Messunsicherheit (JAHNKE, 2003, S. 68).

Die nachfolgende Abbildung zeigt beispielhaft eine Kalibriergrade für 17 β -Estradiol.

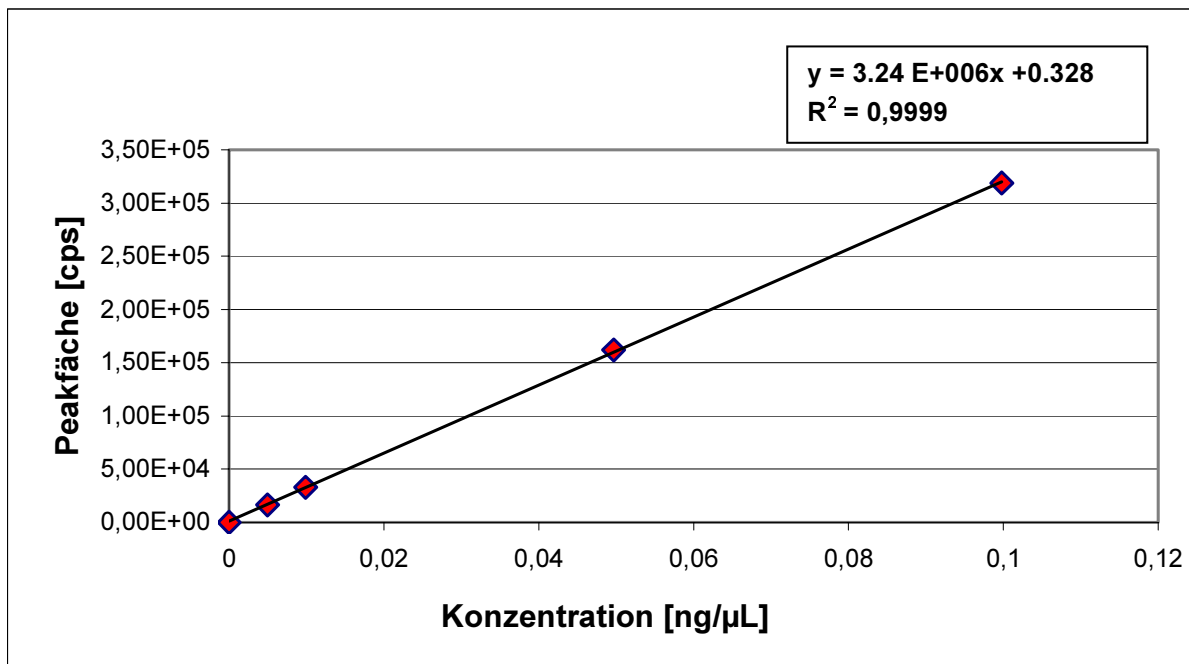


Abbildung 12: Beispiel einer Kalibriergrade von 17 β -Estradiol aus der Messung männlicher Aalmuttern vom Salzhaff.

Für die externe Kalibrierung wurden fünf Kalibrierstandards, meist KAL8-KAL4, bei Nonylphenol und Bisphenol A in Realproben bis KAL1 und zusätzlich Standardlösungen bis 10 ng/ μ L, jeweils vor und nach der Messung der Proben vermessen. Zusätzlich wurden bei längeren Messreihen nach ca. zehn Messungen von Proben erneut ein oder mehrere Kalibrierstandards zur Kontrolle der Messempfindlichkeit des Massenspektrometers vermessen.

Zusätzlich zur externen Kalibrierung wurde zur Kontrolle der Probenaufarbeitung (Extraktion, Clean-up) mit internen Standards gearbeitet. Allerdings lag nicht für jede untersuchte Substanz ein entsprechender interner Standard vor. Als Interne Standards kamen Estradiol D3, Bisphenol A D16, und Dihydrocarbamazepin zur Anwendung, wobei die beiden ersten deuterierte Substanzen sind. Diese deuterierten Substanzen sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

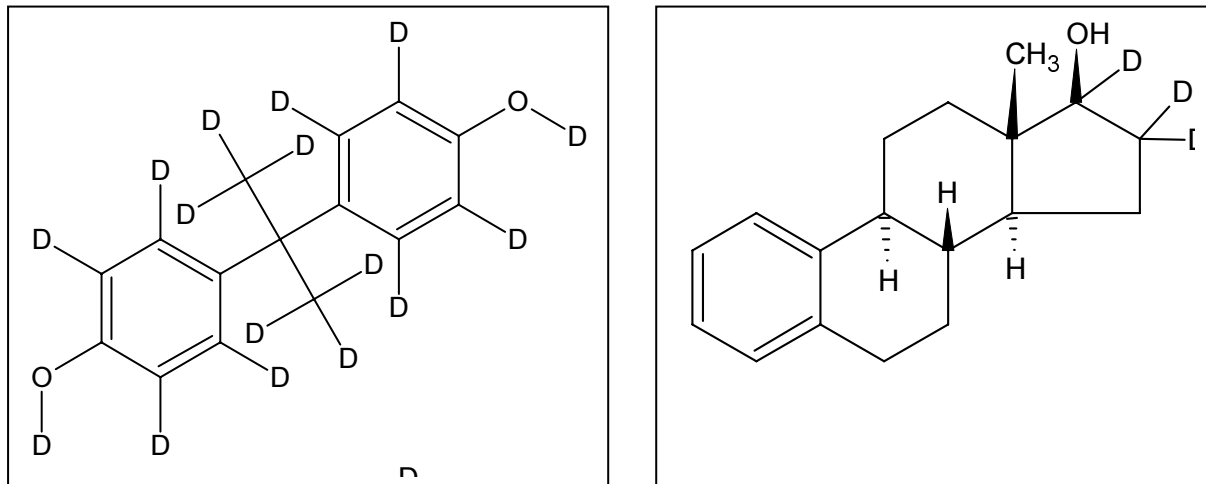


Abbildung 13: Verwendete Substanzen als interner Standard (Bisphenol A D16 und 17 β -Estradiol-16,16,17-D3).

3.1.5 Leistungsparameter der Methode

In diesem Kapitel werden als Leistungsparameter der Methode die Berechnung sowohl des Matrixeffekts als auch der Wiederfindungen dargestellt. Des Weiteren ist die Wiederholpräzision aufgeführt. Daneben werden die instrumentellen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen gezeigt.

Matrix und Wiederfindung

Alle Probeninhaltsstoffe, die neben den Analyten in der Probe vorliegen und die Messung beeinflussen können, werden unter dem Begriff Matrix zusammengefasst. Diese Inhaltstoffe können bei der Messung zu einer Signalerhöhung führen, wenn dieselben Massenübergänge und Retentionszeiten wie die der Analyte vorliegen. Bei einer Trennung mittels HPLC und Detektion mit MS/MS ist dies jedoch relativ unwahrscheinlich.

Es kann durch die Matrix aber auch zu einer Signalunterdrückung – Signal-suppression genannt – kommen. Hier ist es ausreichend, wenn die Matrix dieselbe Retentionszeit besitzt und damit gleichzeitig mit den Analyten in die ESI-Quelle gelangt. In der ESI-Quelle kommt es dann zur Konkurrenz um die begrenzte Anzahl an Ladungsträgern, was insgesamt zu einer geringeren Ionisierung der Analyte führt. Um in dieser Arbeit diese so genannten Matrixeffekte (100-%-Signalsuppression bzw. -erhöhung) zu berücksichtigen, sind folgende Schritte unternommen worden:

Ansatz 1

Die Proben wurden vor der Aufarbeitung mit definierter Menge an Standardlösungen dotiert.

Ansatz 2

Die Proben wurden undotiert aufgearbeitet und vermessen.

Ansatz 3

Die Proben wurden undotiert aufgearbeitet und der Extrakt vor dem Vermessen mit einer definierten Menge an Standardlösungen dotiert.

Die folgende Abbildung fasst den Ablauf der Aufarbeitung der drei Ansätze zusammen.

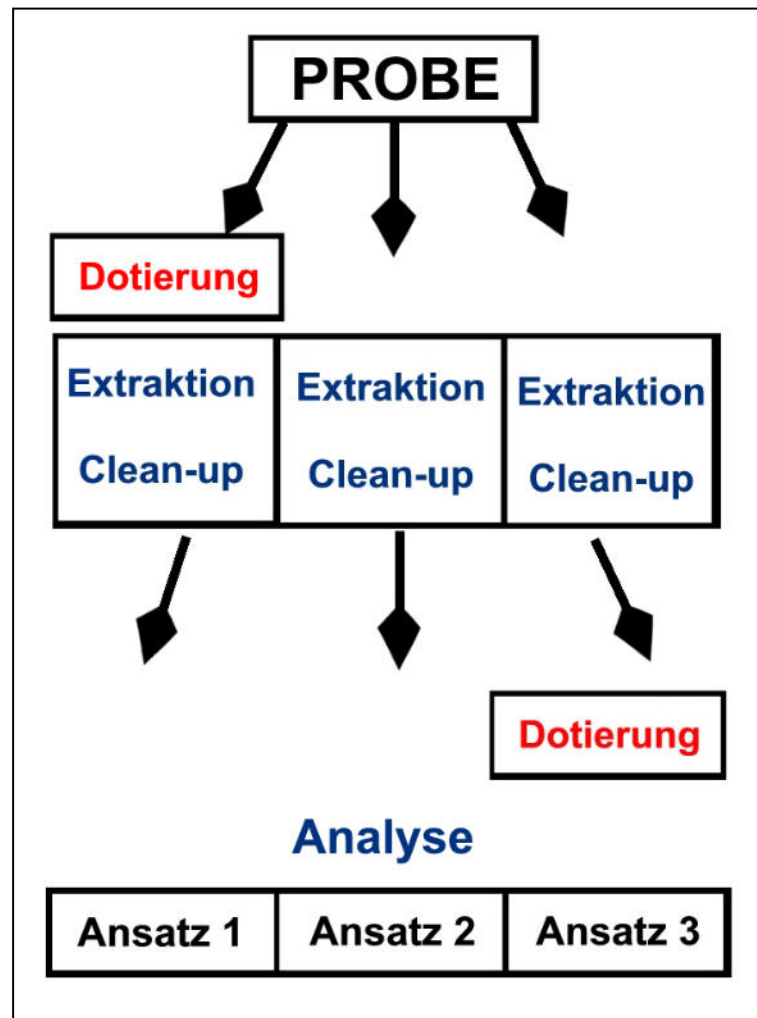


Abbildung 14: Bestimmung der Wiederfindung und des Matrixeffektes.

Mit Hilfe von Ansatz 1 wird die Wiederfindung über das Gesamtverfahren ermittelt werden. Alle Verluste bei der Probenaufarbeitung werden hier berücksichtigt, weil die

zugegebenen Substanzen den gleichen Bedingungen unterliegen, wie die schon vorhandenen Analyten in der Probe.

Ansatz 2 ist für die Ermittlung der Analytkonzentration in der Realprobe, die mit Hilfe der anderen Ansätze (1 und 3) korrigiert wird.

Ansatz 3 wird für die Abschätzung der Matrixeffekte, die auf die Analyte wirken, verwendet. Dabei finden die Verluste während der Probenaufarbeitung wie in Ansatz 1 keine Berücksichtigung, so dass die Veränderung der Messsignale nur auf die Matrixeffekte zurückzuführen sind. Der Matrixeffekt ist dabei 100 % abzüglich der Signalsuppression oder -erhöhung, die auf den Analyten während der Messung wirkt.

Den Matrixeffekt berechnet man dann mit Hilfe von dem um Ansatz 3 korrigierten Messwert:

$$\text{Matrixeffekt} = \frac{(\text{Messwert}_{\text{Ansatz 3}} - \text{Messwert}_{\text{Ansatz 2}})}{\text{Dotierung}} * 100 \%$$

Die Wiederfindung über das Gesamtverfahren, also das Ermitteln der Verluste bei der Probenaufarbeitung wird wie folgt berechnet:

$$\text{Wiederfindung (über das Gesamtverfahren)} = \frac{(\text{Messwert}_{\text{Ansatz 1}} - \text{Messwert}_{\text{Ansatz 2}})}{\text{Dotierung}} * 100 \%$$

Nun kann man die Wiederfindung über das Gesamtverfahren um den Matrixeffekt korrigieren, um eine Aussage über die Wiederfindung mit Berücksichtigung des Matrixeffektes machen zu können. Man erhält die so genannte Wiederfindung der Aufarbeitung.

$$\text{Wiederfindung (der Aufarbeitung)} = \frac{\text{Wiederfindung}}{\text{Matrixeffekt}} * 100 \%$$

Um nun zu errechnen, in welcher Konzentration die Analyte in der Realprobe vorlagen, wird das Messergebnis aus Ansatz 2 um die Wiederfindung des Gesamtverfahrens und den Matrixeffekt korrigiert:

$$\text{Konzentration}_{\text{Analyt}} = \frac{\text{Messwert}_{\text{Ansatz 2}}}{(\text{Matrixeffekt} * \text{Wiederfindung})}$$

Zur Veranschaulichung der Begriffsdefinitionen stellt die folgende Abbildung die Zusammenhänge der Wiederfindungen und des Matrixeffektes als Idealfall dar.

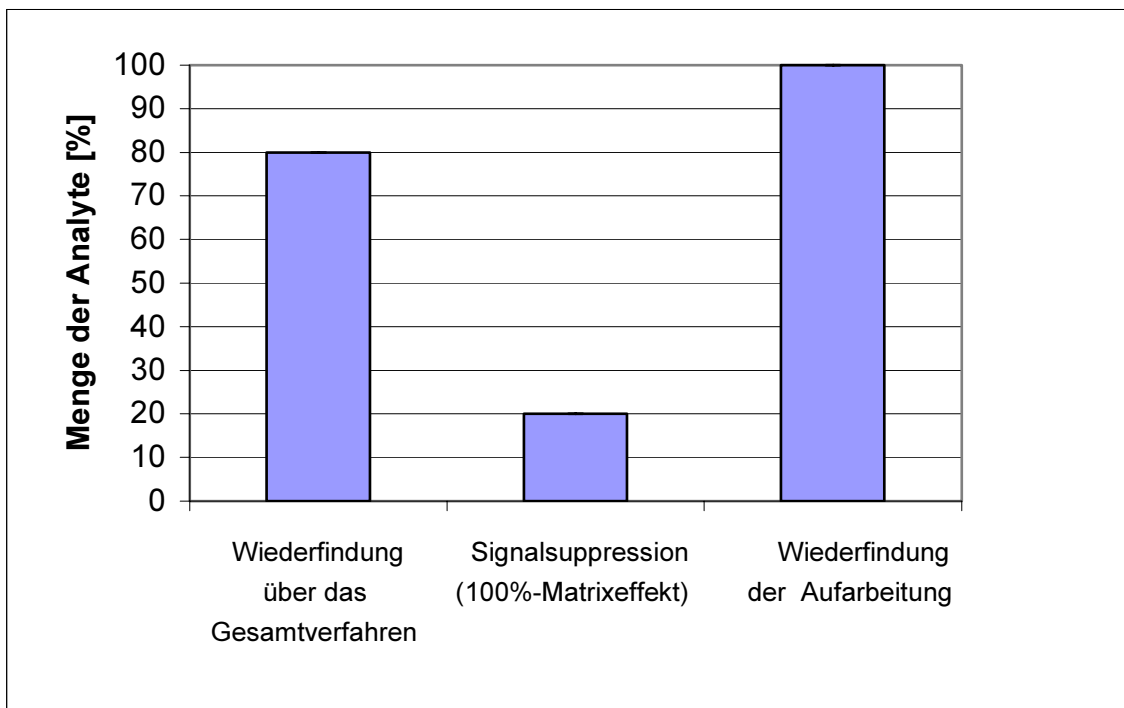


Abbildung 15: Veranschaulichung der Begriffsdefinitionen, %-Angaben im Idealfall.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde der Begriff des Matrixeffektes beibehalten, weil dieser den Effekt der Matrix auf die Substanzen während der Messung unabhängig von einer Unterdrückung oder Erhöhung beschreibt. In der Literatur wird oft der Begriff Signalsuppression verwendet.

Für die Versuche zur Überprüfung der Extraktion und des Clean-ups ohne Matrix wurde für die Bestimmung der Wiederfindung die dotierte Menge mit Hilfe eines errechneten Wertes ermittelt. Die Berechnung erfolgte also anhand eines theoretischen Wertes.

Für die Versuche mit Gallenproben wurde die dotierte Menge ebenfalls vermessen. Dafür wurde je dreimal die gleiche entsprechende Standardmenge in Methanol gegeben und unter Stickstoff auf 70 μL eingengt. Es folgte das Auffüllen mit 30 μL Milli-Q-Wasser und ein Umfüllen in Messvials. Diese Lösungen wurden nun unter gleichen Bedingungen wie die Proben vermessen. Dadurch wird die angenommene Standardkonzentration in der Probe genauer angegeben. Der Aufarbeitungsschritt der Einengung, bei dem es zu Verlusten kommen kann, ist danach schon berücksichtigt.

Ab dem letzten Versuch mit Flundergalle (siehe Kapitel 3.2.4) wurde zusätzlich für die Konzentrationsbestimmung des dotierten Extraktes zur Bestimmung des Matrixeffektes aus den oben genannten Gründen ebenso verfahren. Hierfür wurden zu 50 μL Methanol/Milli-Q-Wasser (70:30) die entsprechenden Standardlösungen zugegeben und vermessen.

Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision ist das Maß der Übereinstimmung zwischen Messergebnissen aus unabhängigen Messungen unter gleichen Bedingungen. Das bedeutet die Verwendung des gleichen Messverfahrens, Bearbeiter, Messgerät, Ort der Messung und den gleichen Messbedingungen innerhalb eines möglichst kurzen Zeitintervalls (NEIDHART ET AL. 2001, S. 13)

In dieser Arbeit wurde die Wiederholpräzision durch das Vermessen von neun unterschiedlichen Aliquoten einer Standardlösung mit einer Konzentration von 0,05 ng/ μL bestimmt. Gemessen wurden diese Standardlösungen mittels HPLC-API4000. Als Laufmittel wurden mit 2.5 mmolarem Ammoniumacetat versetztes Methanol und Milli-Q-Wasser verwendet.

Die absolute Standardabweichung in counts per second (cps) und die relative Standardabweichung in Prozent wurden aus den Peakflächen der Quantifier bestimmt. Die Tabelle 23 zeigt die bestimmte Wiederholpräzision für jede Substanz.

Tabelle 23: Wiederholpräzision der entwickelten Messmethode, (neunfache Messung einer Standardlösung).

	Mittelwert	absolute	relative
		Stdabw.	Stdabw.
	[cps]	[cps]	[%]
17β-Estradiol	2.27E+04	2.96E-02	3.0
Estron	2.05E+05	1.32E-02	1.3
Estriol	4.04E+04	2.86E-02	2.9
Genistein	2.92E+04	2.61E-02	2.6
Daidzein	4.92E+04	2.72E-02	2.7
17α-Ethinylestradiol	2.21E+04	2.10E-02	2.1
4tert-Octylphenol	3.01E+04	5.10E-02	5.1
Bisphenol A	8.70E+04	1.30E-01	13.0
Nonylphenol (techn. Mix)	4.20E+04	3.39E-02	3.4
Gemfibrozil	4.73E+05	1.72E-02	1.7
Bezafibrat	1.21E+05	7.09E-02	7.1
Diclofenac	1.73E+05	2.90E-02	2.9
Carbamazepin	1.22E+06	2.35E-02	2.4
Dihydrocarbamazepin	1.09E+06	2.25E-02	2.2
Estradiol D3	2.84E+04	2.28E-02	2.3
Bisphenol A D16	4.75E+03	4.67E-02	4.7

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenze (Limit of detection, LOD) ist die kleinste in einer Probe nachweisbare Menge eines Stoffes. Hier ist eine genaue Quantifizierung nicht möglich. Dagegen ist eine Bestimmungsgrenze (Limit of quantitation, LOQ), die kleinste noch gut quantifizierbare Stoffmenge in einer Probe. (GREEN, 1996)

Bei den folgenden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen handelt es sich um instrumentelle Grenzen, da sie durch das Vermessen von Standardlösungen ermittelt wurden. Um die Grenzen über das Gesamtverfahren abschätzen zu können müsste mit Realproben gearbeitet werden. Durch das Vorhandensein von Matrix in Realproben liegen die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen dort höher. Diese sind im Kapitel 4.2.1 dargestellt.

Ermittelt wurden diese Nachweis- und Bestimmungsgrenzen durch das Verhältnis der Intensität des Messsignals und der Intensität des Untergrundrauschens. Das Signal-Rausch-Verhältnis, kurz S/N-Verhältnis genannt, ist für die Nachweisgrenze als $S/N \geq 3$ und für die Bestimmungsgrenze als $S/N \geq 10$ definiert. (GREEN, 1996)

Für die ersten Messungen stand als Detektor das API3000 zu Verfügung. Aufgrund der erheblich besseren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Estrogene wurden die Messungen schließlich auf einem API4000 fortgeführt. Diese verbes-

serten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen am API4000 gerade bei den Estrogenen können auch auf den Verzicht von Essigsäure und einem höheren Ammoniumacetatgehalt zurückgeführt werden. Bei den Messungen mittels API4000 wurde mit 2.5 mmol Ammoniumacetat im Laufmittel gearbeitet. Die Gradientenelution und Laufmittelzusammensetzung wurde dagegen nicht verändert. Welcher Detektor für jeden Versuch verwendet wurde, ist in der Methodenentwicklung (Kapitel 3.2) bei den entsprechenden Versuchen aufgeführt. Eine Tabelle mit den instrumentellen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für das API3000 sind im Anhang unter 8.3.1 zu finden. Die instrumentellen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Messung am API4000 sind der Tabelle 24 zu entnehmen. Die Werte beziehen sich auf ein Injektionsvolumen von 10 μL einer Standardlösung und sind sowohl in pg absolut als auch in pg/ μL angegeben.

Tabelle 24: Instrumentelle Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Quantifier, Bestimmung mit Standardlösungen am API4000.

Substanzen	LOD [pg/10 μL]	LOQ [pg/10 μL]	LOD [pg/ μL]	LOQ [pg/ μL]
17β-Estradiol	14.8	49.2	1.48	4.92
Estron	1.01	3.36	0.10	0.34
Estriol	5.70	19.0	0.57	1.90
Genistein	3.47	11.6	0.35	1.16
Daidzein	2.02	6.73	0.20	0.67
17α-Ethinylestradiol	18.0	60.0	1.80	6.00
4tert-Octylphenol	10.2	33.8	1.01	3.38
Bisphenol A	5.14	17.1	0.51	1.71
Nonylphenol (techn. Mix.)	16.9	56.5	1.69	5.65
Gemfibrozil	0.73	2.43	0.07	0.24
Bezafibrat	0.65	2.17	0.07	0.22
Diclofenac	1.20	4.02	0.12	0.40
Carbamazepin	0.93	3.10	0.09	0.31
Dihydrocarbamazepin	2.60	8.66	0.26	0.87
Estradiol D3	7.76	25.9	0.78	2.59
Bisphenol A-D16	12.5	41.6	1.25	4.16

Die geringsten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der natürlichen Estrogene weisen die Substanzen Estron und Daidzein auf. Die Grenzen der Industriechemikalen liegen schon nennenswert höher. Das synthetische Estrogen 17 α -Ethinylestradiol allerdings weist die höchste Bestimmungsgrenze auf. Sehr gute Nachweis- und Bestimmungsgrenzen weisen dagegen die Pharmaka auf.

3.2 Methodenentwicklung – Durchführung und Ergebnisse

Der vorliegende Abschnitt befasst sich mit der Methodenentwicklung der Extraktion, des Clean-ups und der Kopplung der beiden Methodenbestandteile. Dabei wird erst jeweils der Versuchsaufbau und anschließend die Ergebnisse vorgestellt. Zunächst werden Versuche zur Extraktion und des Clean-ups ohne Gallenproben beschrieben. Es folgen Versuche mit Gallenproben von Fludern und Deglucuronidationsenzymen. Nach Versuchsbeschreibungen zur Überprüfung der Wiederfindung in Aalmuttergallen und der Deglucuronidierung folgt eine Darstellung eines Enzymtests zur Überprüfung der Enzymaktivität. Am Ende dieses Abschnitts erfolgt eine Übersicht der durchgeführten Versuche in Form einer Tabelle. Zudem wird die endgültige Methode zur Aufarbeitung der Realproben vorgestellt.

Die Abbildungen zur Darstellung der Ergebnisse zeigen jeweils den ermittelten Mittelwert, während die Fehlerbalken die Standardabweichung vom Mittelwert zeigen. Ausreißer wurden dabei jeweils eliminiert. Besteht der Mittelwert aus nur zwei Messwerten, stellen die Fehlerbalken den minimalen bzw. maximalen Wert dar.

3.2.1 Die Extraktion

Überprüfung der Extraktion ohne Matrix

Die Extraktion mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion basiert auf einer von LEGLER ET AL. (2002) veröffentlichter Methode von estrogen wirksamen Substanzen in Gallenflüssigkeit von Fischen.

Durchführung

Zur Überprüfung, ob diese Extraktionsmethode für die gesuchte Analyte geeignet ist, wurde ein Versuch mit Standardlösungen in Milli-Q-Wasser durchgeführt. Dafür wurden fünfmal 100 µL Milli-Q-Wasser mit einer Standardlösung der gesuchten Analyte (500 ng/mL) versetzt. Anschließend wurden 600 µL Natriumacetatpuffer (100 mM, pH 5 bei 37°C) und 600 µL Milli-Q-Wasser zugegeben, mit Salzsäure angesäuert und dreimalig mit je 2 mL Ethylacetat extrahiert. Diese Extrakte wurden in Schraubdeckelglasvials gesammelt. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Extraktion wurde noch ein viertes Mal extrahiert und die Extrakte gesondert gesammelt. Die Proben wurden jeweils eine Minute mittels Stirrer geschüttelt und anschließend fünf Minuten zentrifugiert. Nach der ersten Extraktion wurden einmalig 500 µL 2-Propanol zugegeben. Diese Zugabe ist später bei Aufarbeitungen mit Gallenproben und Enzymen für die direkte Ausfällung der Proteine. Die gesammelten Extrakte wurden unter Stickstoff eingengt. Nach einer Überführung der Extrakte in

ein kleineres Vial unter dreifachem Nachspülen mit dem verwendeten Lösungsmittel wurden die Extrakte zur Trockene eingengt. Anschließend wurden diese wieder mit 100 µL Methanol/Milli-Q-Wasser (70:30) aufgenommen, in Messvials überführt und vermessen. Die Messung wurde am API3000 vorgenommen. Die Lösungsmittel Methanol und Milli-Q-Wasser für die Gradientenelution waren zur Unterstützung der Ionisierung mit 0.6 mmol Ammoniumacetat und 0.6 mmol Essigsäure versetzt.

Ergebnisse:

Wiederfindungen über das Gesamtverfahren

Bestimmt wurde die Wiederfindungen über das Gesamtverfahren der Substanzen. Diese sind in folgender Abbildung 16 dargestellt.

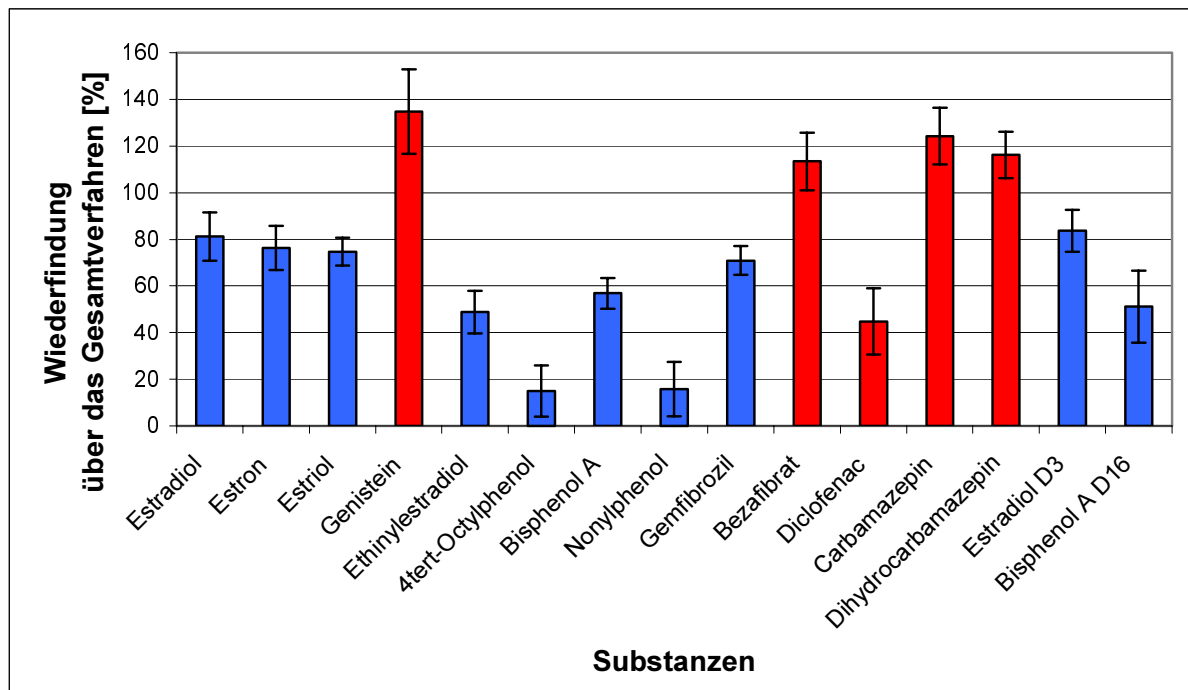


Abbildung 16: Wiederfindung über das Gesamtverfahren der Extraktion mit Ethylacetat (n=5).

Eine Wiederfindung über das Gesamtverfahren konnte für Daidzein nicht berechnet werden und ist somit in Abbildung 15 nicht dargestellt. Die sehr hohen Wiederfindungen von 112–286 % dieser Substanzen wiesen mit einer Standardabweichung von 41 % sehr große Schwankungen auf.

Erkennbar ist, dass alle Substanzen, die im positiven Messmodus des Detektors vermessen wurden (rot dargestellt), mit Ausnahme von Diclofenac eine Wiederfindung von über 100 % aufweisen. Auch Daidzein gehört zu diesen Substanzen (nicht dargestellt). Die Berechnung des Matrixeffektes ergab eine Signalerhöhung dieser Substanzen während der Messung.

Auffällig sind ebenfalls die niedrigen Wiederfindungen der beiden Industriechemikalien Nonylphenol und 4*tert*-Octylphenol. Diese niedrigen Werte sind durch ein zu starkes (bis zur Trockene) und heißes Einengen unter Stickstoff zu erklären, was durch einen nachfolgenden Versuch bestätigt wurde. Dafür wurden sechsmal in je 500 µL Ethylacetat mit 10 µL einer Standardlösung (5 ng/µL) versetzt und unter Stickstoff bei zwei unterschiedlichen Temperaturen eingengt und anschließend vermessen. Die Wiederfindungen über das Gesamtverfahren bei den mit einer Temperatur von 59 °C eingengten Proben lagen für Nonylphenol im Mittel bei 51 % (Stdabw: 4) und für 4*tert*-Octylphenol im Mittel bei 44 % (Stdabw: 6), während die Proben, die bei einer Temperatur von 21°C eingengt worden waren, Wiederfindungen im Mittel von 80 % (Stdabw: 14) für Nonylphenol und 68 % (Stdabw: 13) für 4*tert*-Octylphenol aufwiesen.

Auswertung des 4. Extraktes

Die Vermessung des vierten Extraktes aus dem ersten Versuch zur Überprüfung, ob eine dreimalige Extraktion ausreichend ist, ergab, dass von einem viermaligen Extrahieren Abstand genommen werden kann. In diesem Extrakt mit Ethylacetat waren lediglich drei Substanzen in geringen Mengen zu finden. Diese geringen Mengen deuten auf eine Verschleppung oder auf ein Vorhandensein der Substanzen im Lösungsmittel oder in den Extraktionsmaterialien hin, da sie ebenfalls im Blindwert feststellbar waren und somit nicht aus der Probe stammen. In der folgenden Tabelle 25 sind die festgestellten Konzentrationen aus dem vierten Extrakt sowie aus dem Blindwert aufgeführt.

Tabelle 25: Substanzen im vierten Extrakt (n=5) und dem Blindwert (n=1).

Substanz	4. Extrakt Ethylacetat [ng/µL]	4. Extrakt Blindwert [ng/µL]
Bisphenol A	0.005-0.009	0
Nonylphenol	0.013-0.030	0.037
Estradiol D3	0.001	0.003

Da die Ergebnisse der Wiederfindung über das Extraktionsverfahren einiger Substanzen in diesem Versuch nicht zufrieden stellend waren, wurde die Extraktion im folgenden Versuch wiederholt und zusätzlich ein anderes Lösungsmittels auf seine Geeignetheit für die Extraktion überprüft.

Überprüfung anderer Lösungsmittel

Um eine möglichst hohe Wiederfindungen der Extraktion zu erreichen, wurde überprüft, ob Methyl-*tert*-butylether ein besseres Lösungsmittel für die Extraktion darstellt. In der Literatur sind Studien zu finden, in denen auf dieses Lösungsmittel zur Extraktion von estrogen wirkenden Stoffen aus Gallenflüssigkeit zurückgegriffen wurde (UPMEIER 2001, S. 50; TERNES ET AL. 2004, S. 31).

Durchführung

Für diesen Versuch wurde wie im vorherigen Versuch fünfmal eine Dreifachextraktion mit Ethylacetat vorgenommen. Anschließend wurden diese Proben erneut dreimalig mit je 2 mL Methyl-*tert*-butylether extrahiert. Diese Ether-Extrakte wurden gesondert gesammelt und ebenfalls wie die Ethylacetat-Extrakte mittels HPLC-API3000 vermessen. Die Lösungsmittel Methanol und Wasser für die Gradientenelution waren ebenfalls mit 0.6 mmol Ammoniumacetat und 0.6 mmol Essigsäure versetzt.

Ergebnisse:

Wiederfindung über das Gesamtverfahren

In diesem Versuch wurde zunächst die Wiederfindung über das Gesamtverfahren für alle Substanzen bestimmt.

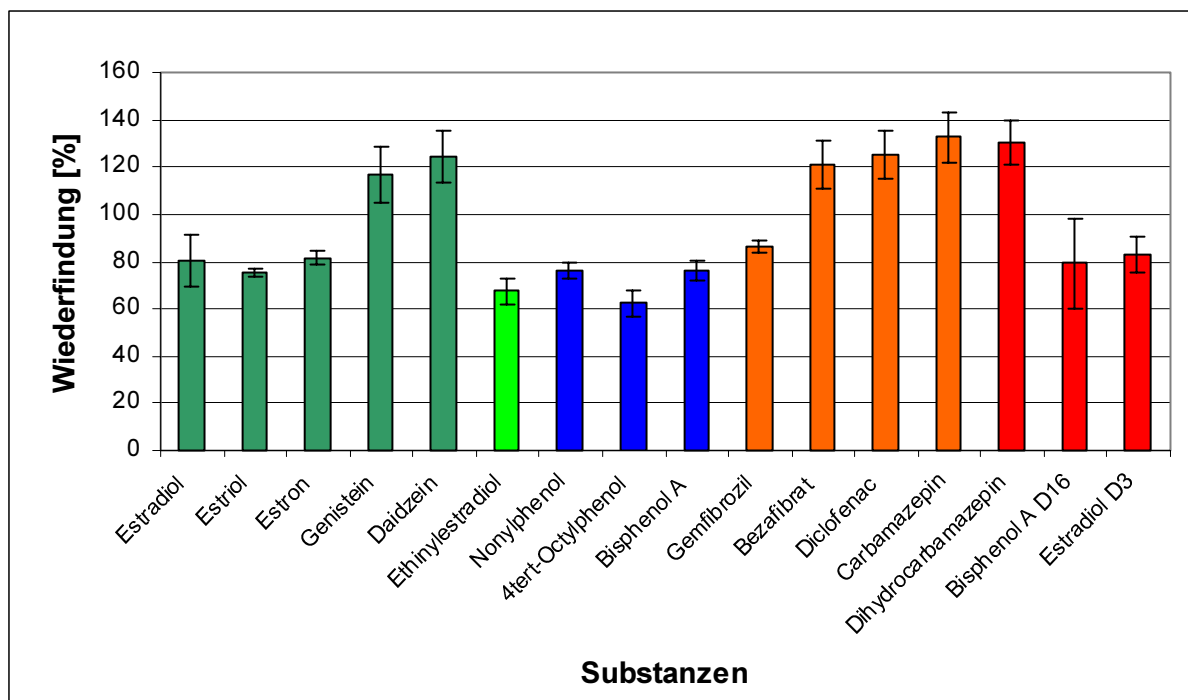


Abbildung 17: Wiederfindung über das Gesamtverfahren der erneuten Extraktion mit Ethylacetat (n=4).

Trotz des gleichen Extraktionsverfahrens wie im ersten Versuch sind die meisten Wiederfindungen gestiegen (Abbildung 17). Sie liegen nun alle über 60 %. Besonders deutlich ist der Anstieg der Wiederfindungen von 17α -Ethinylestradiol, Diclofenac, Nonylphenol und 4*tert*-Octylphenol. Zwar sind die Industriechemikalien auch wieder im unteren Bereich der Wiederfindungen, doch im Vergleich zum ersten Versuch sind die Wiederfindungen von fast 20 % auf ca. 80 % gestiegen. Dieser Anstieg der Wiederfindung kann zum einen an der sanfteren Einengung der Extrakte unter Stickstoff bei nur 37 °C und zum anderen an der sich einstellenden Routine in der Probenaufarbeitung liegen.

Erkennbar sind ebenfalls wie im Versuch zuvor, dass die Phytoestrogene und Pharmaka des positiven Messmodus mit der Wiederfindung wieder oberhalb 100 % liegen.

Auswertung der Methyl-*tert*-butylether-Extrakte

In den Methyl-*tert*-butylether-Extrakten wurden keine nachweisbaren Mengen der Analyte gefunden, was die Vollständigkeit und Geeignetheit der dreimaligen Extraktion mit Ethylacetat bestätigt. Lediglich Estron, Daidzein, Bezafibrat und Genistein wurden in sehr geringen Mengen in den Methyl-*tert*-butylether-Extrakten nachgewiesen, welche in folgender Tabelle aufgeführt sind.

Tabelle 26: Wiederfindung in den Methyl-*tert*-butylether-Extrakten (n=4).

Substanz	Wiederfindung [%]
Estron	0-7.3
Daidzein	0.7-0.8
Genistein	0.2-0.3
Bezafibrat	1.2-1.7

Die Tabelle 26 stellt den Bereich der Wiederfindung über das Gesamtverfahren der fünffach bestimmten Substanzen dar. Durch die Extraktion mit Methyl-*tert*-butylether wäre die Wiederfindung nicht nennenswert höher, so dass ein Wechsel zur Extraktion mittels Methyl-*tert*-butylether nicht notwendig ist.

3.2.2 Das Clean-up

Überprüfung des Clean-up-Verfahrens und der benötigten Elutionsmenge ohne Matrix

Um die Gallenproben weitestgehend von der Matrix zu befreien, ist als Reinigungsschritt ein Clean-up notwendig. Das in dieser Arbeit angewendete Clean-up mittels Kieselgel wurde von Iris-C. Beck im Rahmen ihrer geplanten Dissertation erarbeitet

und zur Verfügung gestellt. Auch TERNES ET AL. (2004, S. 31) verwenden bei Untersuchungen von Estrogenen in Aalgallen eine mit ausgeheiztem Kieselgel gefüllte Säule. In diesem Versuch wurde nun konkret die benötigte Elutionsmenge erprobt.

Durchführung:

Zur Überprüfung des Clean-up-Verfahrens wurden 100 µL einer Standardlösung mit den gesuchten Substanzen (2ng/µL) mit 400 µL Dichlormethan aufgenommen. Für das Clean-up wurden je 3 g ausgeheiztes Kieselgel in acht Glassäulen gefüllt. Konditioniert wurde dieses Material mit je ca. 10 mL eines Lösungsmittelgemisches bestehend aus 90 % Dichlormethan und 10 % Methanol. Es folgt die Zugabe einer Standardlösung auf das konditionierte Kieselgel. Nachdem diese Standardlösung in das Kieselgel gesickert, aber noch bevor Luft an das Säulenmaterial gekommen war, wurde je nach Säule mit einem Dichlormethan-Methanol-Gemisch im Verhältnis 90:10 und anschließend mit dem gleichen Lösungsmittel allerdings im Verhältnis 80:20 eluiert.

Die Lösungsmittelmenge variierte bei jeder Säule (Säule 1–4), wobei aber immer zwei Säulen (1 und 1a usw.) mit der gleichen Menge eluiert wurden.

Säule 1 und 1a: je 5 mL,

Säule 2 und 2a: je 6 mL,

Säule 3 und 3a: je 7 mL,

Säule 4 und 4a: je 8 mL.

Die Eluate wurden getrennt nach Säule und Lösungsmittelverhältnis in einzelne Spitzkolben aufgefangen und am Rotationsverdampfer vorsichtig auf ca. 1 mL eingengt. Die Überführung des Eluats in ein kleines Gefäß zur weiteren Eindampfung unter Stickstoff erfolgte unter dreimaligem Spülen mit Methanol. Nach dem Einengen wurde der Extrakt mit Methanol aufgenommen und die Gefäße für eine Minute in ein Ultraschallbad getaucht, um möglichst viele Substanzen, die eventuell an der Glaswand des Gefäßes haften, wieder in Lösung zu bringen.

Die Messung wurde ebenfalls am HPLC-API3000 vorgenommen. Die Laufmittel Methanol und Wasser für die Gradientenelution waren je mit 0.6 mmol Ammoniumacetat versetzt.

Ergebnisse:

Wiederfindung über das Gesamtverfahren

Es wurde für die Substanzen aus der Gesamtelution die Wiederfindung über das Gesamtverfahren ermittelt. Die folgenden zwei Abbildungen 18 und 19 zeigen die Ergebnisse.

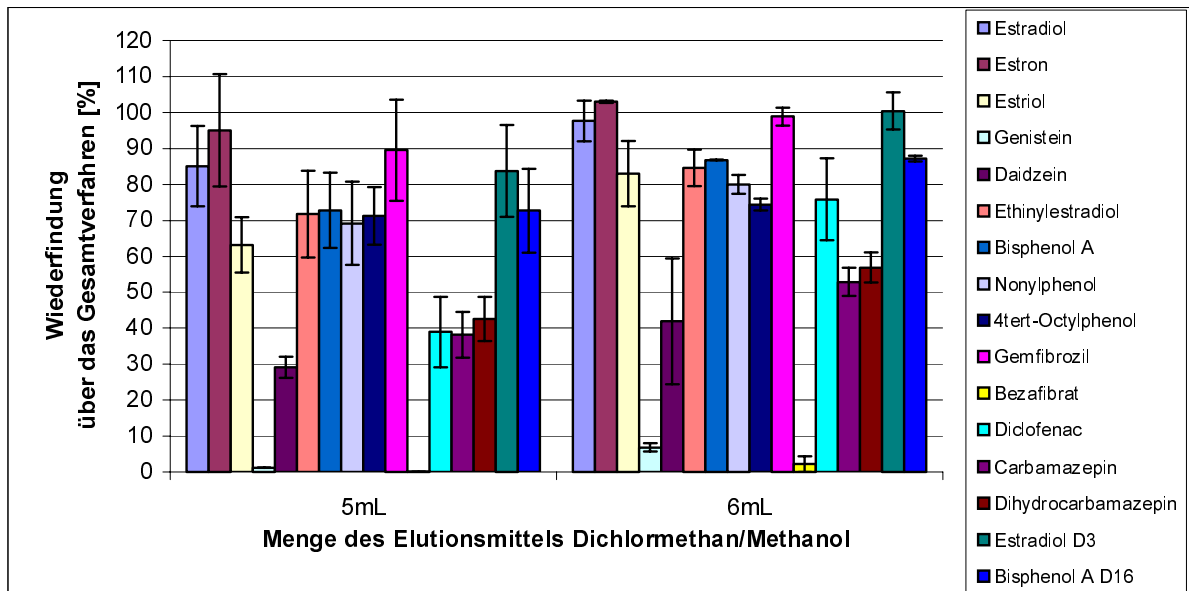


Abbildung 18: Wiederfindungen über das Gesamtverfahren der Überprüfung mit je 5 und 6 mL Elutionsmittel (n=2).

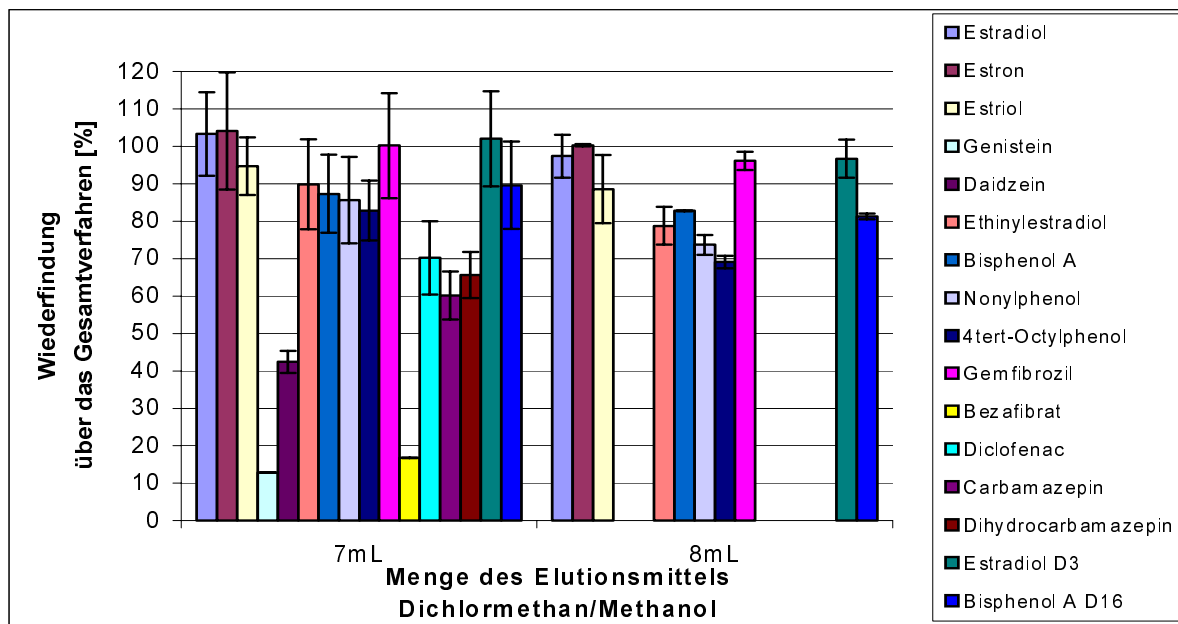


Abbildung 19: Wiederfindungen über das Gesamtverfahren der Überprüfung mit je 7 und 8 mL Elutionsmittel (n=2).

Durch ein Problem mit dem Messgerät konnten für den Test mit der Elutionsmenge 8 mL einige Substanzen nicht gemessen werden. Diese im positiven Messmodus gemessenen Substanzen sind: Genistein, Daidzein, Bezafibrat, Diclofenac, Carbamazepin und der interne Standard Dihydrocarbamazepin. Sie sind folglich auf obiger Abbildung bei der 8-mL-Fraktion nicht dargestellt.

Die Wiederfindungen der natürlichen Estrogene und 17α -Ethinylestradiol steigen mit der verwendeten Elutionsmenge an. Allerdings ist ein Anstieg ab 7mL Elutionsmittel nicht mehr festzustellen. Für diese Substanzen ist folglich eine Elutionsmenge von je 7 mL ausreichend.

Die Industriechemikalien zeigen dagegen nur geringe Schwankungen. Die höchsten Wiederfindungen sind bei der Elution mit je 6 mL festzustellen. Auf diese Substanzen hat die Menge an Elutionsmittel keinen großen Einfluss.

Auffällig verhalten sich die Substanzen Bezafibrat und Genistein. Diese sind erst ab einer Elutionsmenge von 7 mL mit ca. 18 bzw. 10 % zu finden. Dieser Schritt in der Aufarbeitung scheint einen nicht unbedeutenden Verlust darzustellen. Ebenfalls ergaben die Messungen der einzelnen Fraktionen, dass Bezafibrat und Genistein erst beim Eluieren mit dem zweiten Lösungsmittelgemisch (DCM/MeOH (80:20)) die Kieselgelsäule verlassen. Diese Substanzen benötigen also eine ausreichende Menge eines polaren Lösungsmittelgemisches zur Elution.

Die Ergebnisse zeigen, dass je mehr Elutionsmittel genommen wird, desto größer auch die Wiederfindung ist. Da aber bei der Elution für die gemessenen Substanzen kein signifikanter Anstieg der Wiederfindung festzustellen ist und davon auszugehen ist, dass auch mit dem Anstieg der Elutionsmenge mehr Matrix wieder aus dem Kieselgel gewaschen wird, wurden für folgende Versuche 7 mL Elutionsmittel pro Lösungsmittelgemisch verwendet.

3.2.3 Die Kopplung der Verfahrensschritte

Überprüfung der Wiederfindung der kompletten Aufarbeitung ohne Matrix

Im Folgenden sollte die Wiederfindung aller Aufarbeitungsschritte bestimmt werden. Für diese Versuchsreihe wurden die einzelnen Verfahrensschritte sowohl getrennt als auch gekoppelt durchgeführt. Verwendet wurde dabei als Probe mit einer Standardlösung versetztes Milli-Q-Wasser.

Durchführung:

Wie schon im ersten Versuch wurde für die beiden Extraktionen (Einzelextraktion und Kombination) sechsmal Milli-Q-Wasser mit Standardlösung (5 μ L eines 5 ng/ μ L

Standards) versetzt und dreimal mit je 2 mL Ethylacetat extrahiert. Die gesammelten Extrakte wurden wiederum unter Stickstoff bei 37 °C eingeengt.

Der Extrakt für die Überprüfung der Kombination wurde zur Vorbereitung auf das Clean-up mit 500 µL eines Lösungsmittelgemisches bestehend aus 80 % Dichlormethan und 20 % Methanol aufgenommen.

Zur Überprüfung des reinen Clean-ups wurde zu 400 µL 90 µL Methanol und zwei mal 5 µL Standardlösung (interner Standard und Arbeitsstandard) gegeben, so dass ebenfalls ein Lösungsmittelverhältnis von 80:20 Dichlormethan/Methanol besteht.

Für das Clean-up, sowohl des Einzel-Clean-ups als auch für die Kombination, wurden nun je 3 g ausgeheiztes Kieselgel in sechs Glassäulen gefüllt. Konditioniert wurde dieses Material mit je ca. 10 mL eines Lösungsmittelgemisches bestehend aus 90 % Dichlormethan und 10 % Methanol. Eluiert wurde mit je 7 ml Dichlormethan/Methanol 90:10 und Dichlormethan/Methanol 80:20.

Alle Extrakte sowohl von der Extraktion, des Clean-ups als auch der Kombination aus Extraktion und Clean-up wurden am HPLC-API4000 gemessen. Der Wechsel vom Detektor API3000 zum API4000 wurde aufgrund der höheren Empfindlichkeit des API4000 gegenüber den Estrogen vorgenommen. Die instrumentellen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen beider Detektoren ist dem Kapitel 3.1.5 und dem Anhang 8.3.1 zu entnehmen. Für diese Messung wurde eine 1.2 mmolare Ammoniumacetat-Methanollösung als Ionisierungsmittel verwendet, die kurz vor dem Interface extern zugegeben wurde.

Ergebnisse:

Wiederfindung über das Gesamtverfahren

Die Bestimmung der Wiederfindungen über das Gesamtverfahren der drei Versuchsbestandteile wurde für jede Substanz ermittelt und ist in der folgenden Abbildung 19 graphisch dargestellt.

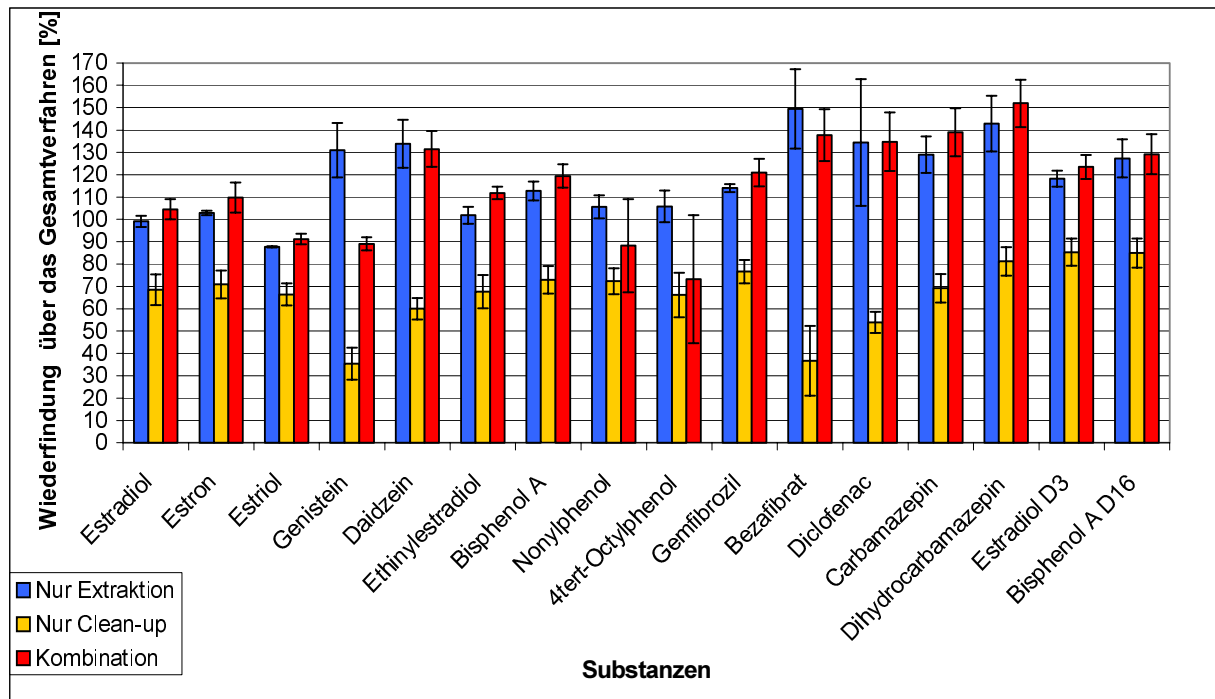


Abbildung 20: Wiederfindung über das Gesamtverfahren der Versuchsreihe Extraktion, Clean-up und der Kombination (n=3; Kombination: n=2).

Die größten Verluste der Substanzen, der Abbildung 20 zu entnehmen, entstehen beim Clean-up (gelb). Hier liegen die Wiederfindungen nur bei ca. 40–80 %, während die reine Extraktion (blau) Wiederfindungen je nach Substanz von mindestens 85 % aufweist. Ähnlich hoch sind auch die Wiederfindungen der Extraktion gekoppelt mit dem Clean-up (rot). Hier ist die niedrigste Wiederfindung bei 80 % von 4*tert*-Octylphenol zu finden.

Auch in diesem Versuch deutlich zu sehen, stellt das Clean-up für Genistein und Bezafibrat einen großen Verlust dar. Für Genistein konnte beispielsweise in der Extraktion eine Wiederfindung von >100 %, im Clean-up dagegen von 35 % festgestellt werden.

Die überhöhten Werte der Wiederfindung von Diclofenac sind auf eine schlechte Peakform in den Messungen zurückzuführen. Eine Erklärung dafür kann der Verzicht auf Essigsäure in Laufmittel sein.

3.2.4 Überprüfung der Methode mit Matrix

Im Folgenden sollte die Übertragbarkeit der Methode auf Gallenproben überprüft werden. Dafür wurden der Matrixeffekt und die Wiederfindungen der Aufarbeitung bestimmt.

Wiederfindung und Matrixeffekte in Gallenflüssigkeiten

Um die wichtigen Gallenproben der Aalmutter für Vorversuche nicht aufzubrechen wurde hier zunächst mit Gallenflüssigkeiten von Flundern gearbeitet.

Durchführung:

Für die Aufarbeitung wurden je 100 μL Gallenflüssigkeit in sechs Zentrifugengläser gegeben. Zu diesen Aliquoten kamen je 5 μL Standardlösung (5ng/ μL), was einer Konzentration von 0.25 ng/ μL Galle entspricht. In zwei weitere Zentrifugengläser wurden einmal 80 μL Gallenaliquot und in das zweite 100 μL Milli-Q-Wasser, das zuvor in einem sauberen Probengefäß der Gallenproben gelagert wurde, gegeben. Das Milli-Q-Wasser dient als Blindwert für diese Aufarbeitung. Zu allen sieben Aliquoten und den Blindwert kamen ebenfalls jeweils 5 μL Standardlösung mit internen Standards (5 ng/ μL). Anschließend, nach Zugabe von je 600 μL Natriumacetatpuffer und Milli-Q-Wasser, kamen 100 μL einer β -Glucuronidase in Natriumacetatpuffer (400 unit/mL) hinzu. Die Inkubation im Schüttelinkubator erfolgte über Nacht (18 Stunden) bei 37 °C und leichtem Schütteln.

Die anschließende Extraktion erfolgte wie schon in den vorherigen Versuchen dreimalig mittels Ethylacetat. Nach dem ersten Zentrifugieren wurden 500 μL 2-Propanol zum Ausfällen der Proteine zugegeben und nochmals kurz geschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde die organische Phase abpipettiert und in Schraubdeckelglasvials gesammelt. Zwei weitere Male erfolgte eine Extraktion mit je 2 mL Ethylacetat. Nach dem anschließenden Clean-up wurden alle Extrakte mittels HPLC-API4000 und 2.5 mmolarer Ammoniumacetatkonzentration im Laufmittel Methanol und Milli-Q-Wasser vermessen.

Ergebnisse:

Matrixeffekte

Zunächst erfolgte die Bestimmung des Einflusses der Probenmatrix auf die Messung der Substanzen. Die folgende Abbildung zeigt diese Matrixeffekte für die jeweilige Substanz.

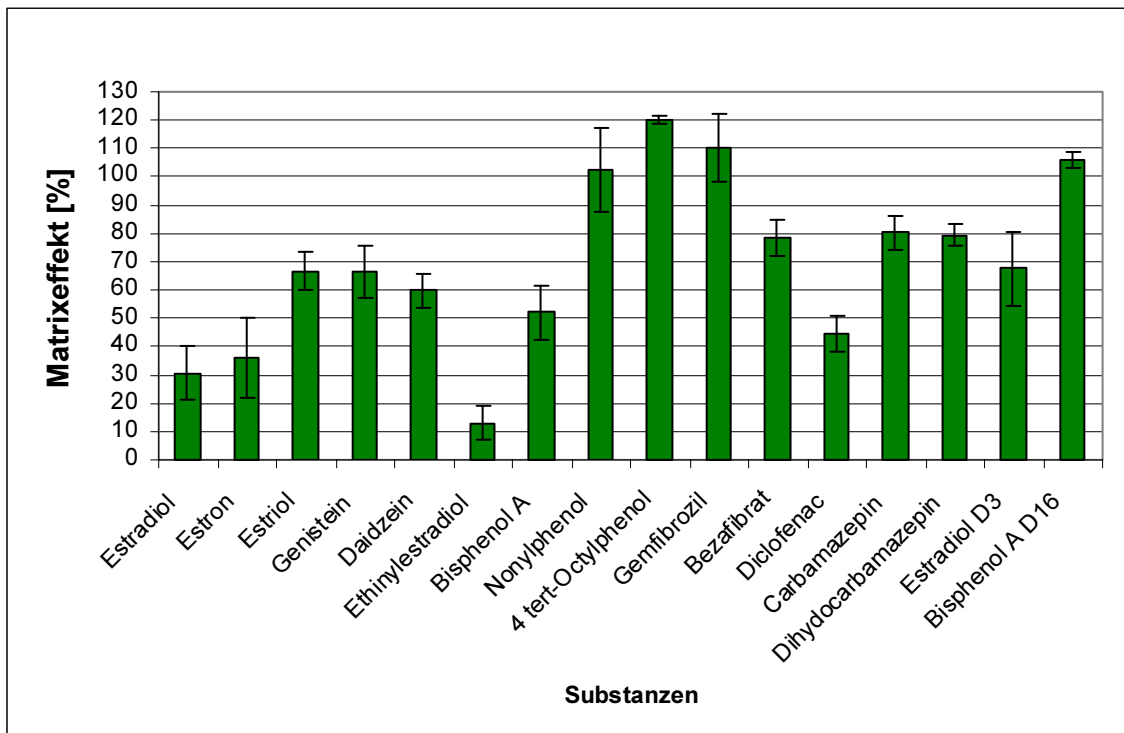


Abbildung 21: Matrixeffekte bei der Messung von Flundergalle (n=5; 4*tert*-Octylphenol n=4).

In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass das 17 α -Ethinylestradiol sehr matrixempfindlich ist. Das bedeutet, dass eine starke Signalsuppression vorliegt. Bei Nonylphenol, 4*tert*-Octylphenol und Gemfibrozil dagegen liegt der Matrixeffekt über 100 %. Das weist auf eine Signalverstärkung durch die Matrix hin. Beides, sowohl die Suppression als auch die Verstärkung des Messsignals wird bei der Wiederfindung der Aufarbeitung berücksichtigt. Im ersten Fall kommt es zu einer Erhöhung, im zweiten Fall zu einer entsprechenden Erniedrigung der Wiederfindung.

Wiederfindung der Aufarbeitung

Die folgende Graphik 22 zeigt die Wiederfindung der Aufarbeitung.

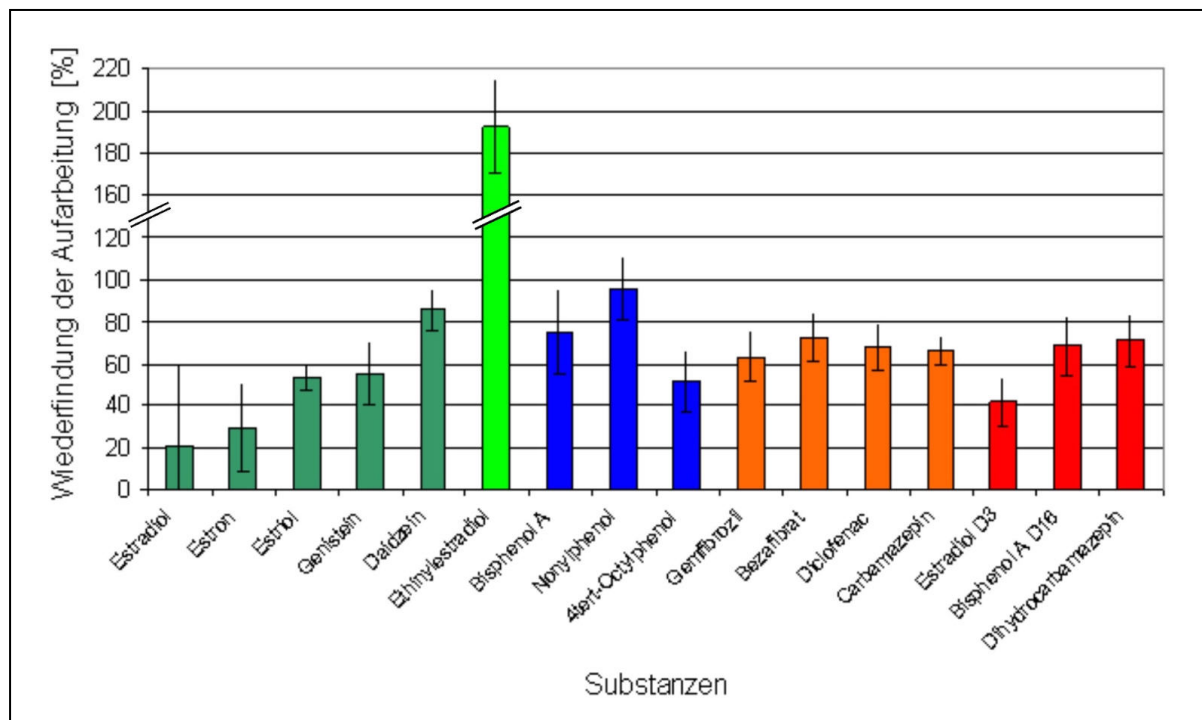


Abbildung 22: Wiederfindung der Aufarbeitung von Flundergallen (n=5; Nonylphenol und 17 α -Ethinylestradiol n=4).

Alle Wiederfindungen der Aufarbeitung, in Abbildung 22 dargestellt, mit Ausnahme von 17 β -Estradiol und Estron liegen über 40 %.

17 α -Ethinylestradiol dagegen ist mit 192 % auffällig hoch. Dies lässt sich durch den sehr geringen Matrixeffekt erklären. Da es bei der Messung von 17 α -Ethinylestradiol in Gallenflüssigkeit zu einer großen Signalsuppression kommt und damit die Konzentration in die Nähe der Bestimmungsgrenze liegt, ergeben sich daraus Messungenauigkeiten. Da aber die Signalsuppression einen großen Einfluss auf die Wiederfindung der Aufarbeitung hat, kann es zu solch einem erhöhten Wert kommen. Kritisch an der Auswertung ist, dass die undotierte Gallenflüssigkeit aufgrund des Probenmangels nur einmal aufgearbeitet werden konnte. Es konnte daher keine Bestätigung der gefundenen Realkonzentrationen gegeben werden.

Überprüfung geringer dotierte Gallenflüssigkeiten

In folgenden Versuch wurde eine Dotierung gewählt, die der zu erwartenden Realkonzentration in Gallenflüssigkeiten entspricht.

Zur Überprüfung der Wiederfindungsraten der Aufarbeitung erfolgte die gleiche Aufarbeitung wie zuvor, wobei aber die Gallenaliquote mit nur 10 μL einer Standardlösung mit einer Konzentration von 0.5 ng/ μL dotiert wurden. Dies entspricht einer Konzentration von ca. 0,05 ng/ μL Galle. Diese Dotierungskonzentration ergab sich aus der Realkonzentration des vorherigen Versuchs unter Einbeziehung eines theoretischen Matrixeffekts von 10 %. Dieser Matrixeffekt wurde sich in der letzten Aufarbeitung für 17 α -Ethinylestradiol bestimmt und wurde als größtmöglich eintretende Signalsuppression ausgewählt.

Durchführung:

Die Aufarbeitung und Messung erfolgte wie im vorherigen Versuch beschrieben. Allerdings konnte nur eine dreifache Wiederholung dieses Experimentes vorgenommen werden, da nicht genügend Probenmaterial zur Verfügung stand. Zudem konnte bei einer Wiederholung nur 68 μL statt 100 μL Probemenge verwendet werden, welches große Auswirkungen auf den Matrixeffekt dieser Wiederholung hat.

Ergebnisse:

Für alle Substanzen mit Ausnahme von Nonylphenol und Bisphenol A konnte lediglich die Wiederfindung über das Gesamtverfahren bestimmt werden. Der Matrixeffekt und somit auch die Wiederfindungen der Aufarbeitung konnten dagegen nicht bestimmt werden.

Wiederfindung über das Gesamtverfahren

Die folgende Abbildung 23 gibt alle bestimmbaren Wiederfindungen über das Gesamtverfahren wieder.

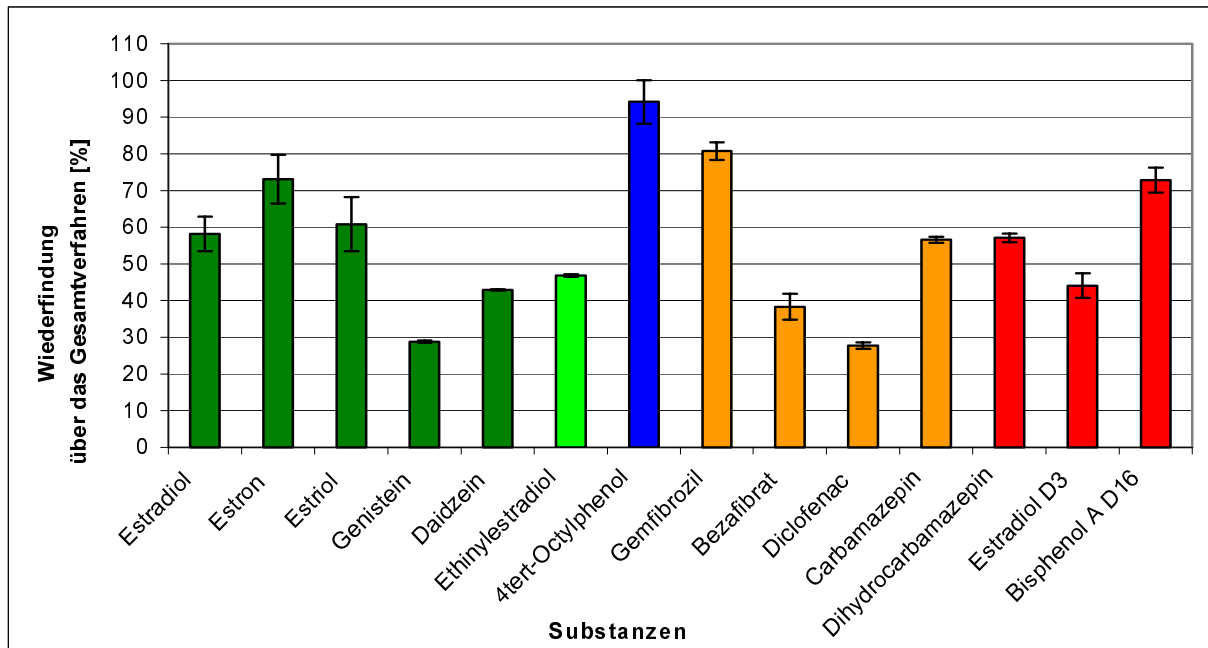


Abbildung 23: Wiederfindung über das Gesamtverfahren aller bestimmbaren Substanzen aus Flundergalle (n=2).

Für die Substanzen Nonylphenol und Bisphenol A konnte die Wiederfindung über das Gesamtverfahren nicht bestimmt werden. Durch die hohen Realkonzentrationen in den Gallenproben und der im Verhältnis dazu zu geringen Dotierungskonzentration konnte für diese Substanzen keine korrekte Berechnung vorgenommen werden. Beispielsweise lagen für die Substanzen Nonylphenol und Bisphenol A bereits Konzentrationen von 0.29 ng/μL bzw. 0.08 ng/μL in der Gallenflüssigkeit vor. Bei einer Dotierung von nur 0.05 ng/μL ist folglich eine Bestimmung der Wiederfindung über das Gesamtverfahren und des Matrixeffekts nicht möglich gewesen. Die geringe Dotierungskonzentration lag im Bereich der Messungengenauigkeit. Eine weitere Erklärung der schwankenden Ergebnisse kann auch die Ungenauigkeit durch eine einfache Bestimmung der Realkonzentration und einer dotierten Probe mit geringer Probemenge sein.

Es kam bei der Bestimmung des Matrixeffektes für die Substanzen zu Ungenauigkeiten, weil die Dotierungskonzentration in der Nähe der Bestimmungsgrenze lag, so dass eine Berechnung zur Wiederfindung der Aufarbeitung auch nicht möglich war.

Erneute Überprüfung der Wiederfindung aus Flundergalle

Da der letzte Versuch aufgrund der hohen Realkonzentrationen keine zufriedenstellenden Ergebnisse geliefert hat, wird erneut die Wiederfindung der Aufarbeitung

aus Flundergalle bestimmt. Dafür wurde die Dotierungskonzentration gegenüber dem vorherigen Versuch verdoppelt.

Durchführung:

Es wurde mit einer Konzentration von 0.1 ng/ μ L Galle gearbeitet. Die Bestimmung sowohl der undotierten als auch der dotierten Proben erfolgte in einer dreifachen Wiederholung. Die Aufarbeitung und Vermessung der Proben fand wie in den letzten beiden Aufarbeitungen beschrieben statt. Die Ausnahme bilden dabei lediglich die Enzymmenge und Dotierungsmenge mit Standardlösungen. In dieser Aufarbeitung wurden 150 μ L Enzymlösung verwendet. Diese Änderung wurde aufgrund einer parallel durchgeführten Überprüfung der Deglucuronidation der Enzyme vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Überprüfung sind in Kapitel 3.2.5 zu finden. Die Konzentrationen in den undotierten Aliquoten wurden durch eine dreifache Wiederholung bestimmt.

Ergebnisse:

Matrixeffekte

In diesem Versuch konnte für alle Substanzen der Matrixeffekt bestimmt werden. Die folgende Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse.

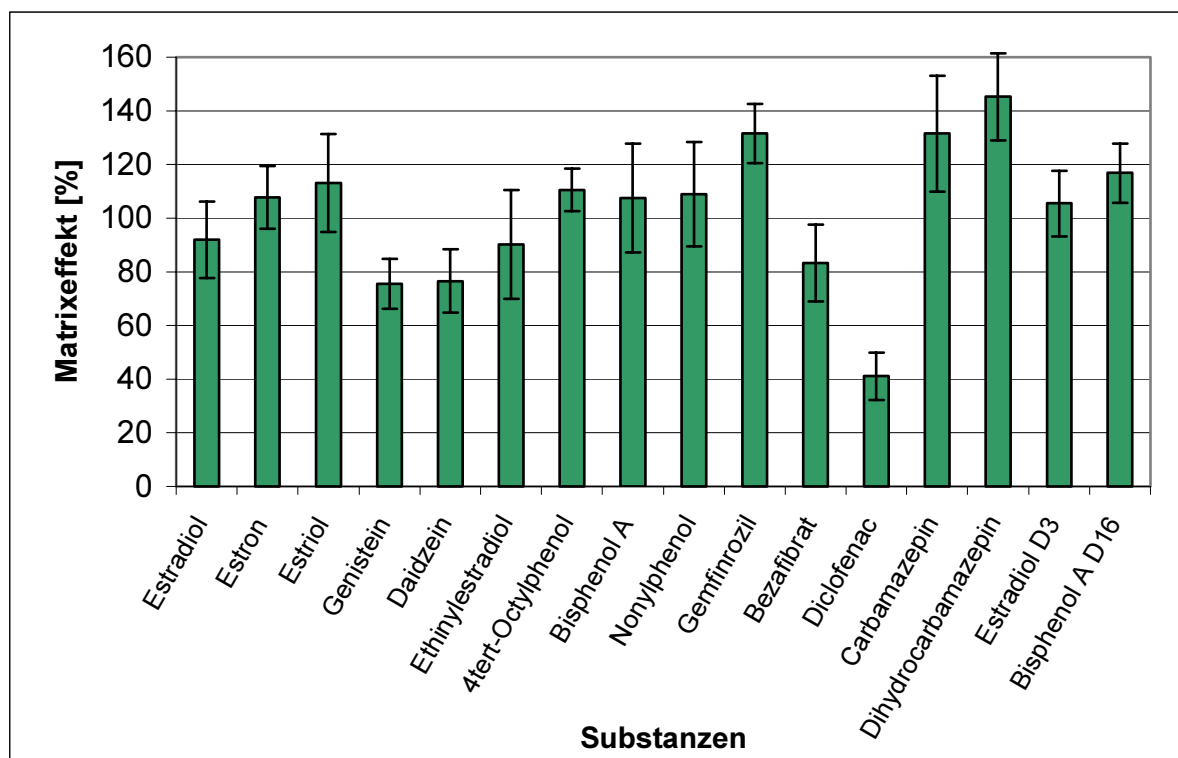


Abbildung 24: Matrixeffekte bei der Messung von Flundergalle (n=6; Bisphenol A D16 und Dihydrocarbamazepin: n=5).

Wie der Abbildung 24 zu entnehmen ist, weisen zwei der natürlichen Estrogene einen Matrixeffekt über 100 % auf. Die Messsignale dieser Substanzen (Estron und Estriol) werden bei der Messung durch die Matrix verstärkt. Dagegen liegen Matrixeffekte von 17β -Estradiol und den Phytoestrogenen bei 75–90 %. Die Messsignale der Industriechemikalien weisen ebenfalls alle eine Signalerhöhung auf. Von den Pharmaka zeigt der Matrixeffekt von Diclofenac den geringsten Wert mit 40% auf.

Wiederfindung der Aufarbeitung

In diesem Versuch konnte für alle Substanzen die Wiederfindung der Aufarbeitung bestimmt werden. Dargestellt sind die Ergebnisse in folgender Graphik 25.

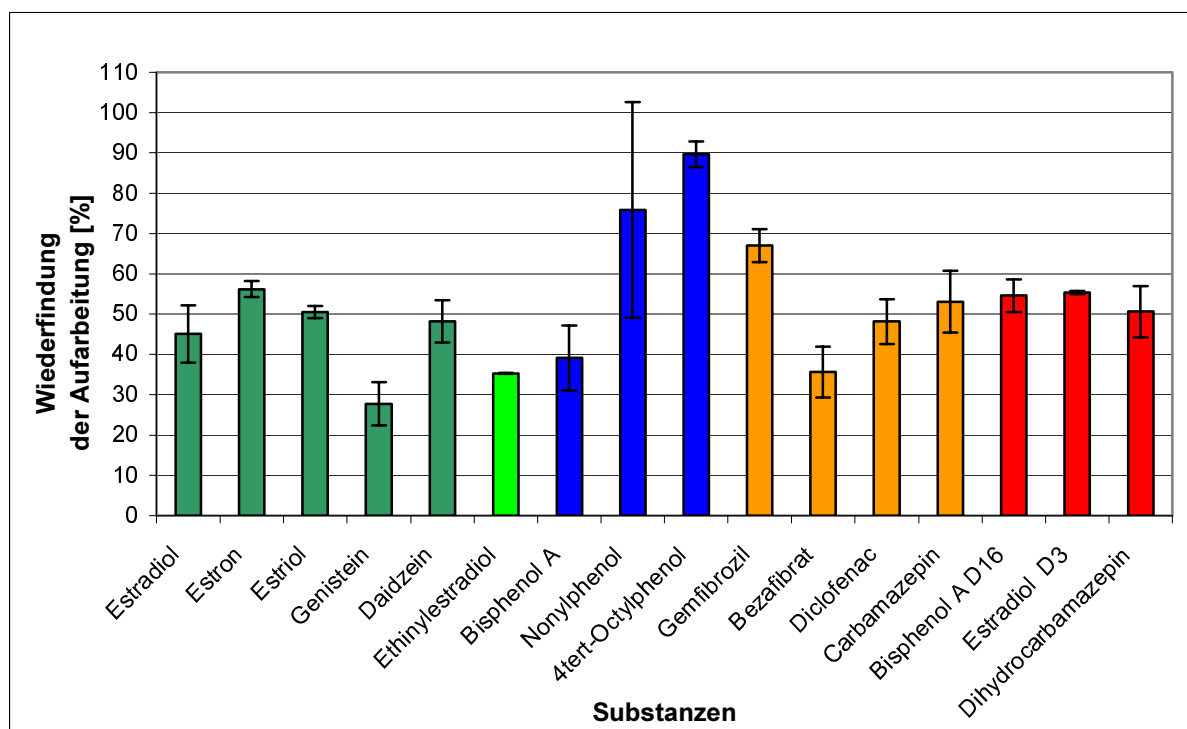


Abbildung 25: Wiederfindung der Aufarbeitung aus Flundergalle (n=2).

Die natürlichen Estrogene 17β -Estradiol und Estron weisen eine bessere Wiederfindung der Aufarbeitung im Vergleich zum ersten Versuch mit Flundergalle auf. Diese stiegen von zuvor 20 % bzw. 30 % auf 45 % bzw. 55 % an. Für die Phytoestrogene und Estriol allerdings ist die Wiederfindung in diesem Versuch auch geringer als in der ersten Aufarbeitung der Flundergalle.

Gegensätzlich verhält es sich mit den Industriechemikalien Nonylphenol und Bisphenol A. Im Gegensatz zur ersten Aufarbeitung von Flundergalle ist die Wiederfindung von Bisphenol A nur halb so hoch wie im Versuch zuvor. Auch von Nonylphenol konnte 25 % weniger bestimmt werden. Nur die Wiederfindung von 4tert-Octylphenol konnte hier mit einer 40 % höherer Wert bestimmt werden. Die

Wiederfindungen der Aufarbeitung der Pharmaka beim ersten Versuch mit Flundergalle lagen noch alle über 60 %; in diesem Versuch konnten hier lediglich für Gemfibrozil eine Wiederfindung über 60 % festgestellt werden.

Die geringeren Wiederfindungen können durch die Verwendung einer geringeren Dotierungskonzentration im Vergleich zu dem ersten Versuch erklärt werden. Zuvor wurde mit einer Konzentration von 0.25 ng/μL Galle, hier aber nur mit 0.1 ng/μL Galle gearbeitet. Durch die Signalsuppression bei der Messung ergeben sich Ungenauigkeiten, deren Einfluss bei niedrigen Konzentrationen größer ist, als bei höheren Konzentrationen.

Wiederfindung in Aalmuttergallen

In diesem Versuch wurde die Übertragbarkeit der Methode von Flundergallen auf Aalmuttergallen geprüft. Zudem sollen die Wiederfindungen über das Gesamtverfahren aller untersuchten Analyte aus Aalmuttergalle bestimmt werden, um die Messwerte der später untersuchten Realproben entsprechend interpretieren zu können.

Durchführung:

Die Überprüfung der Wiederfindungen und des Matrixeffektes fand an acht Aalmutterproben von weiblichen Fischen, bei denen keine Missbildungen festgestellt werden konnten, statt. Diese acht Proben wurden vereint, gemischt und in sieben Aliquote geteilt.

Für diese Überprüfung wurde die Aufarbeitung des vorherigen Versuchs gewählt. Auch hier wurde mit einer Dotierungskonzentration von 0.1 ng/μL in 100 μL Galle gearbeitet. Aufgrund der geringen Probemenge wurden die undotierten Aliquote nur zweifach bestimmt. Dotiert wurden dagegen fünf Aliquote, wobei ein Aliquot nur aus 80 μL statt 100 μL Probe bestand.

Ergebnisse:

Die Wiederfindung über das Gesamtverfahren und die Wiederfindung der Aufarbeitung dieses Versuchs wurden für die Berechnungen der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in Realproben verwendet und sind in Form einer Tabelle in Kapitel 4.2.2 aufgeführt. Der Vollständigkeit halber werden hier beide Wiederfindungen und die Matrixeffekte graphisch dargestellt.

Die Wiederfindung über das Gesamtverfahren, die Wiederfindung der Aufarbeitung und der Matrixeffekt können für alle Substanzen mit Ausnahme von 17β-Estradiol, Bisphenol A und Nonylphenol angegeben werden. Für diese drei Substanzen sind die Messwerte nicht auswertbar. Da die Realkonzentration in der Gallenflüssigkeit

teilweise die Dotierungskonzentration überstieg und die Signalsuppression somit zu groß war, ergaben sich durch die geringe Konzentration nahe der Bestimmungsgrenze große Ungenauigkeiten.

Die folgende Tabelle 27 zeigt zunächst die gefundenen Konzentrationen der Substanzen ohne Berücksichtigung des Matrixeffektes und der Wiederfindung über das Gesamtverfahren. Dabei sind die Werte für Bisphenol A und Nonylphenol (kursiv) keine exakten Angaben, da die Konzentrationen außerhalb des Kalibrierbereichs liegen.

Tabelle 27: Substanzen in undotierter Aalmuttergalle.

Substanz	Probe 1 [ng/μL]	Probe 2 [ng/μL]
17β-Estradiol	0.1310	0.1310
Estron	0.0268	0.0311
Estriol	0.0203	0.0254
4tert-Octylphenol	0.0267	0.0287
Bisphenol A	<i>1.1300</i>	<i>1.2300</i>
Nonylphenol	<i>3.5800</i>	<i>4.2800</i>

Die Phytoestrogene, Pharmaka sowie 17α-Ethinylestradiol konnten in der undotierten Probe nicht nachgewiesen werden.

Auch lagen Konzentrationen für die beiden Industriechemikalien außerhalb des Kalibrierbereichs und können somit nicht exakt bestimmt werden. Der Kalibrierbereich lag je nach Substanz bei 0- ca. 0.25 ng/μL und die Dotierung für Bisphenol A und Nonylphenol bei 0.06 ng/μL bzw. 0.22 ng/μL. Im Vergleich zur Realkonzentration in der Flundergalle waren die Konzentrationen der beiden Industriechemikalien in der Aalmutter wesentlich höher. Im letzten Versuch mit Flundergalle wurde für Bisphenol A eine Realkonzentration im Mittel von 0.083 ng/μL und für Nonylphenol von 0,290 ng/μL festgestellt. Dagegen weist die Aalmuttergalle Konzentrationen für Bisphenol A von ca. 1.178 ng/μL und für Nonylphenol von ca. 3.9 ng/μL auf. Eine mögliche Erklärung für diesen Konzentrationsunterschied kann die geringere Menge an Gallenflüssigkeit in Aalmuttern im Gegensatz zu Flundern sein. Die den Aalmutter entnommen Mengen an Gallenflüssigkeiten lagen ungefähr zwischen 30 und 150 μL pro Galle. Die Gallenproben der Flundern wiesen dagegen bis zu 1 mL auf. Durch die geringere Menge an Gallenflüssigkeiten in den Aalmuttern liegen die Substanzen wahrscheinlich konzentrierter vor.

Wiederfindung über das Gesamtverfahren

Die folgende Abbildung 26 stellt die Wiederfindung über das Gesamtverfahren aller bestimmbarer Substanzen dar.

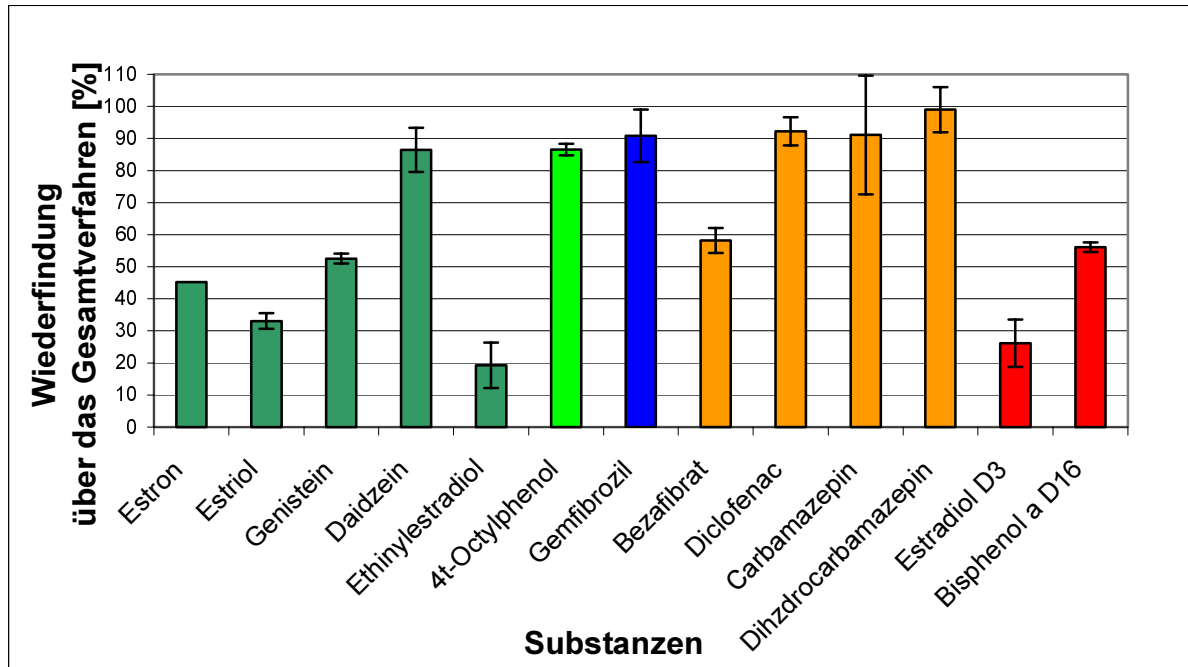


Abbildung 26: Wiederfindungen über das Gesamtverfahren aus Aalmuttergalle (n=3).

Die natürlichen Estrogene in Abbildung 26 zeigen gute Wiederfindungen im Bereich von ca. 35–87 %. Ebenso weisen die Pharmaka eine hohe Wiederfindung auf. Gemfibrozil im negativen Messmodus gemessen hat sogar eine der höchsten Wiederfindungen. 17 α -Ethinylestradiol wies die geringste Wiederfindung von 19 % auf.

Da in diesem Versuch die Wiederfindungen für 17 β -Estradiol, Nonylphenol und Bisphenol A nicht bestimmt werden konnten, wurde eine erneute Bestimmung mit höherer Konzentration für diese Substanzen durchgeführt. Die Wiederfindungen über das Gesamtverfahren lagen für 17 β -Estradiol bei 37 %, für Nonylphenol bei 38 % und für Bisphenol A bei 19 %.

Matrixeffekte

Die Bestimmung des Matrixeffekts erfolgte ebenfalls für alle Substanzen mit Ausnahme dieser beiden Industriechemikalien und 17 β -Estradiol aus den oben genannten Gründen.

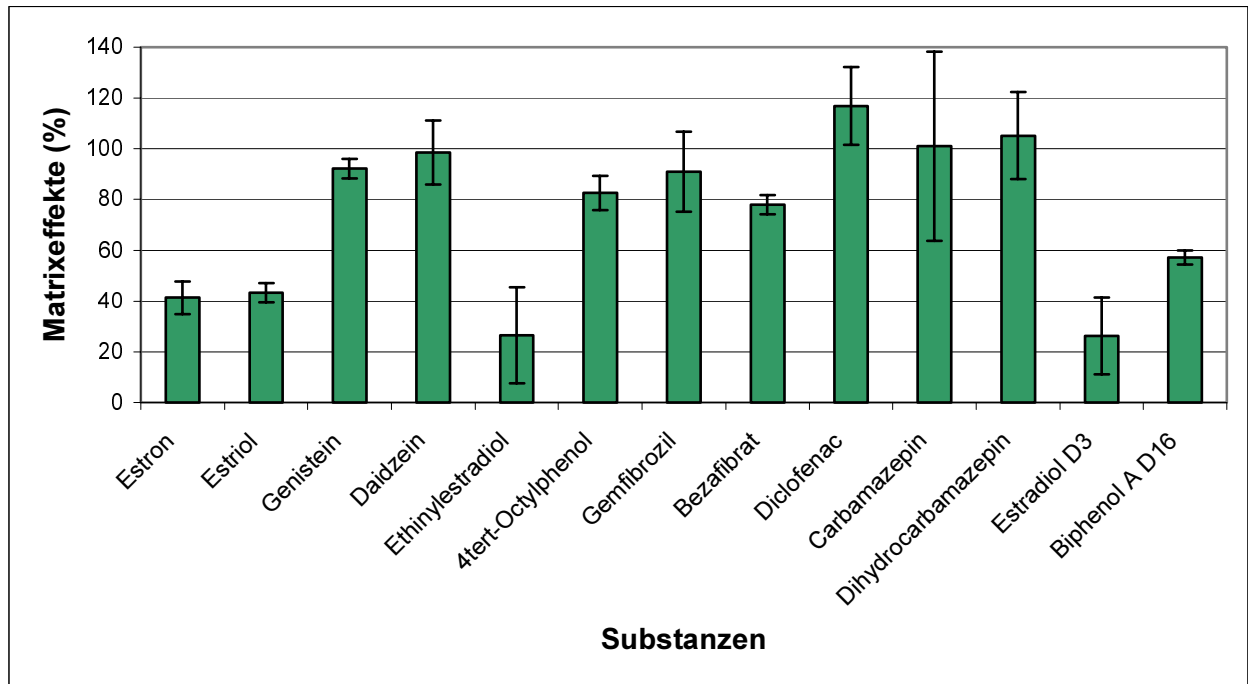


Abbildung 27: Matrixeffekte bei der Messung von Aalmuttergalle (n=7; 17β -Estradiol, Diclofenac und Dihydrocarbamazepin n=6).

Auffällig in Abbildung 27 sind die geringen Matrixeffekte der natürlichen und synthetischen Estrogene. Auch der interne Standard Estradiol D3 ist vergleichbar gering. Eine mögliche Erklärung ist die konzentrierter vorliegende Matrix in der Aalmuttergalle. Estrogene zeigten auch schon in den vorherigen Versuchen eine Messempfindlichkeit gegenüber der Matrix. In einer stark konzentrierten Gallenflüssigkeit wird somit die Signalsuppression bei der Messung durch die vermehrt vorliegende Matrix ebenfalls verstärkt. Im positiven Messmodus dagegen zeigen einige Pharmaka eine Signalverstärkung durch die Matrix. Hier liegen die Matrixeffekte über 100 %.

Wiederfindung der Aufarbeitung

Die Wiederfindung der Aufarbeitung für alle Substanzen mit Ausnahme von 17β -Estradiol, Nonylphenol und Bisphenol A sind in folgender Abbildung 28 aufgeführt.

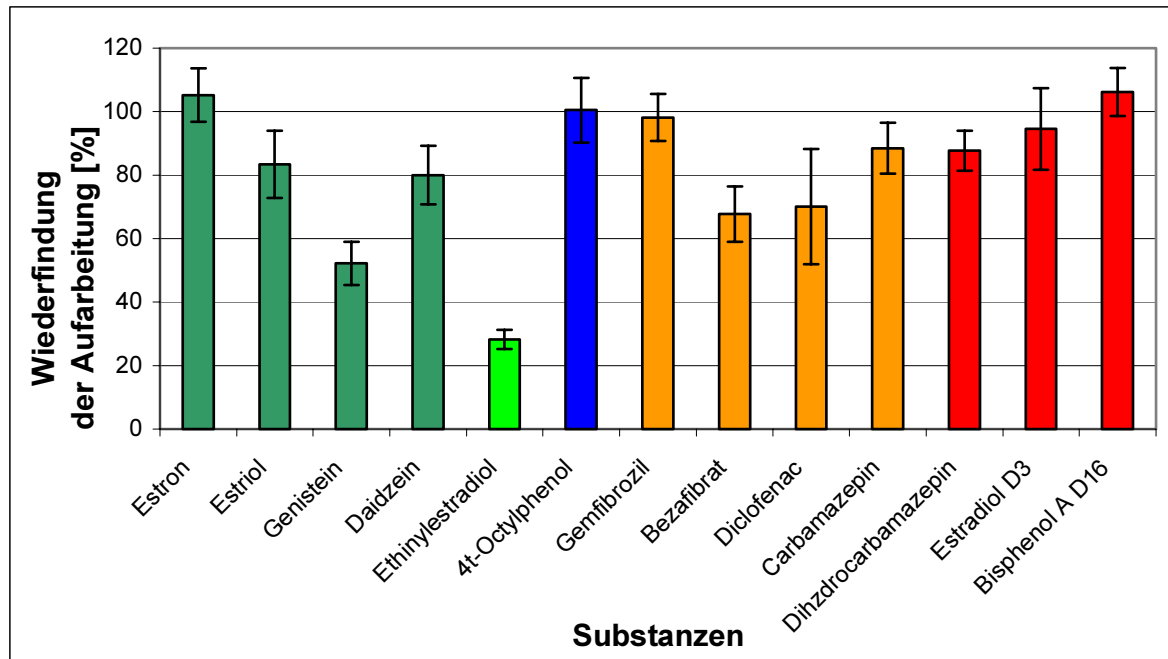


Abbildung 28: Wiederfindung der Aufarbeitung aus Aalmuttergalle (n=3; 4*tert*-Octylphenol n=2).

Wie der Abbildung 28 zu entnehmen ist, weisen alle Substanzen mit Ausnahme von 17 α -Ethinylestradiol eine gute Wiederfindung der Aufarbeitung auf.

Hier ist eine bessere Messbarkeit von Daidzein im Vergleich zu Genistein erkennbar. Die Wiederfindungen sind im Vergleich zum letzten Versuch mit Flundergalle gestiegen. Lag die Wiederfindung von Genistein im vorherigen Versuch noch bei 30 %, stieg diese nun auf über 50 %. Ebenso verhält es sich mit Daidzein. Auch die Wiederfindung der Pharmaka lagen zuvor noch zwischen 35 und 50 % und sind nun bei 70 bis fast 90 %.

3.2.5 Überprüfungen der Deglucuronidation

Zur Kontrolle der Deglucuronidationsausbeute der verwendeten Enzymlösung wurden parallel zur Aufarbeitungen der Vorversuche folgende Überprüfungen vorgenommen.

Durchführung:

Für diese Überprüfung der Enzyme in der Aufarbeitung wurden zweimal 100 μ L Milli-Q-Wasser mit interner Standardlösung (10 μ L von 0.5 ng/ μ L) und 10 μ L einer 0.01 μ g/ μ L-Estradiolglucuronidlösung parallel aufgearbeitet. Bei dieser Aufarbeitung wurden 100 μ L einer Enzymlösung mit einer Konzentration von 400 units/mL verwendet.

Ergebnisse:

Diese zweifache Wiederholung ergab eine Wiederfindung über das Gesamtverfahren von 44–50 % an 17 β -Estradiol. Bei einer Wiederfindung des zugegebenen internen Standards Estradiol D3 von 61–69 % ergibt das eine Ausbeute von ca. 70 %.

Überprüfung der Deglucuronidation mit Erhöhung der Enzymmenge

Eine anschließende zweifache Überprüfung der Deglucuronidation nach obiger Durchführung sowohl in Milli-Q-Wasser als auch in Gallenflüssigkeit von Flundern mit 150 μ L Enzymlösung ergab im Wasser eine Wiederfindung über das Gesamtverfahren von 17 β -Estradiol mit bis zu 93 % und in der Galle bis zu 70 %. Bei der Berücksichtigung des mittleren Matrixeffekts von 40 % für 17 β -Estradiol liegt die Wiederfindung der Aufarbeitung des umgesetzten 17 β -Estradiol in der Galle bei nahezu 100 %.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden ab der letzten Aufarbeitung von Flundergalle statt 100 μ l nun 150 μ L der Enzymlösung verwendet, um eine Enzymaktivität in den Proben im Überschuss vorliegen zu haben. So soll eine möglichst vollständige Deglucuronidation angestrebt werden.

3.2.6 Enzymtest

Um die Aktivität der β -Glucuronidase zu überprüfen, wurde ein von der Firma Sigma angegebener Qualitätskontrolltest dreifach durchgeführt.

Durchführung:

Hierfür wurden in Schraubdeckelglasvials je 0.7 mL Natriumacetatpuffer und Phenolphthalein-Glucuronid-Lösung gegeben. Nach kurzem Schütteln und Erhitzen auf 37 °C wurden 0.1 mL der β -Glucuronidase-Enzymlösung zugefügt und bei 37 °C für genau 30 Minuten inkubiert. Anschließend kamen noch 5 mL Glycin-Puffer hinzu. Für den Blindwert, ebenfalls dreifach bestimmt, wurde wie oben beschrieben vorgegangen, mit Ausnahme der Zugabe der Enzymlösung vor der Inkubation. Stattdessen wurde diese erst nach der Inkubation und nach der Glycin-Puffer-Zugabe hinzugefügt.

Die entstandenen Lösungen wurden in Küvetten gefüllt und mittels UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 540 nm vermessen.

Für die Kalibrierreihe wurden in Schraubdeckelglasvials je 0.7 mL Natriumacetatpuffer und Phenolphthalein-Glucuronid-Lösung gegeben. Nach Zugabe von 5 mL Glycin-Puffer wurden folgende Mengen an Phenolphthalein-Standardlösung und Ethanollösung zugegeben:

Tabelle 28: Kalibrierreihe des Enzymtests, Menge der Standard-Lösung.

Lösungen [mL]	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Blindwert
Phenolphthalein-Standardlösung	0.03	0.05	0.07	0.1	0
Ethanollösung	0.07	0.05	0.03	0	0.10

Die Aktivitäten wurden mit Hilfe der Kalibriergraden berechnet.

Ergebnisse:

Die Firma Sigma definiert die Einheit Unit wie folgt: Ein Unit wandelt 1 µg Phenolphthalein aus Phenolphthalein-Glucuronid in einer Stunde bei einem pH-Wert von 5 und einer Temperatur von 37 °C um.

Daraus folgt die Formel:

$$\text{Unit/mL Enzym} = \frac{(\mu\text{g Phenolphthalein freigesetzt}) * (2)^* (\text{df})}{0.1}$$

2 = Zeitkorrektur des Tests (0.5 Stunden)

df = Verdünnungsfaktor

0.1 = Menge der verwendeten Enzyme (mL).

Die Überprüfung ergab folgende Aktivitäten der Enzymlösung:

Test 1: 6.7133 units/mL,

Test 2: 7.0830 units/mL,

Test 3: 7.8242 units/mL.

Die genauen Messwerte sowohl von der Kalibrierreihe als auch von der dreifachen Bestimmung der Aktivität sind im Anhang unter 8.4 aufgeführt.

Die höheren Werte in Test 2 und 3 sind auf eine längere Inkubation zurückzuführen, da Test 1–3 nach der Inkubation nacheinander bearbeitet wurden.

Die errechnete Aktivität aus der Angabe des Herstellers ist: 6.733 u/mL.

Die angegebene Aktivität stimmt folglich gut mit den Testergebnissen überein. Eine eventuell höhere Aktivität ist sogar positiv, da bei einer möglichst vollständigen Deglucuronidierung eher zuviel als zu wenig Enzyme notwendig sind.

3.2.7 Die optimierte Methode

Die nachfolgend beschriebene Methode zur Probenaufarbeitung ist das Ergebnis nach Optimierung der variablen Parameter.

Probenvorbereitung

Für die Extraktion wurden wenn vorhanden maximal 100 µL Gallenflüssigkeit in ein Zentrifugenglas mittels einer Hamiltonspritze gegeben. Mit Hilfe eines Transferpettors kam ein interner Standard hinzu. Des Weiteren wurden 600 µL Natriumacetatpuffer und 600 µL Milli-Q-Wasser eingefüllt. Der Natriumacetatpuffer hat eine Konzentration von 100 mM und ist auf den pH 5 bei 37 °C eingestellt. Von einer β-GlucuronidaseLösung mit einer Konzentration von 400 units/mL (in Natriumacetatpuffer) wurden 150 µL zur Probe gegeben. Dieser Probenansatz wurde nun in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 155 u/min für 17–18 Stunden unter leichtem Schütteln inkubiert.

Extraktion

Die Enzymreaktion wurde nach der Inkubation durch Zugabe von 100 µL 1 N Salzsäure und anschließendem Schütteln mit Hilfe eines Stirrers beendet. Nun erfolgte eine dreifache Extraktion mit jeweils 2 mL Ethylacetat. Dafür wurden zur Probe 2 mL Ethylacetat gegeben, mit Hilfe des Stirrers für eine Minute geschüttelt und anschließend fünf Minuten bei 3000 u/min zentrifugiert. Nach der ersten Zentrifugation wurde zum Ausfällen der Proteine 500 µL 2-Propanol zugefügt.

Anschließend wurde die Probe erneut für fünf Minuten zentrifugiert.

Die Ethylacetatphasen der dreimaligen Extraktion wurden in Schraubdeckelglasvials gesammelt. Dieser Extrakt wurde nun bei 37 °C unter Stickstoff bis fast zur Trockene eingengt und anschließend mit 500 µL Dichlormethan/Methanol im Verhältnis 80:20 aufgenommen.

Clean-up

Für das Clean-up, das der Abtrennung von Matrix dienen soll, wurden 3 g Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol im Verhältnis 90:10 in einem Becherglas aufgeschlämmt und konditioniert und mit Hilfe einer Pipette in eine Glassäule gefüllt. Das Kieselgel war zuvor über Nacht bei 450 °C ausgeheizt worden.

Nun erfolgte eine Elution mit 7 mL Dichlormethan/Methanol im Verhältnis 90:10 und anschließend eine Elution mit Dichlormethan/Methanol im Verhältnis 80:20. Die Elutionslösungen wurden zusammen in einem Spitzkolben gesammelt. Es folgte das Einengen auf ca. 500 µL an einem Rotationsverdampfer. Der gereinigte und aufkonzentrierte Extrakt wird nun mit dreimaligem Spülen in ein Vial mit Graduierung

überführt und wiederum bei 37 °C unter Stickstoff auf 70 µL eingeeengt und anschließend mit 30 µL Milli-Q-Wasser auf 100 µL aufgefüllt.

Nach der Überführung in ein Messvial konnten die Probenextrakte vermessen werden. Zur Bestimmung des Matrixeffektes wurden die Extrakte zuvor geteilt und je ein Aliquot mit Standardlösungen dotiert.

Schematische Darstellung des Analyseverfahrens

Das folgende Schema zeigt das gesamte Verfahren in der Übersicht.

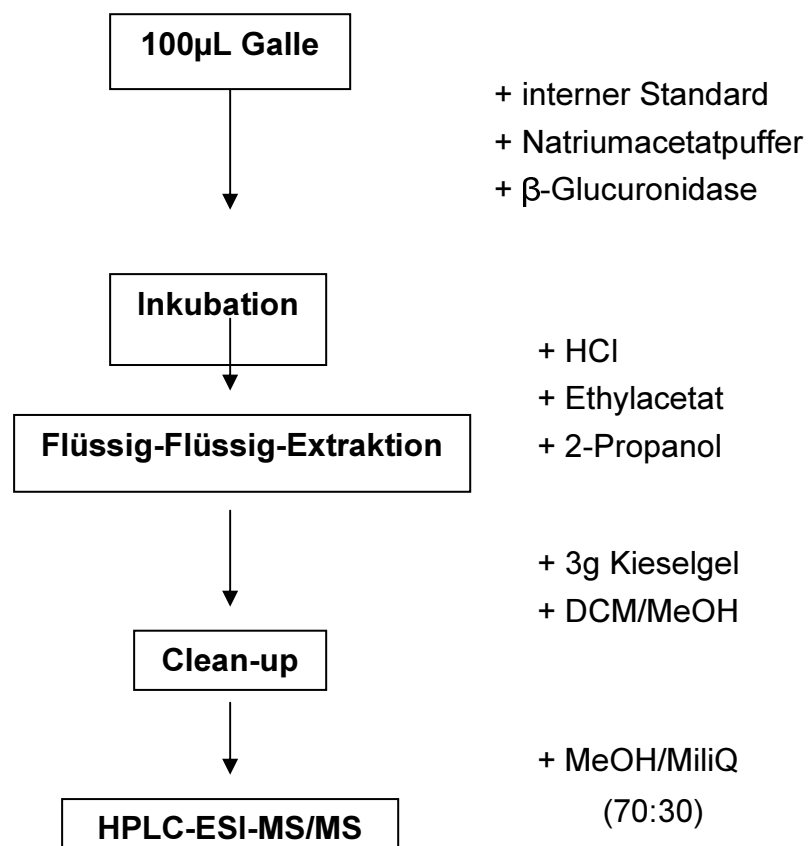


Abbildung 29: Schematische Darstellung des Analyseverfahrens.

3.2.8 Übersicht der Versuche

Die folgenden Tabellen 29 und 30 geben eine Übersicht über die durchgeführten Versuche zu Methodenentwicklung

Tabelle 29: Übersicht über die Versuche der Methodenentwicklung.

Überprüfung	Matrix	Konzentrationsbereich	Methode	Messgerät und Ionisierungsmittel
Die Extraktion				
Überprüfung der Extraktion ohne Matrix	Standardlösung in Milli-Q-Wasser	0.5ng/ μ L	LLE mit Ethylacetat	API3000, 0.6 mmol CH ₃ COOH und NH ₄ Ac
Wiederfindungen mit anderen Lösungsmitteln	Standardlösung in Milli-Q-Wasser	0.5ng/ μ L	LLE mit Ethylacetat, Methyl- <i>tert</i> -butylether	API3000, 0.6 mmol CH ₃ COOH und NH ₄ Ac
Clean-up				
Überprüfung der Elutionsmenge	Standardlösung in Milli-Q-Wasser	0.5 ng/ μ L	Clean-up mit Kiesgel, DCM/MeOH	API3000, 0.6 mmol NH ₄ Ac
Kopplung Extraktion und Clean-up				
Wiederfindungen der Extraktion, des Clean-ups und der Kopplung	Standardlösung in Milli-Q-Wasser	0.25 ng/ μ L	LLE mit Ethylacetat, Clean-up mit Kiesgel, DCM/MeOH	API4000, 1.2 mmol NH ₄ Ac, post-column
Wiederfindung und Matrixeffekt in Gallenflüssigkeiten	Standardlösung in Flundergalle	0.25 ng/ μ L	LLE mit Ethylacetat, Clean-up mit Kiesgel, DCM/MeOH	API4000, 2.5 mmol NH ₄ Ac
Wiederfindung und Matrixeffekt in Gallenflüssigkeiten, geringer dotiert	Standardlösung in Flundergalle	0.05 ng/ μ L	LLE mit Ethylacetat, Clean-up mit Kiesgel, DCM/MeOH	API4000, 2.5 mmol NH ₄ Ac
Wiederfindung und Matrixeffekt in Gallenflüssigkeiten, höher dotiert	Standardlösung in Flundergalle	0.1 ng/ μ l	LLE mit Ethylacetat, Clean-up mit Kiesgel, DCM/MeOH	API4000, 2.5 mmol NH ₄ Ac
Wiederfindung in Aalmuttergallen	Standardlösung in Aalmuttergalle	0.1 ng/ μ l	LLE mit Ethylacetat, Clean-up mit Kiesgel, DCM/MeOH	API4000, 2.5 mmol NH ₄ Ac

Tabelle 30: Übersicht über die Versuche der Methodenentwicklung (Fortsetzung).

Überprüfung	Matrix	Konzentrationsbereich	Methode	Messgerät und Ionisierungsmittel
Sonstige Versuche				
Überprüfung der Deglucuronidation	Estradiolglucuronid-lösung in Milli-Q-Wasser	1 ng/ μ L	LLE mit Ethylacetat, Clean-up mit Kieselgel, DCM/MeOH	API4000, 2.5 mmol NH_4Ac
Überprüfung der Deglucuronidation in Matrix	Estradiolglucuronid-lösung in Flundergalle	1 ng/ μ L	LLE mit Ethylacetat, Clean-up mit Kieselgel, DCM/MeOH	API4000, 2.5 mmol NH_4Ac
Enzymaktivitätsprüfung	Phenolphthalein in Pufferlösungen	400u/mL	Inkubation	UV-Detektor

4 ESTROGEN WIRKENDE SUBSTANZEN IN DER GALLE VON AALMÜTTERN AUS DER WISMARER BUCHT

4.1 Probencharakterisierung und Probenahmeort

Die Proben bestanden aus Gallenflüssigkeiten der Aalmutter (*Zoarces viviparus*) aus der Ostsee. Sie wurden Aalmütern entnommen, die in der Wismarer Bucht gefangen wurden. Die genauen Fangorte sind der folgenden Karte zu entnehmen.

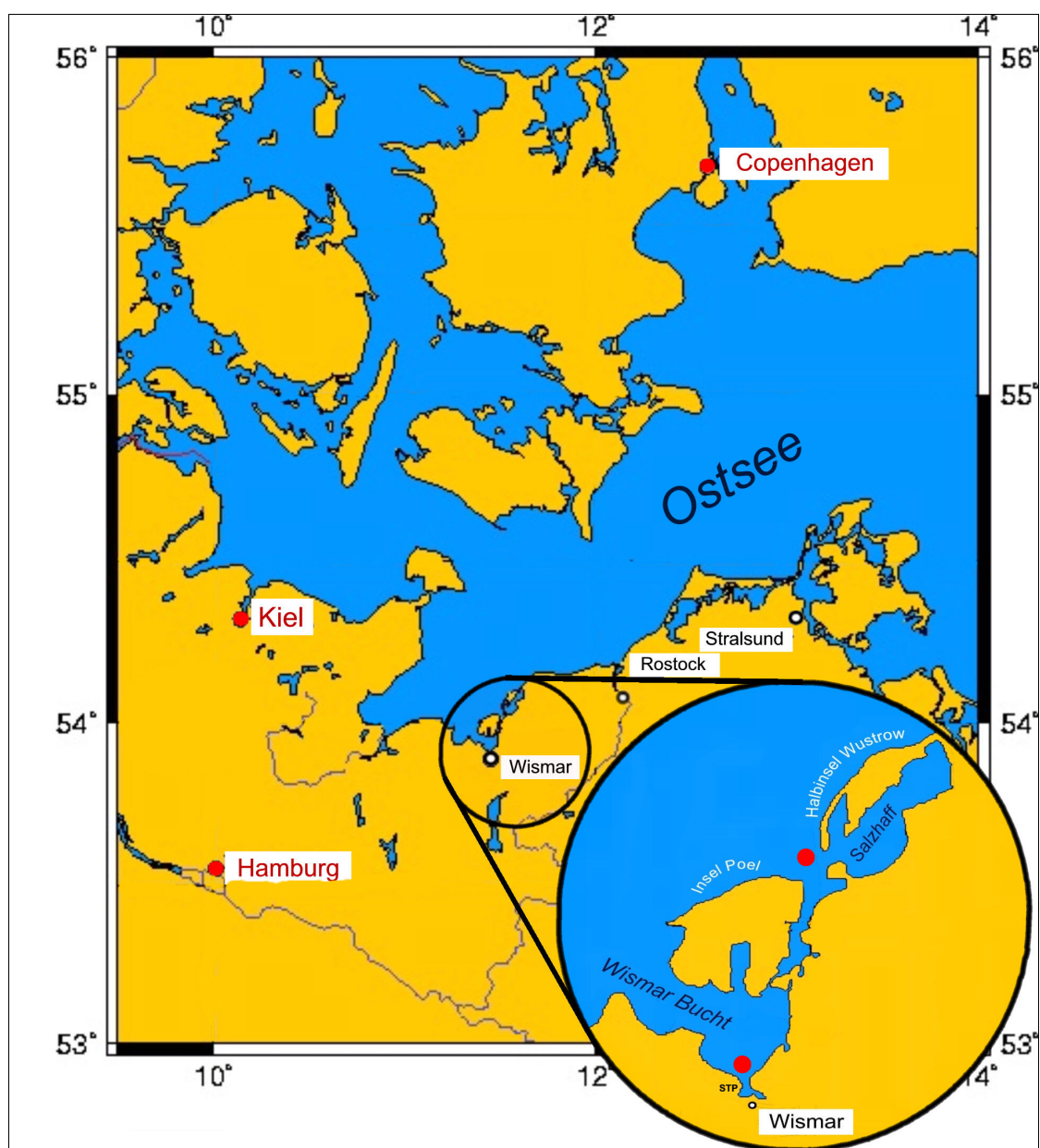


Abbildung 30: Karte der Probenahmeorte.

Die roten Markierungen im Detailkartenausschnitt der Abbildung 30 zeigen die Probenahmeorte. Die Abkürzung „STP“ für „Sewage Treatment Plant“ weist auf die in der Wismarer Bucht gelegene Kläranlage Wendorf hin.

Es wurden zwei Orte ausgewählt. Zum einen die nahe des Klärwerks Wismar-Wendorf gelegene Station „Wismar Klärwerk“ und zum anderen die von der Kläranlage entfernt gelegene Station „Salzhaff“. Die Probenahmestelle wurden gewählt, um einen belasteten und einen unbelasteten Standort vergleichen zu können. Die Station Salzhaff stellt somit im Gegensatz zur Probenahmestelle bei dem Klärwerk Wismar-Wendorf einen unbelasteten Ort dar, da Kläranlagen eine nicht unbedeutende Quelle für den Eintrag sowohl von estrogen wirkenden Stoffen als auch von Pharmaka darstellen. Die genauen Koordinaten der Probenahme lauten wie folgt:

Innere Wismarer Bucht /Klärwerk: Länge (°E): 11°26.51, Breite (°N): 53°54.41

Salzhaff : Länge (°E): 11°29.42, Breite (°N): 54°02.43

Die Probenahme erfolgte durch Herrn Dr. Jens Gercken vom Institut für Angewandte Ökologie in Neu Broderstorf.

Die Gallenflüssigkeiten wurden den Aalmuttern und Flundern mit Hilfe einer Kunststoffspritze entnommen und in Caps gefüllt. Gelagert wurden die Proben bei -80°C im Gefrierschrank. Die Proben wurden im Laufe des Monats Juni 2003 genommen. Die Fische wurden nach dem Geschlecht und dem Ausmaße der Missbildungen bearbeitet und die entsprechenden Daten aufgenommen. Die vermerkten Missbildungen waren Fehlbildungen von Eizellen (Atresie) in weiblichen Aalmuttern und die Bildung von weiblichen Gameten im Hodengewebe (Intersex) in männlichen Aalmuttern. Bei dem Ausmaß der Missbildungen sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Tieren wurde folgende Abstufung vorgenommen:

No < low < moderate < strong

Es wurden auch Tiere mit Missbildungen gefunden, die in den Übergangsbereichen der oben genannten Kategorien lagen.

Ziel der Auswahl von Proben für diese Arbeit war, die Extrema, also jeweils Proben aus den Kategorien no und strong, miteinander zu vergleichen. Da aber nicht genügend Probenmaterial aus den entsprechenden Zuständen vorhanden waren, musste auf Proben anderer Kategorien ausgewichen werden.

Die folgende Tabelle 31 soll eine Übersicht über die Proben, deren Geschlecht, Fangort, zur Verfügung stehenden Probemenge und Kategorie der Missbildungen geben.

Tabelle 31: Auswahl der Gallenproben.

Probe-Nr.	Geschlecht	Menge [μ L]	Missbildung	Fangort
44	f	80	no	Wismar Klärwerk
45	f	80	no	Wismar Klärwerk
53	f	100	no	Wismar Klärwerk
61	f	100	no	Wismar Klärwerk
43	f	100	strong	Wismar Klärwerk
49	f	100	strong	Wismar Klärwerk
50	f	100	strong	Wismar Klärwerk
52	f	100	strong	Wismar Klärwerk
46	m	80	no	Wismar Klärwerk
47	m	45	no	Wismar Klärwerk
51	m	50	no	Wismar Klärwerk
62	m	80	no	Wismar Klärwerk
66	m	43	no	Wismar Klärwerk
40	m	60	low	Wismar Klärwerk
54	m	58	low	Wismar Klärwerk
48	m	100	moderate	Wismar Klärwerk
152	f	100	no	Salzhaff
171	f	50	no	Salzhaff
173	f	75	no	Salzhaff
179	f	60	no	Salzhaff
190	f	60	no	Salzhaff
186	f	25	low	Salzhaff
174	f	45	low<moderate	Salzhaff
176	f	75	moderate	Salzhaff
153	m	30	no	Salzhaff
154	m	28	no	Salzhaff
157	m	80	no	Salzhaff
164	m	38	no	Salzhaff
168	m	25	low	Salzhaff
169	m	38	low	Salzhaff
178	m	18	strong	Salzhaff
183	m	25	moderate	Salzhaff

Von den vorhandenen Proben der Station Salzhaff kamen nur wenige von Fischen mit stark ausgeprägten Missbildungen. Ebenso verhielt es sich mit den Proben männlicher Aalmuttern. Lediglich die Proben weiblicher Tiere der Station Wismar Klärwerk wiesen genug Probenmaterial für die angestrebte Auswahl der Proben aus den entsprechenden Missbildungskategorien auf.

Für die Aufarbeitung und Vermessung der Proben wurde die aus der Methodenentwicklung resultierende Aufarbeitung verwendet. Dabei wurden die Proben getrennt nach Ort und Geschlecht aufgearbeitet. Die Proben der weiblichen Tiere der Stationen Wismar Klärwerk und Salzhaff wurden zusammen vermessen, während

die Proben männlicher Tiere beider Stationen sowohl getrennt voneinander aufgearbeitet als auch getrennt vermessen wurden.

Der Kalibrierbereich der Messung der weiblichen Tiere lag zwischen 0 und 1 ng/μL. Daraufhin wurde festgestellt, dass die Konzentrationen von Bisphenol A und Nonylphenol außerhalb des Kalibrierbereichs lagen. Deshalb kann für die weiblichen Tiere an beiden Stationen für diese Substanzen keine genaue Konzentrationsangabe gemacht werden. Daraufhin wurde der Kalibrierbereich für die folgenden zwei Messungen der männlichen Tiere für diese beiden Substanzen auf bis ca. 10 ng/μL erweitert. Die genauen maximalen Konzentrationen der Kalibrierstandard lagen für Nonylphenol bei 13.5 ng/μL und für Bisphenol A bei 7.2 ng/μL.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in Realproben

Die in der folgenden Tabelle dargestellten Grenzen basieren auf Messungen von Aalmuttergallenproben, bei denen das Signal-Rausch-Verhältnis möglichst nach an der Bestimmungsgrenze von 10 lag. Leider war es nicht bei allen Substanzen aufgrund hoher Gehalte möglich, so dass beispielsweise für Bisphenol A von einem Signal-Rausch-Verhältnis von ca. 1100 auf 10 bzw. 3 extrapoliert werden musste.

Durch diese starke Extrapolation von Bisphenol A und Nonylphenol ergeben sich für diese Substanzen niedrigere Werte, als die real vorliegenden Grenzen.

Durch diese große Spanne verschiebt sich wahrscheinlich die Nachweis- und Bestimmungsgrenze etwas nach oben, so dass von einer höheren Grenze ausgegangen werden muss.

Tabelle 32: Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) in den Realproben [ng/ μ L Gallenflüssigkeit].

	LOD [ng/μL Galle]	LOQ [ng/μL Galle]
17β-Estradiol	0.055	0.183
Estron	0.021	0.070
Estriol	0.060	0.201
Genistein	0.032	0.107
Daidzein	0.016	0.055
17α-Ethinylestradiol	0.056	0.188
4tert-Octylphenol	0.002	0.007
Bisphenol A	0.046	0.152
Nonylphenol	0.170	0.568
Gemfibrozil	0.001	0.005
Bezafibrat	0.006	0.019
Diclofenac	0.005	0.016
Carbamazepin	0.002	0.007
Dihydrocarbamazepin	0.002	0.007
Estradiol D3	0.032	0.107
Bisphenol A D16	0.058	0.193

Wie der Tabelle 32 zu entnehmen ist, weisen alle Substanzen eine Bestimmungsgrenze <0.6 ng/ μ L Gallenflüssigkeit auf. Die höchste Bestimmungsgrenze weist dabei Nonylphenol auf. Besonders die Pharmaka sind mit 0.005 bis 0.019 ng/ μ L Galle im Gegensatz zu den natürlichen Estrogenen am besten bestimmbar.

4.2.2 Wiederfindung

Aufgrund der geringen Probemenge konnten die Wiederfindung über das Gesamtverfahren und der Aufarbeitung der Substanzen nicht für jede Probe einzeln vorgenommen werden. Stattdessen wurden für die Auswertung die Wiederfindungen vor der Aufarbeitung der Realproben bestimmt. Die diese Bestimmung der Wiederfindung ist ebenfalls in der Methodenentwicklung (vergleiche Kapitel 3.2.4, Wiederfindung in Aalmuttergalle) beschrieben. Aufgrund der unerwartet hohen Konzentrationen der Substanzen 17 β -Estradiol, Bisphenol A und Nonylphenol in den Gallenproben war die Dotierung des Extraktaliquots vor der Messung für diese Bestimmung aber zu gering. Deshalb wurde für diese Substanzen eine erneute Bestimmung der Wiederfindung über das Gesamtverfahren vierfach durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgte ebenfalls nach der zuvor entwickelten Methode.

Die Wiederfindungen über das Gesamtverfahren und der Aufarbeitung der Substanzen aus Aalmuttergalle sind der folgenden Tabelle 33 zu entnehmen.

Tabelle 33: Wiederfindung aus Aalmuttergalle (n=3).

Substanz	Wiederfindung (Gesamtverfahren) [%]	Stdabw.	Wiederfindung (Aufarbeitung) [%]	Stdabw.
17β-Estradiol	36.9	2.5	103.2	14.3
Estron	45.3	2.4	105.2	8.4
Estriol	33.1	1.5	83.3	10.5
Genistein	52.5	6.9	52.2	6.8
Daidzein	86.4	7.1	80.0	9.3
17α-Ethinylestradiol	19.2	1.8	28.2	3.0
4tert-Octylphenol	86.5	8.2	100.5	10.1
Bisphenol A	19.0	2.5	119.4	16.7
Nonylphenol	34.4	2.2	112.3	4.9
Gemfibrozil	90.8	3.9	98.2	7.4
Bezafibrat	58.2	4.4	67.8	8.8
Diclofenac	92.2	18.5	70.1	18.1
Carbamazepin	91.1	7.0	88.4	8.0
Dihydrocarbamazepin	99.0	7.4	87.7	6.3
Estradiol D3	26.2	1.5	94.5	12.9
Bisphenol A D16	56.1	0.7	106.2	7.6

Die Wiederfindungen über das Gesamtverfahren lagen für 17 β -Estradiol und seine Metabolite alle unter 50 %. Dabei wiesen Estron die höchste Wiederfindung mit 45 % und Estriol die niedrigste mit 33 % auf. Für die Phytoestrogene konnten Wiederfindungen von über 50 % bestimmt werden, wobei auch hier wieder Daidzein mit 86 % die Wiederfindung von Genistein weit übersteigt. Sehr gute Wiederfindungen konnten für die Pharmaka ermittelt werden. Hier liegen alle Substanzen mit Ausnahme von Diclofenac bei 90 %. Die Industriechemikalien zeigten keine einheitlichen Wiederfindungen. Bisphenol A hat mit 19 % die geringste, 4tert-Octylphenol mit 87 % die höchste Wiederfindung.

4.2.3 Matrixeffekte

Die folgenden Diagramme zeigen beispielhaft die Matrixeffekte einiger Realproben. Aufgrund der großen Probenanzahl werden nicht alle Matrixeffekte der gesamten Proben als Diagramm dargestellt, sondern sind im Anhang unter 8.5.1 einer Tabelle zu entnehmen.

Als Beispiele wurden Phytoestrogene und einige Pharmaka männlicher Tiere vom Wismar Klärwerk (Abbildung 31), natürliche Estrogene und synthetische Estrogene weiblicher Tieren vom Salzhaff (Abbildung 32) und schließlich die Industriechemikalien und Gemfibrozil als ein Arzneimittelwirkstoff männlicher Tiere vom Salzhaff

herausgesucht (Abbildung 33). Die Angaben besagen, dass statt 100 Prozent der zudotierten Substanzen im Probenaliquot durch eine Signalunterdrückung der Matrix lediglich die angegebenen Prozent detektiert werden.

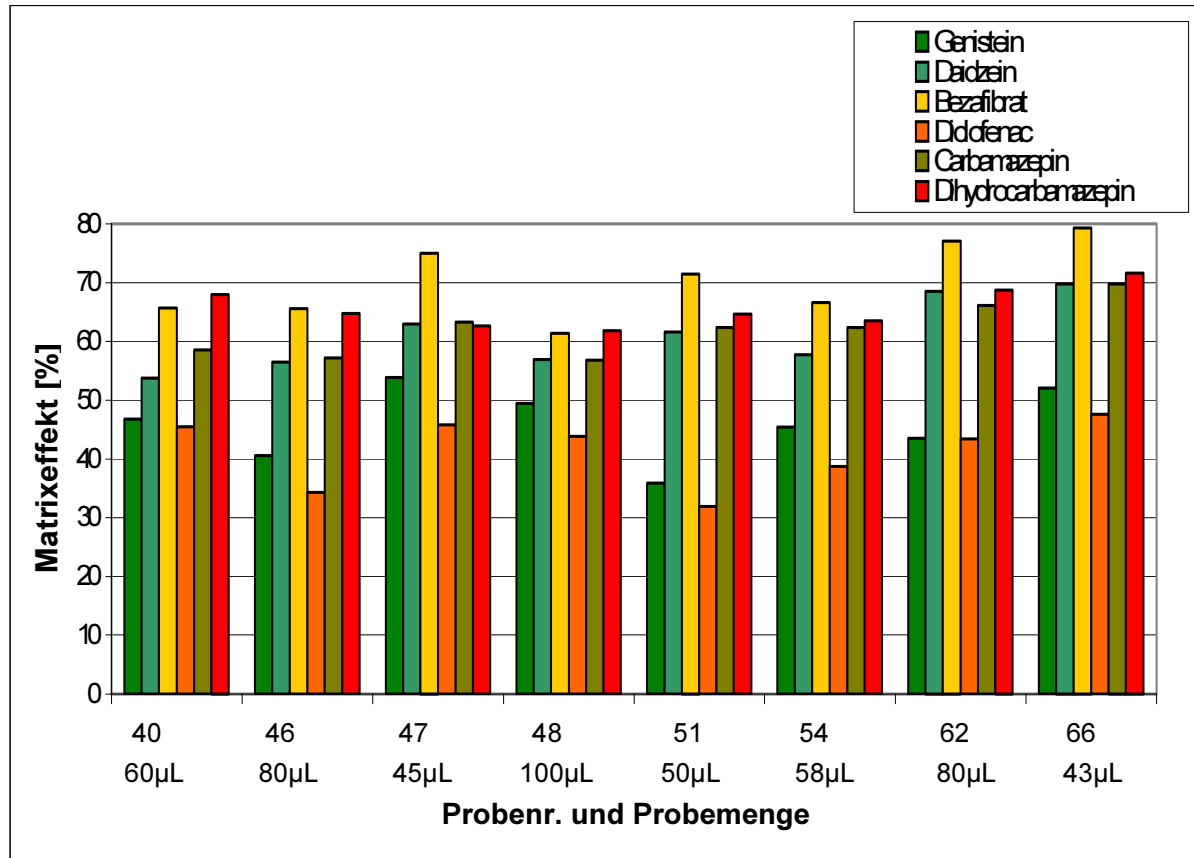


Abbildung 31: Matrixeffekte der Phytoestrogene und Pharmaka männlicher Aalmuttern der Station Wismar Klärwerk.

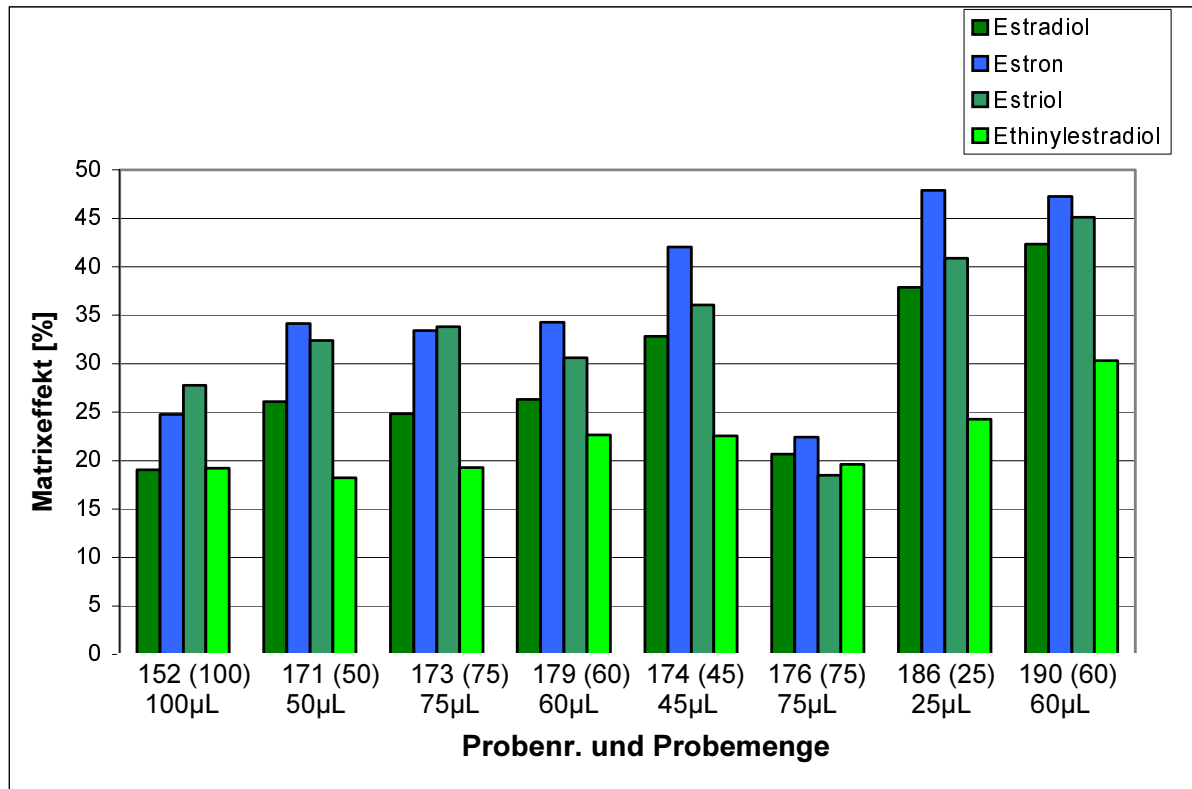


Abbildung 32: Matrixeffekte natürlicher und synthetischer Estrogene in weiblichen Tieren der Station Salzhaff.

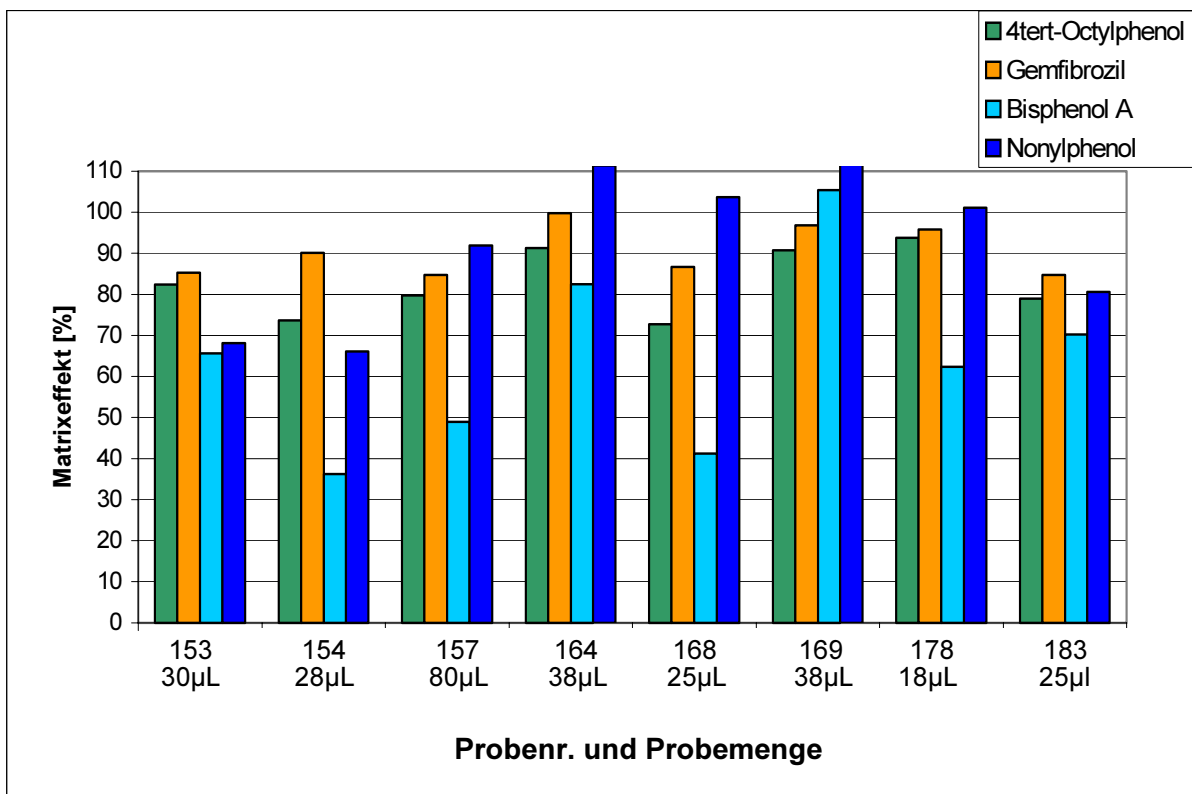


Abbildung 33: Matrixeffekte von Nonylphenol, Bisphenol A, 4tert-Octylphenol und Gemfibrozil männlicher Aalmuttern der Station Salzhaff.

Die Diagramme (Abbildungen 31–33) zeigen die Ergebnisse der einfachen Bestimmung der Matrixeffekte von Substanzen in der jeweiligen Probe.

In Diagramm 32 gut zu erkennen ist, dass der Matrixeffekt für einige Substanzen umso größer ist, je kleiner die Probemenge ist. Es findet also durch die Aufarbeitung eine Verdünnung der Matrix statt, was den Matrixeffekt begünstigt. Allgemein kann festgestellt werden, je weniger Matrix in der Probe ist, umso geringer ist also auch die Signalsuppression.

Allerdings kann es durch die individuelle Matrix auch bei Proben mit mehr Probemenge der Matrixeffekt hoch sein, im Gegensatz zu Proben mit geringerer Menge. Im Diagramm 32 ist dies an den Proben 186 und 190 zu beobachten. Die Matrixeffekte beider Proben sind annähernd gleich hoch, doch die eingesetzte Probemenge mit 25 bzw. 60 μL deutlich unterschiedlich. Dagegen hat Probe 179 ebenfalls eine Menge von 60 μL , weist aber einen niedrigeren Matrixeffekt für mehrere Substanzen auf. Diese Probemengen unabhängigen Schwankungen könnten auf die individuellen Matrices der Gallenflüssigkeiten zurückgeführt werden.

Wie den obigen Diagrammen zu entnehmen ist, sind die Substanzen bei der Detektion unterschiedlich in ihrer Matrixempfindlichkeit. Während der Matrixeffekt von 4*tert*-Octylphenol (Abbildung 33) und Carbamazepin und Dihydrocarbamazepin (Abbildung 31) kaum Schwankungen aufweisen, treten bei Bisphenol A (Abbildung 33) unabhängig von der Probenmenge große Unterschiede in den Matrixeffekten auf. So liegt der Matrixeffekt in Probe 154 bei 38 %, in Probe 169 dagegen bei über 100 %.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass aufgrund der unterschiedlichen Probemengen und der einzeln aufgearbeiteten Proben mit ihrer individuellen Matrix, die Matrixeffekte sehr unterschiedlich und probenspezifisch sind. Deshalb wurde für jede Substanz in jeder Probe der Matrixeffekt bestimmt. Vier Tabellen mit den für jede Probe bestimmten Matrixeffekten sind im Anhang unter 8.5.1 zu finden.

4.2.4 Blindwerte

Der Verdacht, dass die Industriechemikalien während der Aufarbeitung als Kontamination in die Probe gelangen, wurde durch das Vermessen von Blindwerten nicht bestätigt. Aufgearbeitet wurden dafür parallel zu den Gallen Milli-Q-Wasser-Aliquote aus einem leeren Probengefäß. Die so bestimmten Blindwerte der vier Aufarbeitungen sind in der folgenden Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 34: Blindwerte der Aufarbeitung von Realproben.

[ng/ μ L] Substanzen	Wismar Klärwerk		Salzhaff	
	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen
17β-Estradiol	0.001	0.002	-	-
Estron	0.001	0.002	0.001	0.001
Estriol	-	-	-	-
Genistein	-	-	-	-
Daidzein	-	-	-	-
17α-Ethinylestradiol	-	-	-	-
4tert-Octylphenol	0.006	-	0.007	-
Bisphenol A	0.003	0.011	0.003	0.004
Nonylphenol	0.126	0.034	0.095	0.050
Gemfibrozil	-	-	-	-
Bezafibrat	-	-	-	-
Diclofenac	-	-	-	-
Carbamazepin	-	-	-	-

Bei den in Tabelle 34 genannten Blindwerten wurde die Probenahme nicht berücksichtigt. Den Fischen wurde die Gallenflüssigkeit mit Hilfe einer Spritze aus Kunststoff entnommen, in denen die Industriechemikalien vorkommen könnten. Zudem weisen Gallenflüssigkeiten einen anderen leicht alkalischen pH-Wert (7.5–8.8) als Milli-Q-Wasser auf, so dass ein Herauslösen der Substanzen aus dem Probegefäß nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Während der Probenlagerung kam es durch einen Defekt des Gefrierschranks zum kurzzeitigen Auftauen der Proben. Die mit Milli-Q-Wasser gefüllten Probengefäße befanden sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht bei den Proben, so dass dieser Effekt ebenfalls vom Blindwert nicht erfasst wird.

4.2.5 Der Gehalt in Aalmuttergallen

Die folgenden vier Tabellen zeigen die Messwerte der Proben abzüglich des Blindwertes und unter Berücksichtigung des Matrixeffektes. Da aber die Dotierkonzentration und der Kalibrierbereich für die Substanzen Bisphenol A und Nonylphenol teilweise unterhalb der Realkonzentration lag, konnten für diese beiden Substanzen nicht alle Messwerte um den Matrixeffekt korrigiert werden. Diese sind in den Tabellen mit „*“ gekennzeichnet und stellen die Rohdaten dar.

In den Tabellen im Anhang unter Punkt 8.5.2 werden die Messwerte nochmals als Rohdaten, ohne Berücksichtigung des Matrixeffektes dargestellt.

Die Bezeichnung „n.n.“ in den folgenden Tabellen bedeutet, dass die entsprechende Substanz nicht nachweisbar ($S/N < 3$). Das Kürzel „<BG“ weist zwar auf einen Nachweis dieser Substanz hin, eine quantitative Bestimmung war aber aufgrund des geringen S/N -Verhältnisses ($S/N < 10$) nicht möglich.

Tabelle 38: Konzentrationen der Substanzen in den männlichen Aalmuttern der Station Salzhaff [ng/ μ L].

Missbildungen:	no	no	no	no	low	low	mod	strong
Probe-Nr.:	153	154	157	164	168	169	183	178
Substanz [ng/ μ L]								
17β-Estradiol	0.09	<BG	n.n.	<BG	0.07	<BG	<BG	<BG
Estron	<BG	<BG	<BG	<BG	<BG	<BG	<BG	<BG
Estriol	0.05	n.n.	n.n.	n.n.	0.05	<BG	0.06	<BG
Genistein	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Daidzein	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
17α-Ethinylestradiol	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
4tert-Octylphenol	0.09	0.13	0.04	0.12	0.05	0.08	0.08	0.10
Bisphenol A	4.16	10.8	2.78	7.36	15.2	2.36	5.86	7.16
Nonylphenol	9.74	17.7*	5.8	17.2	12.1	7.61	12.6	18.8
Gemfibrozil	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Bezafibrat	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Diclofenac	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Carbamazepin	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

In den männlichen Tieren beider Stationen konnten die natürlichen Estrogene in den meisten Proben zwar nachgewiesen, aber nicht quantitativ bestimmt werden. Erwartungsgemäß waren hier weitaus weniger des weiblichen Hormons und dessen Metabolite in männlichen Tieren zu finden.

Die Industriechemikalien waren auch hier an beiden Stationen bestimmbar. Dabei weist 4tert-Octylphenol gefolgt von Bisphenol A die geringsten Werte, Nonylphenol aber deutlich höhere Konzentrationen auf.

Die Phytoestrogene, Pharmaka und das synthetische Estrogen 17 α -Ethinylestradiol konnten ebenfalls in keiner der männlichen Aalmuttergallen festgestellt werden.

5 DISKUSSION

In diesem Kapitel soll zunächst eine Bewertung der entwickelten Methode vorgenommen werden. Anschließend werden die hohen Konzentrationen der Industriechemikalien in den Aalmuttergallen diskutiert. Es folgen Vergleiche der Messdaten innerhalb der Station Wismar Klärwerk und anschließend ein Vergleich beider Stationen miteinander. Das Kapitel endet mit einem Vergleich der Ergebnisse von den Aalmuttern der Wismarer Bucht mit entsprechenden Daten aus der Literatur.

5.1 Bewertung des entwickelten Verfahrens

Das hier entwickelte Verfahren erwies sich als geeignet für die Extraktion und Detektion für die untersuchten estrogen wirksamen Verbindungen in Gallenflüssigkeiten von Fischen. Es war möglich, die gesuchten Substanzen trotz erheblicher Matrixeffekte in realen Proben zu detektieren und großteils zu quantifizieren. Zudem war das Verfahren empfindlich genug die natürlichen Estrogene und Industriechemikalien in weiblichen Fischen nachzuweisen. Es konnten gute Wiederfindungen für die Substanzen bestimmt werden. Auch waren die Blindwerte gering. Der Einfluss des Matrixeffektes wird bei dem Vergleich der instrumentellen und realen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen deutlich.

Bei der Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in Realproben wird sowohl die Wiederfindung über das Gesamtverfahren als auch der Matrixeffekt berücksichtigt, deshalb liegen diese Grenzen teilweise um den Faktor 100 höher. Die Matrix in einer Gallenprobe führt zu einer Erhöhung der Bestimmungsgrenzen. Während sich die Bestimmungsgrenzen für 4*tert*-Octylphenol nur um den Faktor zwei noch oben verschoben haben, lagen die Bestimmungsgrenzen für 17 β -Estradiol und 17 α -Ethinylestradiol um den Faktor 30 über den instrumentellen Bestimmungsgrenzen. Die anderen Industriechemikalien und die Phytoestrogene wiesen eine Erhöhung der Bestimmungsgrenze um den Faktor 85–100 im Vergleich zu den instrumentellen Grenzen auf. Dabei ist für die Bestimmung Genistein die Grenze um den Faktor 90, für Daidzein nur um den Faktor 85 angestiegen.

Die Pharmaka weisen ebenfalls kein einheitliches Bild der Erhöhung der Bestimmungsgrenzen auf. Während Gemfibrozil und Carbamazepin nur eine ca. 25fache Menge zur Bestimmung in einer Realprobe notwendig sind, kam es bei der Substanz Diclofenac zur Erhöhung um den Faktor 40 und für Bezafibrat sogar um 95.

Bei der Auswertung von 17 α -Ethinylestradiol in Realproben kam es zu einem Problem mit der Matrix. Zur etwa gleichen Retentionszeit (18.8–18.9 min) trat ein Peak im Chromatogramm auf, der ebenfalls die gleichen Massenübergänge (295/145 und 295/142.9) wie 17 α -Ethinylestradiol aufwies. Da aber das Verhältnis der

Intensitäten der beiden Massenübergänge nicht übereinstimmte (1.66 für EE2, 2.93 für die unbekannte Substanz), konnte nicht von der Substanz 17α -Ethinylestradiol ausgegangen werden. Daraufhin wurden für 17α -Ethinylestradiol noch zwei weitere Massenübergänge vermessen, die aber aufgrund ihrer geringen Intensität im Rauschen des Untergrundes bei der Messung einer Probe untergingen. Eine Kontrolle war so folglich nicht möglich. Ein Test, bei dem zunächst eine Probe und anschließend dieselbe Probe mit Dotierungsstandard versehen vermessen wurden, stellte sich heraus, dass es sich bei dem Peak im Chromatogramm zu dieser Retentionszeit nicht um 17α -Ethinylestradiol handelte. Unklar ist, inwieweit die Matrix der Gallenprobe ein das Messsignal von 17α -Ethinylestradiol negativ beeinflusst hat und deshalb nicht messbar war. 17α -Ethinylestradiol konnte jedenfalls in keiner der untersuchten Gallenproben nachgewiesen werden.

5.2 Die hohen Konzentrationen von Bisphenol A und Nonylphenol

Auffällig sind immer wieder die hohen Konzentrationen von Nonylphenol und Bisphenol A in den Gallenflüssigkeiten der Aalmuttern. Selbst der höchste Blindwert von Nonylphenol in Höhe von $0.13 \text{ ng}/\mu\text{L}$ aus der Aufarbeitung weiblicher Aalmuttern vom Wismarer Klärwerk kann die wesentlich höheren Konzentrationen in den Gallen nicht erklären. Allerdings wurden bei den Blindwerten die Probenahme nicht berücksichtigt. Wäre es zu einem Herauslösen der Industriechemikalien aus dem Probenahmematerial gekommen, müsste aber in allen Proben ähnlich hohe Konzentration zu finden sein. Dies ist aber nicht der Fall. Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine Anreicherung von Nonylphenol und Bisphenol A in der Galle (vergleiche Kapitel 2.2.2).

Im Wasser von Kläranlagenabläufen wurden Konzentrationen bis zu $3100 \text{ ng}/\text{L}$ Nonylphenol nachgewiesen. (SPENGLER ET AL., 2002, S. 30). In den Gallen der Aalmuttern der Wismarer Bucht wurden im Mittel von $5.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (Station Wismar Klärwerk, weibliche Tiere) festgestellt. Dies würde eine sehr hohe Anreicherung mit einem Faktor von mehr als 1000 in der Galle bedeuten.

LARSSON ET AL. (1999, S.93) fanden bei Untersuchung von Fischen an Kläranlagenabläufen in der Galle dieser Fische eine 10^4 – 10^6 mal höhere Konzentrationen von endokrinen Substanzen als im Wasser. Eine Anreicherung in der Aalmutter kann auch durch ihre Lebensweise erklärt werden. Dieser Fisch lebt am Bodengrund, also am Sediment und ernährt sich auch dort von Lebewesen aus dem Bodengrund. Da beispielsweise Nonylphenol als eine lipophile Substanz vorzugsweise am Sediment gebunden vorliegt, ist der Lebensbereich der Aalmutter eher mit Nonylphenol belastet als der anderer Fische des mittleren Wasserbereichs. Ein weiterer Hinweis

darauf könnten die Ergebnisse der Untersuchungen von GERCKEN ET AL. (2002) auf das Intersexvorkommen in Fischen sein. Die Aalmutter scheint von dieser Missbildung besonders betroffen zu sein. Im Vergleich zum Dreistacheligen Stichling (*Gasterosteus aculeatus*) und zum Barsch (*Perca fluviatilis*) wiesen die untersuchten Aalmuttern aus den gleichen Gebieten das höchste Intersex-Vorkommen auf. So wurden zum Beispiel bei den Aalmuttern bis zu 27,8 %, bei den Stichlingen nur bis zu 12,5 % Intersexualität festgestellt (GERCKEN ET AL. 2002).

5.3 Vergleich der Proben innerhalb einer Station und Geschlecht.

Ein Vergleich der Substanzgehalte in den Gallenflüssigkeiten von Aalmuttern ohne feststellbaren Missbildungen (no) und Fischen mit starken Missbildungen (strong) sollen anhand der weiblichen Aalmuttern der Station Wismar Klärwerk dargestellt werden. Diese Auswahl wurde getroffen, weil an dieser Station genügend Gallenproben von Fischen mit starker Ausprägung von Missbildungen vorhanden waren.

Die folgende Abbildung 34 zeigt den Mittelwert aus jeweils vier Gallenproben, die Aalmuttern ohne erkennbaren Missbildungen (no, blau) und Gallenproben von Aalmuttern mit starker Ausprägung der Missbildungen (strong, grün) entnommen wurden.

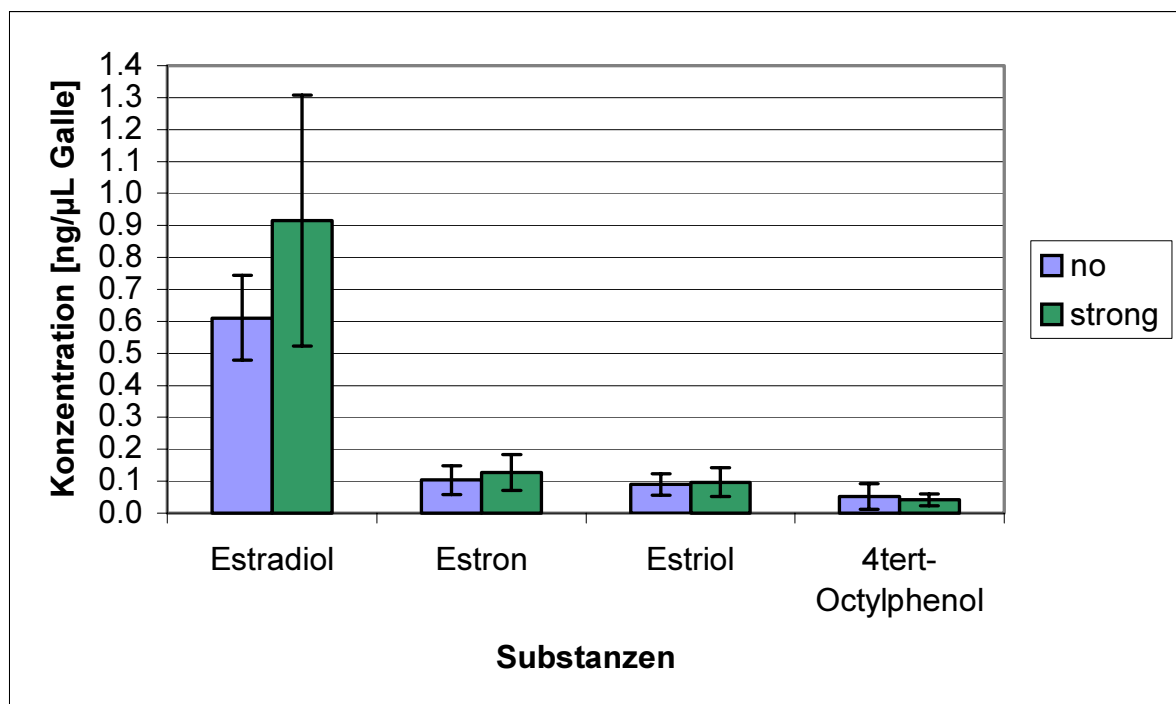


Abbildung 34: Vergleich von Gallen weiblicher Aalmuttern mit unterschiedlicher Ausprägung von Missbildungen (n=4).

17 β -Estradiol und seine Metabolite sind in den Aalmuttergallen mit vermehrt festgestellter Atresie in höheren Konzentrationen als in den atresiefreien Fischen zu finden. 17 β -Estradiol konnte in ersteren mit einer mittleren Konzentration von 0.9 ng/ μ L Galle und in den Aalmuttern ohne Atresie mit einer mittleren Konzentration von 0.6 ng/ μ L nachgewiesen werden. Eine höhere Konzentration von 17 β -Estradiol bedingt eine höhere Konzentration seiner Metabolite. Erwartungsgemäß sind auch die Metabolite Estron und Estriol in den Gallen von Aalmuttern mit Atresie ebenfalls höher als zu den Vergleichsproben.

Es wäre denkbar, dass das vermehrt im Organismus vorkommende 17 β -Estradiol auch Einfluss auf das Vorkommen von Atresien in den Aalmuttern hat.

Wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, reguliert sich der hormonelle Regelkreis durch die Synthese der Estrogen-Rezeptoren ausgelöst von den Estrogenen selbst. Eine Induktion der Rezeptorsynthese durch estrogen wirksame Verbindungen könnte somit zu einer Erhöhung der Estradiolkonzentration führen. Oder das Vorhandensein von estrogen wirksamen Verbindungen im Organismus und der damit verbundenen Konkurrenz an den Plasmaproteinen, die für den Transport der Estrogene verantwortlich sind, führt zu einem erhöhten Vorkommen von freiem 17 β -Estradiol im Blut und somit zu dessen vermehrtem Abbau in der Leber.

Allerdings konnten in der Galle der Aalmutter mit Atresien keine höheren Konzentrationen an beispielsweise 4*tert*-Octylphenol festgestellt werden. Hier waren die Konzentrationen der Industriechemikalie in den Aalmuttern ohne Atresien höher. Auch die Industriechemikalien Nonylphenol und Bisphenol A weisen in den Aalmuttern ohne Atresien höhere Konzentrationen auf als in den Vergleichsproben. Die folgende Abbildung 35 zeigt den Mittelwert der beiden Substanzen in den untersuchten Gallenflüssigkeiten weiblicher Aalmuttern der Station Wismar Klärwerk.

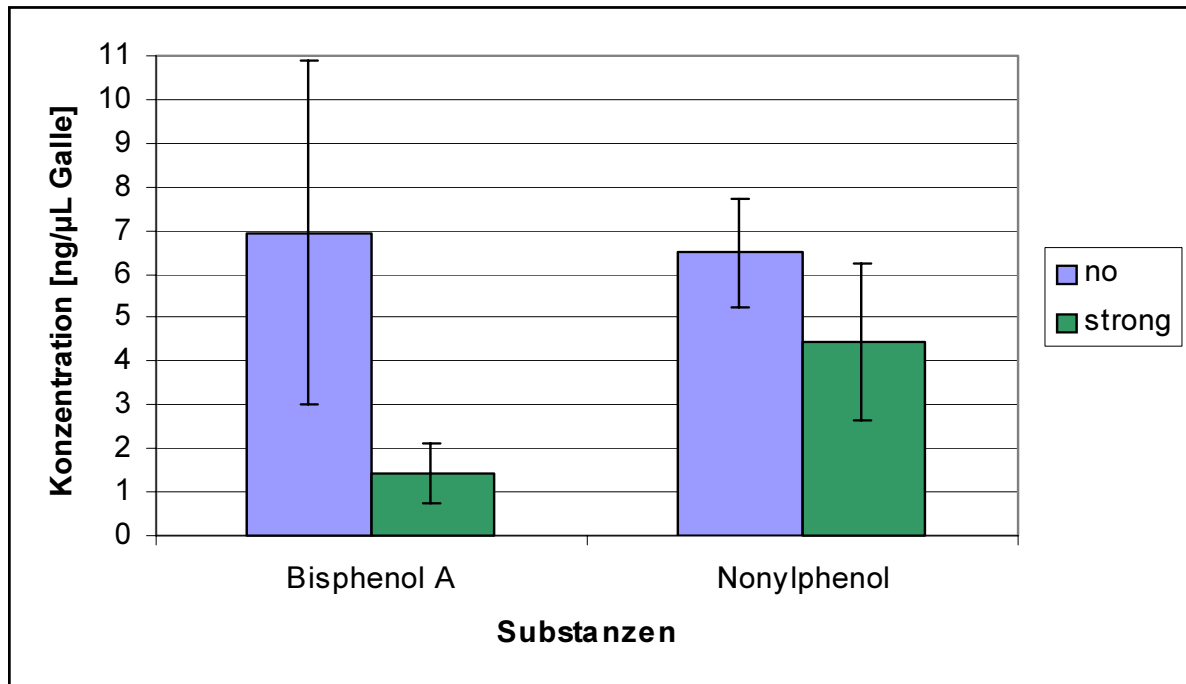


Abbildung 35: Vergleich von Nonylphenol und Bisphenol A in Gallen weiblicher Aalmuttern mit unterschiedlicher Ausprägung von Missbildungen (Nonylphenol n=4; Bisphenol A/no n=2; Bisphenol A/strong n=3).

Die zu erwartende Verteilung wie der Industriechemikalien bei den natürlichen Estrogenen in den Proben konnte hier nicht festgestellt werden. Die Konzentrationen dieser Substanzen sind in den Aalmuttergallen ohne Atresien höher als in den Fischen mit Missbildungen.

Aus den wenigen auswertbaren Messdaten ergeben sich allerdings Unsicherheiten. Eine Interpretation von einer geringen Datenmenge ist schwierig. Ebenfalls muss ein Fehler der Messdaten durch einen zu geringen Kalibrierbereich berücksichtigt werden. Aufgrund dieser sich daraus ergebenden Ungenauigkeiten sind die dargestellten Werte für Nonylphenol und Bisphenol A nur als Tendenz zu verstehen.

5.4 Vergleich der Stationen Wismar Klärwerk und Salzhaff

Für einen Vergleich der Stationen Wismar Klärwerk und Salzhaff wurde ebenfalls auf die Proben weiblicher Aalmuttern zurückgegriffen. Die für diesen Vergleich verwendeten Tiere wiesen keine Atresien auf. Diese Proben wurden gewählt, da nur von den weiblichen Tieren eine ausreichende Menge an aufgearbeiteten Proben und jeweilige Probemenge zu Verfügung stand.

Die nachfolgende Abbildung 36 zeigt den Mittelwert der Konzentrationen der natürlichen Estrogene und 4*tert*-Octylphenol von jeweils vier Proben.

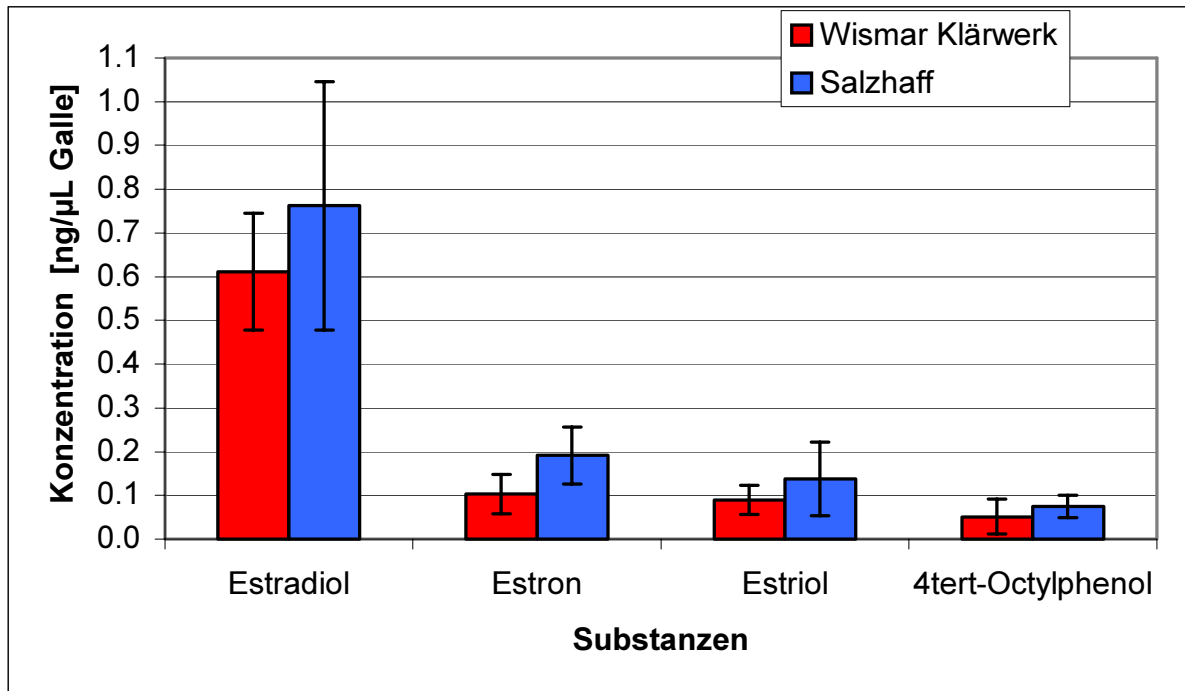


Abbildung 36: Vergleich weiblicher Aalmuttern ohne Atresien beider Stationen (n=4).

Der Abbildung 36 ist zu entnehmen, dass sowohl die natürlichen Estrogene als auch 4tert-Octylphenol in den Aalmuttern der Station Salzhaff in höheren Konzentrationen zu finden sind, als an der Station Wismar Klärwerk. Beispielsweise lagen die Konzentrationen von 17β -Estradiol in den Tieren vom Salzhaff im Mittel bei fast 0.8 ng/μL während die Tiere der Station Wismar Klärwerk nur im Mittel 0.6 ng/μL aufwiesen. Diese Ergebnisse entsprachen nicht den Erwartungen. Erwartungsgemäß sollten die niedrigeren Konzentrationen an der Station Salzhaff zu finden sein. Da Kläranlagen der Haupteintragsweg estrogen wirksamer Substanzen in die Umwelt sind (vergleiche Kapitel 2.3.2) und die Fische der Station Wismar Klärwerk in der Nähe des Klärwerks Wendorf gefangen wurde, wurde auch vermutet, dass auch in diesen Fischen eine höhere Konzentration festzustellen ist als in den Fischen der Station Salzhaff. Letztere wurde ausgewählt, weil sie von einer Kläranlage weit entfernt war. Die Messungen ergaben aber das Gegenteil. Gerade die Industriechemikalien wurden in höheren Konzentrationen an der Station Wismar Klärwerk erwartet. Aber nicht nur 4tert-Octylphenol wurde am Salzhaff in höheren Konzentrationen gefunden, auch Nonylphenol und Bisphenol A wurden in den Aalmuttern am Salzhaff mit höheren Konzentrationen bestimmt. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung 37 graphisch dargestellt.

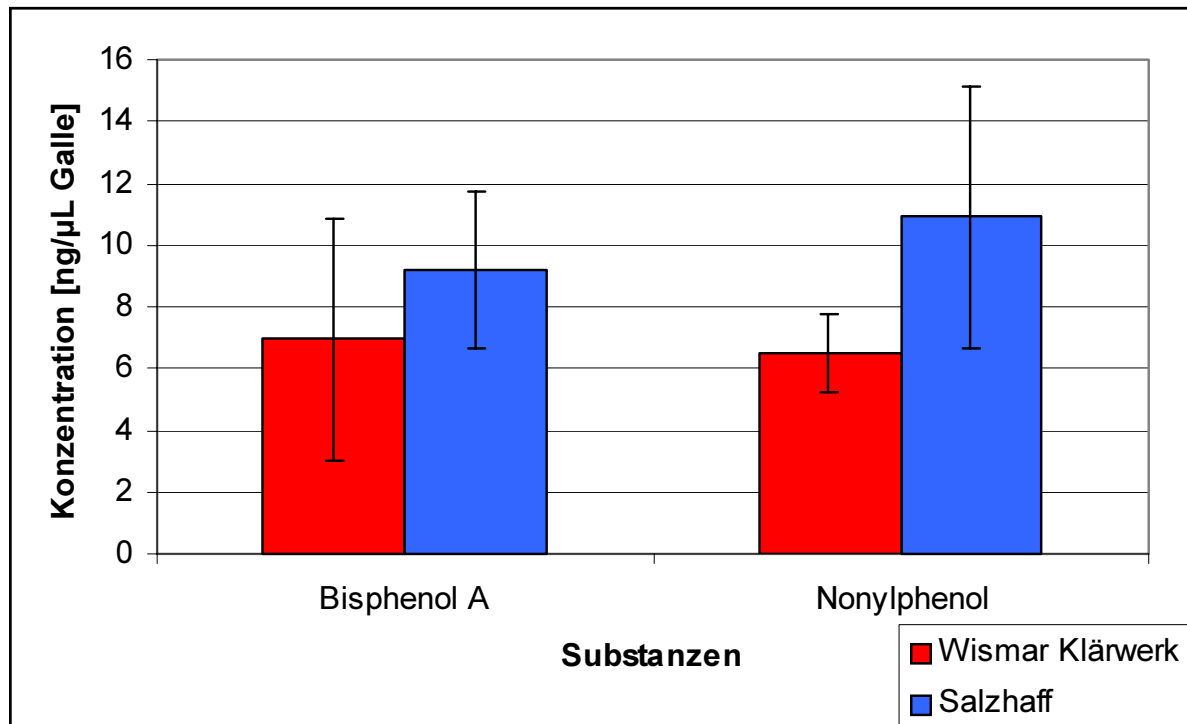


Abbildung 37: Vergleich von Industriechemikalien weiblicher Aalmuttern ohne Atresien beider Stationen (Nonylphenol n=4; Bisphenol A/Wismar Klärwerk n=2; Bisphenol A/Salzhaff n=3).

Auch diese beiden Substanzen, die ihren Haupteintragsweg ebenfalls über die Kläranlage haben, sind in den Aalmuttern der Station Salzhaff auch in höherer Konzentration als zur Vergleichsstation zu finden. Dabei wurde erwartet, diese in höheren Konzentrationen in den Tieren der Station Wismar Klärwerk vorzufinden. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse könnten andere Quellen des Eintrags dieser Estrogene und estrogen wirksamer Substanzen sein. Denkbar wäre ein Eintrag von natürlichen Estrogenen durch die an der Station Salzhaff vorherrschende Landwirtschaft. Das Aufbringen von Gülle auf die Ackerflächen und das Abfließen dieser Stoffe durch den Regen in die Ostsee, könnte ein Eintragsweg darstellen. Die höheren Werte der Industriechemikalien, die teilweise in Pestiziden Verwendung finden, können nicht auf einen Einsatz in der Landwirtschaft zurückgeführt werden. Eine andere mögliche Erklärung könnten Unterschiede innerhalb der ausgewählten Aalmuttern sein. Beispielsweise ist das Alter der Fische nicht bekannt. So könnten durch ältere Aalmuttern an der Station Salzhaff und der damit längeren Akkumulierungszeit dieser Substanzen im Gegensatz zu den Aalmuttern des Wismarer Klärwerks die Konzentrationen an erster Station erhöht sein.

Mit der geringen Probenanzahl in diesem Vergleich – maximal vier Proben je Station – können keine absoluten Aussagen getroffen werden, sondern lediglich eine Tendenz angezeigt werden. Für eine eindeutige Aussage ist die Aufarbeitung einer

größeren Probenzahl notwendig. Die Vergleiche stellen einen ersten Überblick dar. Für konkrete Aussage fehlt eine statistische Absicherung.

5.5 Vergleich mit Daten aus der Literatur

PETTERSSON ET AL. (2004) untersuchte den Zusammenhang von estrogen wirksamen Verbindungen im Abwasser von Kläranlagen und Papierindustrie und dem Vorkommen dieser Substanzen in den Gallen von Barschen (*Perca fluviatilis*).

Die folgende Tabelle 39 gibt eine Übersicht der in Schweden an zwei Stationen gefundenen Realkonzentrationen. Die angaben wurden aus dem Diagramm der Präsentation (SEATAC) abgeschätzt und stellen somit eine ungefähre Konzentration dar.

Tabelle 39: Konzentrationen ausgewählter Substanzen in verschiedenen Gallenflüssigkeiten: Barschgalle [ng/µg Gallenflüssigkeit], in Aalgalle [ng/µL Gallenflüssigkeit] und den mittleren Konzentration (n=8) in weiblichen Aalmuttern der Station Wismar Klärwerk [ng/µL Gallenflüssigkeit].

Substanz [ng/µg] bzw. [ng/µL]	Kläranlage Utansjö -Barsche (PETTERSSON ET AL. (2004))	Kläranlage Papierindustrie - Barsche (PETTERSSON ET AL. (2004))	Flüsse- Aale (Ternes et al. (2004, S.70))	Ostsee - weibl. Aalmuttern
17β-Estradiol	2	6	0.4	0.8
Estron	0.2	0.6	< BG	0.1
Genistein	-	-	0.15	n.n.
17α- Ethinylestradiol	-	-	< BG	n.n.
4tert-Octylphenol	<0.1	<0.1	-	0.05
Bisphenol A	0.5	6	-	4.2
Nonylphenol	5.4	9	-	5.5

Zu beachten bei dem Vergleich dieser Werte ist die Konzentrationsangabe. Diese liegt bei der Untersuchung von PETTERSSON ET AL (2004) in ng/µg Gallenflüssigkeit bei den Aalmuttern der Wismarer Bucht aber in ng/µL vor. Unter der Annahme, dass wässrige Gallenflüssigkeit eine Dichte von eins hat, sind die Angaben direkt vergleichbar.

Aus den Werten der Tabelle 39 ist erkennbar, dass die natürlichen Estrogene in den Barschen aus dem Kläranlagenabfluss aus Utansjö (Schweden) höhere Konzentrationen als die weiblichen Aalmuttern der Station Wismar Klärwerk aufweisen. Diese liegen doppelt so hoch wie bei den Aalmuttern. Für 4tert-Octylphenol liegen

keine genauen Konzentrationen der Barsche vor, aber es ist zu erkennen, dass diese ebenfalls Substanz im Bereich bis 0.1 ng/ μ g nachweisbar war.

Die Konzentrationen von Nonylphenol in den Barschen konnten ebenfalls in etwa gleicher Höhe in den Aalmuttern nachgewiesen werden. Die hohen Konzentrationen scheinen also nicht ungewöhnlich für Fische an Kläranlagenabläufen zu sein. Ein großer Unterschied ist allerdings bei Bisphenol A zu erkennen. Lag die Konzentration in den schwedischen Barschen nur bei ca. 0.5 ng/ μ g, wurden bei den Aalmuttern im Mittel 4.2 ng/ μ L. Das ist die achtfache Konzentration. Allerdings scheint die Konzentration von Bisphenol A abhängig von dem Einzugsgebiet der Kläranlage zu sein. Die durch eine Kläranlage eines Papierherstellers in Barschen nachgewiesene Konzentration von 6 ng/ μ g Gallenflüssigkeit übertrifft die Konzentration in den Aalmuttern um 50 %. Im Vergleich zu Barschen nach dieser Kläranlage sind die Konzentrationen nicht nur der Industriechemikalien in der Aalmutter wesentlich geringer. Mit ca. 9 ng/ μ g Nonylphenol weisen die Barsche in Schweden dort fast 4 ng mehr auf als die Aalmuttern der Station Wismar Klärwerk. Auch die natürlichen Estrogene sind mit einer sechsfach höheren Konzentration in den Barschen der Kläranlage des Papierherstellers im Vergleich zu den Aalmuttern zu finden.

TERNES ET AL. (2004, S. 70) untersuchte Gallen von Aalen aus süddeutschen Flüssen auf Estrogene und Pharmaka. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 39 aufgeführt. In diesen Gallen konnten, wie in den Aalmuttergallen, ebenfalls weder Pharmaka noch 17 α -Ethinylestradiol bestimmt werden. Von den Estrogenen konnten lediglich 17 β -Estradiol mit einer mittleren Konzentrationen von 0.40 ng/ μ L nachgewiesen werden. Der Metabolit Estron konnte zwar nachgewiesen, nicht aber bestimmt werden. In den Gallen der weiblichen Aalmuttern der Wismarer Bucht konnten im Mittel 0.72 ng/ μ L 17 β -Estradiol nachgewiesen werden. In einem Fall sogar maximal von 3.6 ng/ μ L, wobei dieser Wert aufgrund seiner auffälligen Höhe nicht im Mittelwert von 0.72 ng/ μ L eingerechnet wurde. Die Metabolite Estron und Estriol konnten im Mittel mit 0.16 ng/ μ L bzw. 0.14 ng/ μ L bestimmt werden. Damit liegen die Konzentrationen der natürlichen Estrogene in den weiblichen Aalmuttern der Wismarer Bucht höher als in den Aalen süddeutscher Flüsse. TERNES ET AL. (2004) bestimmten eine maximale Konzentration des Phytoestrogens Genistein von 0.15 ng/ μ L in Aalgalle, welches in der Aalmutter nicht nachgewiesen werden konnte. Bei diesen Zusammenstellungen ist allerdings unklar, ob hier die Vergleichbarkeit der Fischarten gegeben ist, denn es sind das Alter, das Geschlecht, das Reifestadium der Fische, die Menge an Gallenflüssigkeit sowie die Anzahl der Proben nicht bekannt. Wie schon in dem Kapitel 3.2.4 angemerkt ist ein Vergleich von Konzentrationen in Fischgallen aufgrund der unterschiedlichen Gallenflüssigkeitsmengen und individuellen Estrogenspiegel nicht ohne weiteres möglich. Wie groß der

Unterschied zwischen einem limnischen Fisch wie beispielsweise dem Aal und der marinen Aalmutter besteht, ist ebenfalls nicht geklärt. Auch wird das Alter der Fische und der damit zusammenhängenden Zeit der Akkumulation endokriner Substanzen in dem Organismus einen Einfluss haben. Nicht vernachlässigbar ist bezogen auf die natürlichen Estrogene ebenfalls der Zeitpunkt der Probenahme. Weibliche befruchtete Tiere werden im Gegensatz zu juvenilen Fischen der gleichen Art mehr natürliche Estrogene aufweisen.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit lag der Aufbau eines Extraktionsverfahrens für estrogen wirkende Substanzen aus Gallenflüssigkeiten von Aalmuttern. Die Aufgabe bestand in der Kopplung einzelner Verfahrensschritte und der Überprüfung der Geeignetheit für die Anwendung in der Praxis. Hintergrund dieser Diplomarbeit waren zum einen die Untersuchungen der Aalmutter aus der Wismarer Bucht durch Dr. Jens Gercken vom Institut für Angewandete Ökologie in Neu Broderstorf auf Missbildungen in den Tieren, die wahrscheinlich auf eine endokrine Wirkung zurückzuführen sind. Und zum anderen war diese Arbeit ein Teil des Promotionsvorhabens: „Biotest-geleitete chemische Analyse estrogen wirksamer Substanzen in der Wismarer Bucht“ von Iris-Constanze Beck.

Die Extraktion aus Gallenflüssigkeiten erfolgte dabei durch eine dreimalige Extraktion mit Ethylacetat. Diese Flüssig-Flüssig-Extraktion basierte dabei auf einer von LEGLER ET AL. (2002) veröffentlichten Methode. Der Aufreinigungsschritt mit Kieselgel und die Messmethode dieser Substanzen für die HPLC-MS/MS lagen bereits vor.

Als Ionisierungsmittel wurde letztendlich eine Konzentration von 2.5 mmol von Ammoniumacetat in den Laufmitteln Methanol und Wasser gewählt. Die verwendete Trennsäule Synergi™ 4 µ Hydro-RP 80 A der Fa. Phenomenex geschützt durch eine Vorsäule war für die Umkehrphasenchromatographie geeignet.

Zunächst wurden in Vorversuchen mit Standardlösungen sowohl in Wasser als auch in Gallenflüssigkeiten, die Parameter Wiederfindungen über das Gesamtverfahren und der Matrixeffekt dieses Versuchsaufbaus getestet werden. Die Wiederfindungen über das Gesamtverfahren aus Aalmuttergalle lagen dabei für die natürlichen Estrogene zwischen 33 und 86 % (Stdabw: 1.5–7), für die Industriechemikalien bei 19–86 % (Stdabw: 2–8) und die Pharmaka bei 58–92 % (Stdabw: 418). Anschließend erfolgt dann die Anwendung der aufeinander abgestimmten Methodenschritte auf Realproben bestehend aus Gallenflüssigkeiten von Aalmuttern der Wismarer Bucht.

Aus den vorliegenden Realproben wurden Gallenflüssigkeiten sowohl männlicher als auch weiblicher Aalmuttern der Stationen Wismar Klärwerk und Salzhaff ausgewählt. Die Proben wurden ebenfalls nach der Ausprägung der Missbildungen in den Fischen aufgearbeitet. Dafür wurde versucht, auf Extrema bezüglich der Missbildungen zurückzugreifen.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung war es möglich, die meisten untersuchten Analyte in realen Proben zu detektieren und größtenteils auch zu

quantifizieren. Die Untersuchungen ergaben hohe Konzentrationen von Nonylphenol und Bisphenol A in den Gallenflüssigkeiten unabhängig vom Standort, Missbildungsausprägung und Geschlecht. Die Konzentrationen der natürlichen Estrogene unterschieden sich erwartungsgemäß zwischen den männlichen und weiblichen Tieren. Auch war ein Konzentrationsunterschied der natürlichen Estrogene in Bezug auf das Vorkommen der Missbildungen festzustellen. In Tieren ohne Missbildungen lagen geringere Konzentrationen der natürlichen Estrogene vor als in den Tieren mit starken Missbildungen. Für die Industriechemikalien konnte dieser Unterschied nicht festgestellt werden. Pharmaka, Phytoestrogene und das synthetische Estrogen 17α -Ethinylestradiol konnten in keiner Realprobe nachgewiesen werden.

Aufgrund der zeitlich begrenzten Bearbeitungszeit, welche für eine Diplomarbeit zur Verfügung steht, war es leider nicht mehr möglich, umfangreiche Untersuchungen von Aalmuttergallen verschiedener Stationen und Missbildungsausprägungen durchzuführen. Dies musste auf acht Proben je Station und Geschlecht begrenzt werden, weshalb keine generelle Aussage über den Gehalt von estrogen wirksamen Substanzen in Aalmuttern der Wismarer Bucht gemacht werden können.

Zur Steigerung der Aussagekraft von Gallenuntersuchungen ist es notwendig, eine ausreichende Menge an Gallenflüssigkeiten je Probe und genug Proben für die entsprechende Ausprägung der Missbildung in den Tieren vorliegen zu haben. Die Aussagekraft ist abhängig von der Anzahl der untersuchten Proben. Es lagen nicht genügend Proben von den einzelnen Stationen je Missbildungsausprägung vor, so dass ein genereller Vergleich von nur wenigen Proben nicht gegeben war. Da jede Probe einzeln aufgearbeitet und vermessen wurde, kann es zu Schwankungen der Mittelwerte aufgrund der individuell vorherrschenden Matrix kommen. Eventuell ist bei dem Nichtvorhandensein von genügend Probenmaterial an ein „poolen“ der Proben denkbar. Damit wäre durch die dadurch entstehende mehrfache Wiederholung der Aufarbeitung der Probenaliquote eine Kontrolle der Einzelaufarbeitungen möglich.

Eine Vervollständigung des Verfahrens zum Nachweis estrogen wirksamer Substanzen in Gallenflüssigkeiten ist durch das Verwenden unterschiedlicher Enzyme machbar. Durch das Inkubieren mit nur einem in ausreichender Menge vorliegenden Enzym, der β -Glucuronidase, konnten auch hauptsächlich die glucuronidierten Metabolite der gesuchten Analyte nachgewiesen werden. Es lag auch ein geringer Anteil an Aryl-Sulfatase in der Enzymlösung vor. Eine Überprüfung der vollständigen Umsetzung der sulfatiert vorliegenden Substanzen wurde aber nicht vorgenommen. Es ist unwahrscheinlich in der Galle die gesuchten Substanzen in frei vorliegender Form vorzufinden, da die Galle die Substanzen beinhaltet, die nach dem Metabolismus in der Leber entstehen. Da für viele Substanzen der genaue

Abbau in der Leber nicht bekannt ist und damit auch nicht angegeben werden kann, zu welchen Anteilen die entsprechenden Metabolite entstehen, ist es zur Bestimmung der Gesamtmenge der untersuchten Substanz notwendig, mit mehreren Enzymen in der Aufarbeitung zu arbeiten. Zwar stellt die Glucuronidierung den Hauptmetabolismusweg der untersuchten Substanzen dar, doch sollten auch die Glutathionkonjugation und die Sulfatierung als Metabolismusweg ebenfalls berücksichtigt werden. Auch wurden die Gallen lediglich beispielsweise nach Nonylphenol als Muttermolekül untersucht. Da aber Nonylphenol nur ein Endprodukt der verschiedenen Abbauewege von Nonylphenolpolyethoxylaten aus Tensiden darstellt, ist es so nicht möglich die gesamte Menge an Tensidrückständen in den Fischen festzustellen.

Für weiterführende Versuche ist es notwendig, die Proben so auszuwählen, dass die untersuchten Tiere ein vergleichbares Alter aufweisen. Durch einen Altersunterschied könnte es zu einer unterschiedlichen Akkumulierungszeit von Substanzen in den Tieren kommen, was die Ergebnisse verzerren würde.

Auch ist auf eine ausreichende Dotierung besonders der Industriechemikalien zur Bestimmung des Matrixeffektes zu achten. Durch eine Dotierung unterhalb der Realkonzentration kann der Matrixeffekt für diese Substanz nicht bestimmt werden. Der Matrixeffekt hat bei Gallenproben aber einen großen Einfluss und muss daher berücksichtigt werden.

Umfangreichere Untersuchungen zu einer möglichen Korrelation der Missbildungsausprägung und dem Gehalt an estrogen wirkenden Substanzen in der Galle mit mehr Probematerial wäre ein interessantes Projekt, das durch das Kombinieren mehrerer Studien zu einer umfassenden Untersuchung wird.

Interessant wäre auch eine Untersuchung in wieweit der Aufenthaltsort des Fisches ausschlaggebend für den Gehalt in der Galle ist. Dafür könnten planktonfressende Fische aus dem mittlern Wasserbereich mit Fischen des Bodengrundes verglichen werden.

Denkbar wäre ebenfalls eine Erweiterung des Substanzspektrums, um weitere synthetische Estrogene wie beispielsweise Mestranol und endokrin wirksame Pestizide in die Missbildungsproblematik von Fischen in der Wismarer Bucht mit einzuschließen.

7 LITERATUR

ADLER P., STEGER-HARTMANN T., KALBFUS W. (2001): *Vorkommen natürlicher und synthetischer östrogenen Steroide in Wässern des süd- und mitteldeutschen Raumes.* In: *Acta hydrochimica et hydrobiologica* **29** (4): 227–241.

AHEL M., McEVOY J., GIGER W. (1993): *Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms.* In: *Environmental Pollution* **79**: 243–248.

AHEL M., SCULLY F. E. JR, HOIGNÉ J., GIGER W. (1994): *Photochemical degradation of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in natural waters.* In: *Chemosphere* **28** (7): 1361–1368.

AHERNE G. W., BRIGGS R. (1989): *The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment.* In: Pharmaceutical Press, Wallingford/Oxon: *Journal of pharmacy and pharmacology* **41**: 735–736.

APPLIED BIOSYSTEMS (2002): Foliensammlung zum *Trainingskurs am API 3000*, 02.–04.07 2002, Langen

ARGE ELBE (2000): *Endokrin wirksame Stoffe in der Elbe, in Nebenflüssen und der Nordsee.* Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe (Hrsg).

ARGE ELBE (2003): *Arzneistoffe in der Elbe und Saale.* In: Internet: www.arge-elbe.de/wge/Download/Berichte/03Arzn.pdf vom 03.05.2004.

ARUKWE A., THIBAUT R., INGEBRIGTSEN K., CELIUS T., GOKSØYR A., CRAVEDI J.-P. (1999): *In vivo an in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (Salmo salar).* In: *Aquatic Toxicology* **49** (249): 289–304.

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.* In: *The Science of the Total Environment* **225**: 101–108.

BENGTSSON, VON WESTERNHAGEN (1996): *Beeinträchtigung der Fortpflanzung bei Fischen.* In: Lozán, Lampe, Matthäus, Rachor, Rumohr, von Westernhagen (Hrsg): *Warnsignale aus der Ostsee*, Parey Buchverlag Berlin: 217–221.

BLOCK J., WÖSTEN M. A. D.(2000): *Source and environmental fate of natural estrogens*. In: Report Association of River Waterworks – RIWA Amsterdam.

BOLT H. M., DEGEN G. H. (2000): *Hormoneeffekte von Chemikalien in Nahrung und Umwelt*. In: Chemie in unserer Zeit **34** (1): 30–37.

BOLZ U. (2000): *Entwicklung und Anwendung von GC/MS-Methoden zum Nachweis phenolischer Xenoöstrogene sowie natürlicher und synthetischer Estrogenen in aquatischen Umweltproben unter Berücksichtigung einer wirkungsbezogenen Analytik (E-Screen-Assay)*. Dissertation an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

BOLZ U., KUCH B., KÖRNER W., METZGER J.W. (2002): *Verhalten von estrogenen Substanzen während des Abwasserreinigungsprozess*. In: Pharmaka und Hormone in der aquatischen Umwelt – eine Bedrohung? Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft, Band 168: 37–58

BROTONS J. A., OLEA-SERRANO M.F., VILLALOBOS M., PEDRAZA V., OLEA N. (1995): *Xenoestrogens released from Lacquer Coatings in food cans*. In: Environmental Health Perspectives **103**: 608–612.

BRUHN T., GÜLDEN M., LUDEWIG S., SEIBERT H. (1999): *Einstufung von Schadstoffen als endokrin wirksame Substanzen*. Forschungsbericht des BMU Nr.: 29761001/08.

BUA 222 (2000): *Genistein, Modellstoff zur Beschreibung endokriner Wirkung von Phytoöstrogenen*. Gesellschaft deutscher Chemiker (Hrsg): Beratergremium für Altstoffe (BUA) Stoffbericht Nr. 222.

BUA 228 (2001): *Biologische Bedeutung synthetischer und natürlicher endokriner Stoffe – Auswirkung auf die menschliche Gesundheit?* Gesellschaft deutscher Chemiker (Hrsg): Beratergremium für Altstoffe (BUA) Stoffbericht Nr. 228.

CLARKE D.J., GEORGE S. G., BURCHELL B. (1991): *Glucuronidation in fish*. In : Aquatic Toxicology **20**: 35–56.

COLBORN T., SAAL VOM F.S., SOTO A.M. (1993): *Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans*. In: Environmental Health Perspectives **101** (5): 378–384.

DI CORCIA A. (1998): *Characterisation of surfactants and their biointermediates by liquid chromatography-mass spectrometry*. In: Journal of Chromatography A **794**: 165–185.

DORKA C. (2004): *Nachweis ausgewählter Pharmaka in Oberflächenwasser der Ostsee mittels Festphasenanreicherung und HPLC-MS/MS*. Diplomarbeit an der Universität Lüneburg/Forschungszentrum GKSS.

DORN P. B., CHOU C.-S., GENTEMPO J. J. (1987): *Degradation of bisphenol A in natural waters*. In: *Chemosphere* **16** (7): 1501–1507.

DÖTSCH J., DÖRR H.G., WILDT L. (2001): *Exposure to Endogenous Estrogens During Lifetime*. In: Metzler M. (Hrsg): *Endocrine Disruptors Part 1, Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 3, Anthropogenic Compounds Part L*, Springer-Verlag, Heidelberg: 81–99.

DRAISCI R., PALLESCHI L., FERRETTI E., MARCHIAFAVA C., LUCENTINI L., CAMMARATA P. (1998): *Quantification of 17 β -estradiol residues in bovine serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionisation*. In: *The Analyst* **123**: 2605–2609.

EKELUND R., BERGMANN Å., GRANMO Å., BERGGREN M. (1990): *Bioaccumulation of 4-Nonylphenol in Marine Animals – A Re-evaluation*. In: *Environmental Pollution* **64**: 107–120.

FALBE J., REGITZ M. (Hrsg) (1995): *CD RÖMPP CHEMIE LEXIKON., korrigierte und verbesserte Ausgabe des Römpp Chemie Lexikons auf CD-ROM, Version 1.0*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

FALANDYSZ J., YAMASHITA N., TANABES., TATSUKAWA R., RUCIŃSKA L., MIZERA T, JAKUCZUM B. (1994): *Congener-Specific Analysis of Polychlorinated Biphenyls in White-Tailed Sea Eagles *Haliaeetus albililla* Collected in Poland*. In: *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **26**: 13–22.

FENT K. (1998): *Ökotoxikologie – Umweltchemie Toxikologie Ökologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York 1998.

FENT K. (2000): *Hormonaktive Stoffe in Gewässern: auch eine Gefahr fürs Trinkwasser?* In: *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* **91**: 11–25.

FERREIRA-LEACH A. M. R., HILL E. M. (2001): *Bioconcentration and distribution of 4-tert-octylphenol residues in tissues of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*. In: *Marine Environmental Research* **51**: 75–89.

FRAUNHOFER INSTITUT (2004): *Massenspektrometrie Gerätetypen des IVV für die organische Analytik*. In: Internet: <http://www.ivv.fhg.de/ms/ms-einfuehrung.html> vom 04.06.2004.

FRY D. M. (1995): *Reproductive Effects in Birds Exposed to Pesticides and Industrial Chemicals*. In: *Environmental Health Perspectives* **103**: 165–171.

GAIDO K. W., LEONARD L. S., LOVELL S., GOULD J.C., BABAĀ D., PORTIER C. J., McDONNELL D. P. (1997): *Evaluation of Chemicals with Endocrine Modulating Activity in a Yeast-Based Steroid Hormone Receptor Gene Transcription Assay*. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* **143**: 205–212.

GERCKEN J., SORDYL H. (2001): *Evidence of Effects of Environmental Hormones on Organisms in the Baltic Sea*. In: Umweltbundesamt (Hrsg.): *Proceedings, 2nd Status-seminar endocrine disrupters*, Berlin 2.–4. April 2001.

GERCKEN J., SORDYL H. (2002): *Intersex in feral marine and freshwater fish from northeastern Germany*. In: *Marine Environmental Research* **54**: 651–655.

GEYER H. J., RIMKUS G. G., SCHEUNERT I., KAUNE A., SCHRAMM K.-H., KETTRUP A., ZEEMAN M., MUIR D. C. G., HANSEN L. G., MACKAY D. (2000): *Bioaccumulation and Occurrence of Endocrine-Disrupting Chemicals (EDC's), Persistent Organic Pollutants (POP's) and Other Organic Compounds in Fish and Other Organisms Including Humans*. In: Beek B. (Hrsg.): *Handbook of Environmental Chemistry Vol 2, Part J, Bioaccumulation*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2000.

GIES A., GOTTSCHALK C., GREINER P., HEGER W., KOLOSSA M., RECHENBERG B., ROSSKAMP E., SCHROETER-KERMANI C., STEINHÄUSER K., THROL C. (2001): *Nachhaltigkeit und Vorsorge bei der Risikobewertung und beim Risikomanagement von Chemikalien*. In: BUA (Hrsg.): *Umweltchemikalien, die auf das Hormonsystem wirken – Belastungen, Auswirkungen, Minderungsstrategien – Teil II*, Internet: <http://www.umweltdaten.de/down-d/chempol2.pdf> vom 23.02.2004.

GILLESBY B. E., ZACHAREWSKI T. R. (1998): *Exoestrogens: Mechanisms of action and strategies for identification and assessment*. In: *Environmental Toxicology and Chemistry* **17** (1): 3–14.

GÖTZ R., SIEVERS S., ROCH K. (1998): *Endokrin wirksame Stoffe und andere Schadstoffe in Fischen aus Hamburger Gewässern*. In: Freie und Hansestadt Hamburg Umweltbehörde (Hrsg.): *Hamburger Umweltberichte*, S. 7–11.

GREEN, J. M. (1996): *A Practical Guide to Analytical Method Validation*. In: Analytical Chemistry News & Features: 305–309A.

GREEN, T., SWAIN C., VAN MILLER J.P., JOINER R.L. (2003): *Absorption, bioavailability, and metabolism of para-nonylphenol in the rat*. In: Regulatory Toxicology And Pharmacology **38**: 43–51.

GREIM (1998): *Hormonähnlich wirkende Stoffe in der Umwelt*. In: Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium **46** (1): 63–66.

GUILLETTE L. J. JR., GROSS T. S., MASSON G. R. (1994): *Developmental Abnormalities of the Gonad and Abnormal Sex Hormone Concentrations in Juvenil Alligators from Contaminated and Control Lakes in Florida*. In: Environmental Health Perspect **102**: 680–688.

GUILLETTE L. J. JR., CRAIN D. A., ROONEY A. A., PICKFORD D.B. (1995): *Organization versus Activation: The Role of Endocrine-disrupting Contaminants (EDCs) during Embryonic Development in Wildlife*. In: Environmental Health Perspectives **103** (7): 157–164.

GÜLDEN M., TURAN A., SEIBERT H. (1997): *Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern*. In: Forschungsbericht des BMU, Nr: 10204279.

GÜNTHER (1998): *Isomerspezifische Ultraspurenanalytik von Nonylphenol in umwelt-relevanten Biomatrices. Tag der Tenside Leipzig 1998*. In: Fresenius' Journal of analytical Chemistry **216**: M54–M55.

HEBERER T., STAN H. J. (1998): *Arzneimittelrückstände im aquatischen System. Wasser & Boden*, **50** (4) :20–25.

HEISTERKAMP I. (2003): *Biotest-geleitete chemische Analyse östrogen wirksamer Substanzen in Oberflächengewässern*. Dissertation an der Universität Lüneburg.

HELANDER B., OLSSON M., REUTERGÄRDH L. (1982): *Residue levels of organochlorine and mercury compounds in unhatched eggs and the relationships to breeding success in white-tailed sea eagles Haliaeetus albicilla in Sweden*. In: Holarctic Ecology **5**: 349–366.

HELMREICH B. (2001): *Endokrin wirksame Stoffe in aquatische Systemen. Wasser & Boden* **53/1+2**: 4–9.

- HOCK B., ROTHE S., SEIFERT M.** (2000): *Hormone in der Umwelt – die Tests im Überblick*. In: Nachrichten aus der Chemie **48**: 918–924.
- HOUDE F., DEBLOIS C., BERRYMAN D.** (2002): *Liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of nonylphenol polyethoxylates and nonylphenol carboxylic acids in surface water*. In: Journal of Chromatography A **961**: 245–256.
- HUANG C.-H., SEDLAK D.L.** (2001): *Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry*. In: Environmental Toxicology and Chemistry **20** (1): 133–139.
- INOUE K., KAWAGUCHI M., OKADA F., TAKAI N., YOSHIMURA, Y., HORIE M., IZUMI, S., MAKINO T., NAKAZAWA H.** (2003): *Measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human urine by column-switching liquid chromatography-mass spectrometry*. In: Analytica Chimica Acta **486**: 41–50.
- JAHNKE A.** (2003): *Bestimmung von Alkylphenoethoxylaten und deren Abbauprodukten in Kläranlagen mittels HPLC-MS/MS*. Diplomarbeit an der Universität Lüneburg/Forschungszentrum GKSS.
- JEANNOT R., SABIK H., SAUVARD E., DAGNAC T., DOHRENDORF K.** (2002): *Determination of endocrine -disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry*. In: Journal of Chromatography A **974**: 143–159.
- JOBLING S., SUMPTER J. P.** (1993): *Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout hepatocytes (Oncorhynchus mykiss)*. In: Aquatic Toxicology **27**: 361–372.
- JOBLING S., NOLAN M., TYLER C. R., BRIGHTY G., SUMPTER J. P.** (1998): *Widespread Sexual Disruption in Wild Fish*. In: Environmental Science and Technology **32**: 2498–2506.
- JOBLING S., CASEY D., RODGERS-GRAY T., OEHLMANN J., SCHULTE-OELMANN U., PAWLOWSKI S., BRAUNBECK T., TURNER A. P., TYLER C. R.** (2003): *Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent*. In: Aquatic Toxicology **65**: 205–220.
- JOHNSON A. C., BELFROID A., DI CORCIA A.** (2000): *Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent*. In: The Science of the Total Environment **256**: 163–173.

KALBFUS W. (1998): *Exposition und Wirkung endokriner Substanzen im aquatischen System.* In: Wiener Mitteilungen **153**: 33–44.

KLOAS W. (1998): *Endokrin wirksame Substanzen: Eine Gefahr für aquatische Systeme?* In: Weigert B., Steinberg C., Brüggemann R. (Hrsg.): Chemische Stressfaktoren in aquatischen Systemen, Schriftreihe Wasserforschung **6**: 35–45

KLOAS W. (2001): Wirkungen von endokrin wirksamen Stoffen (endocrine disruptors) auf Fische und Amphibien. In: Wasser & Boden **53/1+2**: 16–21.

KNÖRR S.B.M. (2001): Ökotoxikologische Untersuchung zur Wirksamkeit endokrin aktiver Substanzen auf Fische. Dissertation an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

KÖRNER W., SPENGLER P., BOLZ U., SCHULLER W., HANF V., METZGER J. W. (2001): *Substances with estrogenic activity in effluent of sewage treatment plants in southwestern Germany 2. Biological analysis.* In: Environmental Toxicology and Chemistry **20** (10): 2142–2151.

KRISHNAN A. V., STAHIS P., PERMUTH S. F., TOKES L., FELDMAN D. (1993): *Bisphenol A: An Estrogenic Substance Is Released from Polycarbonate Flasks during Autoclaving.* In: Endocrinology **132** (6): 2279–2286.

KUCH H.M., BALLSCHMITER K. (2001): *Determination of Endocrine-Disrupting Phenolic Compounds and Estrogens in Surface and Drinking Water by HRGC-(NCl)-MS in the Picogram per Liter Range.* In: Environmental Science & Technology **35** (15): 3201–3206.

KUIPER G. G. J. M., LEMMEN J. G., CARLSSON B., CORTON J. C., SAFE S. H., SAAG VAN DER P. T., BURG VAN DER B., GUSTAFSSON J.-Å. (1998): *Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β .* In: Endocrinology **139** (10):4252–4263.

KULLING S. E., WATZL B. (2003): *Phytoöstrogene, Basiswissen aktualisiert.* In: Ernährungs-Umschau **50** (6), Internet: <http://www.bfa-ernaehrung.de/Bfe-Deutsch/Information/pflanzenstoffe/artikel10.pdf>: bfaernaehrung.pdf vom 16.06.2004.

KUNTZSCH A. (2000): *Untersuchungen des Einfluss endokrin wirksamer Verbindungen aus der Umwelt auf die Fertilität der Frau.* Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- LABADIE P., BUDZINSKI H. (2004): *Sex steroid levels in juvenile turbot (Scophthalmus maximus) exposed to waterborne contaminants under laboratory conditions*. SEATAC-Präsentations-Handout, 14 th Annual Meeting, Prag 2004.
- LAI K. M. ; JOHNSON K. L. (2000): *Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems*. In: Environmental Science & Technology **34** (18): 3890–3894.
- LAMOREE M. H., BOOIJ P., CENIJN P. H., HENRIQUES M. H., CORREIA A. D., FREITAS S. (2004): *Exposure of juvenil sea bass to bisphenol A: actual exposure concentrations and occurrence of bisphenol A in fish bile*. SEATAC-Präsentations-Handout, 14 th Annual Meeting, Prag 2004.
- LARSSON D. G. J., ADOLFSSON_ERICI M., PARKKONEN J., PETTERSSON M., BERG A. M., OLSSON P-E., FÖRLIN L. (1999): *Ethinylestradiol - an undesired fish contraceptive*. In: Aquatic Toxicology **45**: 91–97.
- LECH J. J., LEWIS S. K., REN L. (1996): *In Vivo Estrogenic Activity of Nonylphenol in Rainbow Trout*. In: Fundamental and Applied Toxicology **30**: 229–232.
- LEGLER J., JONAS A., LAHR J., DICK VETHAAK A., BROUWER A., MURK A. J. (2002): *Biological Measurement of estrogenic activity in urine an bile conjugates with the in vitro ER-CALUX reporter gene assay*. In: Environmental Toxicology and Chemistry **21** (3): 473–479.
- LEHMANN (2002): *Arzneimittel in Gewässern Baden-Württembergs*. In: Kolloquium der Abteilung Wasser und Boden: „Arzneimittel in der aquatischen Umwelt“ vom 06. November 2002 in Karlsruhe, Internet: http://www.lfu.baden-wuerttemberg.de/lfu/abt4/fliessgewaesser/themen/vortrag_arzneimittel_lehmann.pdf vom 27.07.2004.
- LOPEZ DE ALDA M.J.; BARCELÓ D. (2000): *Determintation of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection*. In: J. of Chromatography A **892**: 391–406.
- LOPEZ DE ALDA M.J.; BARCELÓ D. (2001a): *Determintation of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection*. In: Journal of Chromatography A **911**: 203–210.
- LOPEZ DE ALDA M.J.; BARCELÓ D. (2001b): *Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste water*. In: Fresenius' Journal of analytical Chemistry **371**: 437–447.

MERSMANN P. (2003): *Transport- und Sorptionsverhalten der Arzneimittelwirkstoffe Carbamazepin, Clofibrinsäure, Diclofenac, Ibuprofen und Propyphenazon in der wassergesättigten und -ungesättigten Zone*. Dissertation an der Technischen Universität Berlin.

METZLER M., PFEIFFER, E. (2001): *Chemistry of Natural and Anthropogenic Endocrine Active Compounds*. In: Metzler M. (Hrsg.): *Endocrine Disruptors Part 1, Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 3, Anthropogenic Compounds Part L*, Springer-Verlag, Heidelberg 2001: 63–80

MORTIMER C. E. (1987): *Chemie, Das Basiswissen der Chemie*. 5. völlig neu überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 1987.

NAU (1994): *Toxikokinetik*. In: Marquardt H., Schäfer S.G. (Hrsg.): *Lehrbuch der Toxikologie*. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim: 49.

NEIDHART B., ALBUS H.-E. (2001): *Illustriertes Glossar zur analytischen Terminologie*. GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH. Übersetzung von: *Glossary of Analytical Terms*“ mit Genehmigung des Springer-Verlages.

NIESSEN W. M. A. (1998): *Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry*. In: *Journal of Chromatography A* **812**: 53–75.

ORLANDO E. F., GUILLETTE JR L.J. (2002): *Developmental and Reproductive Abnormalities Associated with Endocrine Disruptors in Wildlife*. In: Metzler M. (Hrsg.): *Endocrine Disruptors Part 2, Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 3, Anthropogenic Compounds Part M*, Springer-Verlag, Heidelberg 2002: 249–270.

OTTO M. (2000): *Analytische Chemie*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim

PARKKONEN J., LARSSON M., ADOLFSSON-ERICI M., PETTERSSON M. BERG A. H., OLSSON P.-E., FÖRLIN L. (2000): *Contraceptive pill residues in sewage effluent are estrogenic to fish*. In: *Marine Environmental Research* **50**: 198.

PEDERSEN R. T., HILL E. M. (2002): *Tissue Distribution and Depuration of 4-tert-Octylphenol Residues in Cyprinid Fish, *Scardinius erythrophthalmus**. In: *Environmental Science & Technology* **36 (15)** : 3275–3283.

PEDERSEN S.N., LINDHOLST C. (1999): *Quantification of the xenoestrogens 4-tert-octylphenol and bisphenol A in water and fish tissue based on microwave assisted*

extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry In: Journal Of Chromatography A **864**: 17–24.

PETTERSSON M., ASPLUND L., HAHLEBECK E., BENGTSSON B.-E. (2004): *Endocrine disrupting substances in fish sampled in receiving waters of sewage treatment plants and pulp and paper mill industries in Sweden*. SEATAC-Präsentations-Handout, 14 th Annual Meeting, Prag 2004.

PFLUGER P., WASSERRAB B., O'BRIEN E., PRIETZ A., SPENGLER P., SCHNEIDER C., HEUBLER A., SCHMID T., KNÖRZER B., METZGER J. W., DIETRICH D. R. (2001): *Entwicklung und Validierung von in vitro Prüfsystemen zum Nachweis von endokrin wirksamen Fremdstoffen: Chemisch-analytische Überprüfung und biologischer Nachweis von potentiell endokrin wirksamen Stoffen in Kläranlagenausläufen bzw. Vorflutern*. In: Uni Konstanz: Abschlussbericht, Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BWPLUS), Internet: <http://www.xfaweb.baden-wuerttemberg.de/fofaweb/print/OE98004SBer.pdf> vom 23.08.2004.

PHENOMENEX (2003): Produktbeschreibung der Produktserie Synergi™, 237–249

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*. In: Chemistry and Ecology **8**: 275–285.

RÀFOLS C., ROSÉS M., BOSCH E. (1997): *A comparison between different approaches to estimate the aqueous pK_a values of several non-steroidal anti-inflammatory drugs*. In: Analytica Chimica Acta **338**: 127–134.

RASMUSSEN T. H., ANDREASSEN T. K., PEDERSEN S. N., VAN DER VEN L. T. M., BJERREGAARD P., KORSGAARD B. (2002): *Effects of waterborne exposure of octylphenol and oestrogen on pregnant viviparous eelpout (*Zoarces viviparus*) and her embryos in ovario*. In: Journal of Experimental Biology **205**: 3857–3876.

REEMTSMA T. (2001): *The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation-mass spectrometry in water analysis- Part I: Achievements*. In: Trends in Analytical Chemistry **20** (9): 500–517.

SACHER F. (2002): *Arzneimittelrückstände in Wasser*. In: Pharmaka und Hormone in der aquatischen Umwelt – eine Bedrohung? Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft, Band 168: 59–71.

SACHER F., LOCHOW E., BETHMANN D., BRAUCH H.-J. (1998): *Vorkommen von Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächengewässern*. In: Vom Wasser **90**: 233–243.

- SACHER F.**, Lange F. T. , Brauch H.-J., Blankenhorn I. (2001): *Pharmaceuticals in groundwaters. Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany.* In: Journal of Chromatography A **938**: 199–210.
- SAFE S. H.** (1995): *Environmental and Dietary Estrogens and Human health: Is There a Problem?* In: Environmental Health Perspectives **103** (4): 346–351.
- SAFE S. H.**, Gaido K. (1998a): *Phytoestrogens and anthropogenic estrogenic compounds.* In: Environmental Toxicology and Chemistry **17** (1): 119–126.
- SAKAMOTO H.**, YOKOTA H., KIBE R., SAYAMA Y., YUASA A. (2002): *Excretion of bisphenol A-glucuronide into the small intestine and deconjugation in the cecum of the rat.* In: Biochimica et Biophysica Acta **1573**: 171–176.
- SARMAH A. K.**, NORTHOTT G. L. (2004): *Animal wastes as a potential source of steroid hormones: A New Zealand perspective* SEATAC-Präsentations-Handout, 14 th Annual Meeting, Prag 2004
- SCHIEWER S.**, MEUSER K., WINTGENS T. (2001): *Verfahrenstechnische Aspekte des Verhaltens von endokrinen Substanzen in Kläranlagen.* In: Wasser & Boden **53**/1+2: 10–15.
- SCHREIBER A.** (2001): *Untersuchungen zum Ionisierungs- und Fragmentierungsverhalten umweltrelevanter Substanzen bei der HPLC/MS-Kopplung. Aufbau und Nutzung von HPLC/MS- Spektrenbibliotheken.* Dissertation an der Universität Leipzig, Shaker Verlag Aachen.
- SCHULTE-OELMANN U.**, STROBEN E., FIORONI P., OEHLMANN J. (1996a): *Beeinträchtigung der Reproduktionsfähigkeit limnischer Vorderkiemerschnecken durch das Biozid Tributylzinn.* In: Lozán/Kausch (Hrsg): Warnsignale aus Flüssen und Ästuaren, Parey Buchverlag Berlin 1996: 249–255.
- SCHULTE-OELMANN U.**, OELMANN J., WATERMANN B., BAUER B., FIORONI I., FIORONI P. (1996b): *Effekte von Tributylzinn (TBT) aus Antifoulinganstrichen auf Schneckenpopulationen in der Ostsee.* In: Lozán, Lampe, Matthäus, Rachor, Rumohr, von Westernhagen (Hrsg): Warnsignale aus der Ostsee, Parey Buchverlag Berlin 1996: 176–179.
- SCHWEINFURTH H.**, LÄNGE R., MIKLAUTZ H., SCHAUER G. (1997): *Umweltverhalten und aquatische Toxizität von Ethinylestradiol.* In: Bayerische Landesanstalt für Wasserforschung (Hrsg): Stoffe mit endokriner Wirkung im Wasser. R. Oldenbourg, München, 1997:39–54.

- SHARPE R. M., SKAKKEBAEK N.E.** (1993): *Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproduction tract?* In: *The Lancet* **341**: 1392–1395.
- SHORE L. S., GUREVITZ M., SHEMESH M.** (1993): *Estrogen as an Environmental Pollutant.* In: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **51**: 361–366.
- SNYDER R. W., MANESS S. C., GAIDO K. W., WELSCH F., SUMNER S. C. J., FENNELL T. R.** (2000): *Metabolism and Disposition of Bisphenol A in Female Rats.* In: *Toxicology and Applied Pharmacology* **168**: 225–234.
- 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.* In: *Environmental Science & Technology* **33** (16): 2814–2820.
- SNYDER S.A., KEITH T.L., PIERENS S.L., SNYDER E.M., GIESY J.P.** (2001b): *Bioconcentration of nonylphenol in fathead minnows (Pimephales promelas).* In: *Chemosphere* **44**: 1697–1702.
- SOTO A. M., LIN T.-M., JUSTICIA H., SILVIA R.M., SONNENSCHNEIN C.** (1992): *An „in culture“ bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (e-screen).* In: Colborn and Clement (Hrsg): *Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The wildlife/Human Connection.* Princetown: 295–310.
- SPENGLER P.** (2001): *Identifizierung und Quantifizierung von Verbindungen mit östrogenen Wirkung im Abwasser.* Dissertation an der Universität Stuttgart.
- SPENGLER P., METZGER J. W.** (2002): *Organische Spurenstoffe, Restemission Kläranlagenabläufen.* In: *Pharmaka und Hormone in der aquatischen Umwelt – eine Bedrohung?*, Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft, Band 168: 25–36.
- SPENGLER P., KÖRNER W., METZGER J. W.** (2001): *Substances with estrogenic activity in effluent of STP in southwestern Germany 1. Chemical analysis.* In: *Environmental Toxicology and Chemistry* **20** (10): 2133–2141.
- STAN H. J., HEBERER T.** (1997): *Pharmaceuticals in the aquatic environment.* In: *Analysis Magazin* **25**: 20–23.
- STAPLES C. A., DORN P. B., KLECKA G. M., O'BLOCK S. T., HARRIS L. R.** (1998): *A review of the environmental effects and exposures of bisphenol A.* In: *Chemosphere* **36** (10): 2149–2173.

- STUMPF M.**, TERNES T.A., HABERER K., BAUMANN W. (1996): *Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässer*. In: Vom Wasser **87**: 251–261
- SUMPTER J. P.** (1995a): *Feminized responses in fish to environmental estrogens*. In: Toxicology Letters **82/83**: 737–742.
- SUMPTER J. P.** (1998): *Xenoendocrine disrupters – environmental impacts*. Toxicology Letters **102–103** : 337–342.
- SUMPTER J. P.** (2002): *Endocrine Disruption in the Aquatic Environment*. In: Metzler M. (Hrsg): Endocrine Disruptors Part 2, Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 3, Anthropogenic Compounds Part M, Springer-Verlag, Heidelberg: 271–289.
- SUMPTER J. P.**, JOBLING S. (1995b): *Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment*. In: Environmental Health Perspectives **103 (7)**: 173–178.
- SUMPTER J. P.**, JOBLING S., TYLER C. R. (1996): *Oestrogenic substances in the aquatic environment and their potential impact on animals, particularly fish*. In: Taylor E.W. (Hrsg.): Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological Molecular and Cellular Approaches: 205–224.
- TERNES T. A.** (1998a): *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers*. In: Water Research **32** (11): 3245–3260.
- TERNES T.A.** (1998b): *Abbau und Verhalten von Pharmaka in aquatischen Systemen*. In: Weigert, Steinberg, Brüggemann (Hrsg): Schriftreihe Wasserforschung Band 6 Chemische Stressoren in aquatischen Systemen. Berlin: 23–32.
- TERNES T. A.** (2001a): *Pharmaka und endokrin wirksame Verbindungen in Gewässer*. In: Internet: <http://www.uni-mainz.de/~eswe/bericht1.html> vom 17.01.2001.
- TERNES T. A.** (2001b): *Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples*. In: Trends In Analytical Chemistry **20** (8): 419–432.
- Ternes T. A.** (2001c): *Vorkommen von Pharmaka in Gewässern*. In: Wasser & Boden 53/4: 9–14.
- TERNES T. A.**, KRECKEL P., MUELLER J. (1999a): *Behavior and occurrence of estrogens in municipal STP – II. Aerobic batch experiments with activated sludge*. In: The Science of the Total Environment **225**: 91–99.

- TERNES T. A., STUMPF M., MUELLER J., HABERER K., WILKEN R.-D., SERVOS M. (1999b): *Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil*. In: *The Science of the Total Environment* **225**: 81–90.
- TERNES T. A., WEIL H., SEEL P. (2004): *Belastungen von Fischen mit verschiedenen Umweltchemikalien in unterschiedlichen Hessischen Gewässern*. Vergleichende Studie 1999–2000. Hessisches Landesamt für Umwelt und Geologie. In Bearbeitung.
- THIBAUT R., DEBRAUWER L., RAO D., CRAVEDI J.-P. (1998): *Disposition and Metabolism of [³H]-4-n-Nonylphenol in Rainbow Trout*. In: *Marine Environmental Research*. **46**: 521–524.
- THIBAUT R., DEBRAUWER L., RAO D., CRAVEDI J.-P. (1999): *Urinary metabolites of 4-n-nonylphenol in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)*. In: *The Science of the Total Environment* **233**: 193–200.
- THIBAUT R., MONOD G., CRAVEDI J.-P. (2002): *Residues of 14C-4-n-nonylphenol in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) oocytes and embryos during dietary exposure or mature females to this xenohormone*. In: *Marine Environmental Research* **54**: 685–689.
- TRIEBSKORN W., ADAM S., BOLZ U., HONNEN W., KÖHLER H.-R., LUCKENBACH T., SCHWAIGER J, SILIGATO S., KÖRNER W. (2002): *Projekt VALIMAR. Expositions- und Effektmonitoring Fliessgewässer Baden-Württembergs*. In: *Pharmaka und Hormone in der aquatischen Umwelt – eine Bedrohung? Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft, Band 168*: 83–102.
- TRUSCOTT B. (1983): *Steroid Metabolism in Fish, II. Testosterone Metabolites in the Bile of the Marine Winter Flounder *Pseudopleuronectes americanus* and the Freshwater Atlantic Salmon *Salmo salar**. In: *General and Comparative Endocrinology* **51**: 460–470.
- TYLER C. R., JOBLING S., SUMPTER J. P. (1998): *Endocrine Disruption in Wildlife: A Critical Review of the Evidence*. In: *Critical Reviews in Toxicology* **28** (4): 319–361.
- UPMEIER A. (2001): *Toxikokinetik von östrogenartig wirkenden Industriechemikalien und Phytoöstrogenen*. Dissertation an der Universität Dortmund.
- USDA-DATENBANK (2004): *Isoflavone in Lebensmitteln*. In: Internet: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isoflav.html> vom 23.05.2004.

- VILLENEUVE D. L., VILLALOBOS S. A., KEITH T. L., SNYDER E. M., FITZGERALD S. D., GIESY J. P. (2002): *Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol on plasma sex steroid and vitellogenin concentrations in sexually mature male carp (Cyprinus carpio)*. In: *Chemosphere* **47**: 15–28.
- WARD W. E.; THOMPSON L. U. (2001): *Dietary Estrogens of Plant and Fungal Origin: Occurrence and Exposure*. In: M. Metzler (Hrsg.): *Endocrine Disruptors Part 1, Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 3, Anthropogenic Compounds Part L*, Springer-Verlag, Heidelberg: 101–128.
- WEGENER G., PERSIN J., KARRENBROCK F., RÖDEN O., HÜBNER I. (1999): Vorkommen und Verhalten von natürlichen und synthetischen Östrogenen und deren Konjugaten in der aquatischen Umwelt. In: *Vom Wasser* **92**: 347–360.
- WELSHONS W. V., THAYER K. A., JUDY B. M., TAYLOR J. A., CURRAN E. M., SAALO VOM F. S. (2003): Large Effects from Small Exposures I. Mechanism for Endocrine-Disrupting Chemicals with Estrogenic Activity. In: *Environmental Health Perspectives* **111**: 994–1006.
- WELTIN D., BILITEWSKI B. (2001): Mobilität endokrin wirksamer Substanzen im Boden nach Klärschlammaufbringung. In: *Wasser & Boden* **53/1+2**: 22–26.
- WELTIN D., GEHRING M., TENNHARDT L. VOGEL D., BILITEWSKI B. (2002): *Transportverhalten von endokrinen Substanzen im Feststoffprodukt aus anaeroben Klärschlammbehandlungen*. In: Bilitewski B., Werner P. (Hrsg): *3. Fachtagung Anaerobe biologische Abfallbehandlung. 04.-06-02 2002 Dresden, Schriftreihe des Instituts für Abfallwirtschaft und Altlasten der TU Dresden, Band 19; Pirna Eigenverlag: 169–197.*
- WHITE R., JOBLING S., HOARE S. A., SUMPTER J. P., PARKER M.G. (1994): *Environmentally Persistent Alkylphenolic Compounds Are Estrogenic*. In: *Endocrinology* **135** (1): 175–182.
- WIESE T. E., KELCE W. R. (1997): *An introduction to environmental oestrogens*. In: *Chemistry and Industry*: 648–653.
- YING G. G., KOOKANA R. S., RU Y.-J. (2002): *Occurrence and fate of hormone steroids in the environment*. In: *Environment International* **28** : 545–551.
- YOON Y., WESTERHOFF P., SNYDER S.A., ESPARZA M. (2003): *HPLC-fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α -ethinylestradiol on powdered activated carbon*. In: *Water Research* **37**: 3530–3537.

ZITTERMANN A. (2002): *Phytoöstrogene*. In: Wissenschaftliches Symposium der deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V.: Moderne Lebensmittel: in Zukunft nur noch mit Zusatznutzen? 11./12. September 2002 Bad BonnGGodesberg Internet: http://www.dge.de/Media/PDF/Abstract_Phytoestrogene_Dr_Armin_Zittermann.pdf

8 ANHANG

8.1 Übersichtstabellen: Verwendete Chemikalien und Geräte

8.1.1 Die Chemikalien

Im Folgenden sind Übersichtstabellen der verwendeten Chemikalien und der Konzentrationen der Dotierungsstandards aufgeführt. Die Standardlösungen und ihre Reinheit sind in Kapitel 3.1.1 aufgeführt.

Tabelle 40: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Name	Reinheit	Firma
2-Propanol	pro anaysi	Merck
Aceton	Picograde	Promochem
Ammoniumacetat	Fractopur®	Merck
Dichlormethan	Picograde	Promochem
Essigsäure	pro analysi 100 %	Merck
Ethanol	pro anaysi	Merck
Ethylacetat	SupraSolv®	Merck
Justierlösung pH-Meter	Titrisol, pH5,pH7, pH10	Merck
Kieselgel	Kieselgel 60, 0.063–0.200 mm	Merck
Methanol	SupraSolv®	Merck
Methyl-<i>tert</i>-Butylether	SupraSolv®	Merck
Natriumacetat-Trihydrat	Reag. Ph. Eur.	Merck
Salzsäure	Suprapur® 30 %	Merck
β-Glucuronidase	Typ: H-3, 145700 units/mL aus <i>Helix promatia</i>	Sigma
β-Estradiol, 17β-D-Glucuronid	enthält 2 mol/mol H ₂ O	Sigma
Ethanol	pro anaysi	Merck
Glycin	pro analysi	Merck
Natriumacetat-Trihydrat	Reag. Ph. Eur.	Merck
Natriumchlorid	pro analysi	Merck
Phenolphthalein	Reag. Ph. Eur.	Merck
Phenolphthalein-mono-β-Glucuronsäure	enthält 2 mol/mol H ₂ O aus <i>Kaninchenurin</i>	Sigma

8.1.2 Verwendete Dotierungslösungen

Tabelle 41: Konzentrationen der Dotierungsstandardlösungen.

Substanzen	Dotierungsstandardlösungen [ng/L]			
	20ng/ μ L	5ng/ μ L	1 ng/ μ L	0,5ng/ μ L
17β-Estradiol	21.40	4.279	1.070	0.535
Estron	20.66	4.131	1.033	0.516
Estriol	20.28	4.056	1.014	0.507
Genistein	20.36	4.072	1.018	0.509
Daidzein	21.14	4.228	1.057	0.528
17α-Ethinylestradiol	21.44	4.288	1.072	0.536
4tert-Octylphenol	21.59	4.318	1.079	0.540
Bisphenol A	15.82	3.164	0.791	0.396
Nonylphenol	60.00	12.00	3.000	1.500
Gemfibrozil	24.66	4.932	1.233	0.617
Bezafibrat	21.58	4.316	1.079	0.540
Diclofenac	25.65	5.129	1.282	0.641
Carbamazepin	32.66	6.532	1.633	0.817
Dihydrocarbamazepin	21.94	4.389	1.097	0.549
Estradiol D3	21.27	4.255	1.064	0.532
Bisphenol A D16	21.34	4.268	1.067	0.533

8.1.3 Die verwendeten Geräte

Es folgt eine Liste mit den in dieser Arbeit verwendeten Geräten.

Tabelle 42: Übersicht über die verwendeten Geräte.

Gerät	Name	Firma
AutoSampler	Agilent 1100 G1313A 0	Agilent Technologies
Einenggefäße	1,5 mL mit Graduierung	Wheaton
Flüssigkeitschromatographiesäule	Synergi™ 4 μ Hydro-RP 80 A	Phenomenex
Flüssigkeitschromatographiesystem	HP 1100	Agilent Technologies
Glasgefäße	Bechergläser, Kolben etc.	Schott, Brand
HPLC-Ofen	Agilent 1100 G1316A 0	Agilent Technologies
HPLC-Pumpe	Agilent 1100 G1312A 0	Agilent Technologies

Tabelle 43: Übersicht über die verwendeten Geräte (Fortsetzung).

Gerät	Name	Firma
Ionenquelle	Turbo Ion Spray zum API3000 und API4000	Applied Biosystems/MDS Sciex
Lösungsmittelentgaser	Agilent 1100 G1322A 0	Agilent Technologies
Massenspektrometer	Triple Quadrupole LC/MS/MS Massenspektrometer API3000 und API4000	API3000 : Perkin-Elmer Sciex Instruments API4000: Applied Biosystems/MDS Sciex
Messvial	250 µL, 1,5 mL	Abimed
Messvialdeckel	8 mm, 11 mm	Supelco
Mikroliterspritzen	100 µL, 500 µL, 1000 µL	Hamilton
Pasteurpipetten		Brandt
pH-Meter	PH 91	WTW (Wiss.-Techn.-Werkstätten)
Reinstwasseranlage	Milli-Q Plus 185, Elix 5	Millipore
Rotationsverdampfer	Rotavapor R200 Heating Bath B-490 Pumpe CVC2000	Büchi Büchi vacuubrand
Schraubdeckelglasvials	7 mL, 11 mL, mit Teflon Liner	Supelco
Schüttelinkubator	GFL 3031	Gesellschaft f. Labortechnik mbH
Stickstoffgenerator API3000	75-72	Whatman
Stickstoffgenerator API4000	Reihe API Systems	Peak Scientific
Stirrer	Relax top	Heideoloph
TCS-Probenaufbereitungssystem	Vapotherm mobil Trockentemperiersystem zur Aufkonzentrierung	Labor Technik Barkey
Transferpettoren	2.5–10 µL, 5–25 µL, 25–100 µL	Brandt
UV-Spektrometer	UV-1601 PC	Shimadzu
Vorsäule	Security Guard™ C18 4x2mm	Phenomenex
Waage	AE 163	Mettler
Zentrifuge	Contifuge 17S, Rotor 8570	Heraeus Sepatech
Zentrifugengläser	10 mL	Schlee

8.2 Übersichtstabellen: Vorkommen estrogen wirkender Substanzen und Pharmaka in der Umwelt

In diesem Kapitel sind Tabellen mit Studien über estrogen wirkenden Substanzen in der Umwelt aufgeführt.

8.2.1 Vorkommen in Flüssen

Tabelle 44: Konzentrationen von Estrogenen und estrogen wirksamen Stoffen in Oberflächengewässern.

Ort [ng/L]	E2	E1	EE2	NP	BP A	4tert-OP	Referenz
Rhein, Neckar und Donau				42-110	12-150		SACHER (2002)
Elbe und Nebenflüsse				7-52	9-125	0.4-6.3	ARGE ELBE (2000)
Deutsche Flüsse	0.15-3.6	0.1-4.1	0.1-5.1	6.7-134	0.5-14	0.8-54	KUCH ET AL. (2001)
Süddeutschland 9 Flüsse	-	-	2-4				STUMPF ET AL. (1996)
Deutsche Flüsse	-	1.6	-				TERNES ET AL. 1999b

Tabelle 45: Konzentrationen von Pharmaka in Oberflächengewässern, [ng/L].

Substanzen	Neckar	Rhein	Elbe	Elbe
Carbamazepin	290	180	170	1.1
Diclofenac	200	150	420	1.20
Bezafibrat	190	67	75	3,1
Gemfibrozil	36	45	220	0.51
Referenz	SACHER (2002)	SACHER (2002)	SACHER ET AL. (1998)	TERNES (1998a)

8.2.2 Vorkommen in Kläranlagenabläufen

Tabelle 46: Konzentrationen von Estrogenen und estrogenwirksamen Stoffen gemessen in Ausläufen von Kläranlagen in ng/L.

Ort [ng/L]	E2	E1	EE2	NP	BPA	4t-OP	Gen.	Referenz
Deutschland	15	37	19	3100	1000			SPENGLER ET AL. (2002)
Schweden	1.1	5.8	4.5	840	490			LARSSON ET AL. (1999)
Hamburg				42-170	18-33			HEISTERKAMP (2003)
Deutschland	0.15-5.2	0.35-18	0.1-8.9	25-770	4.8-47	2.2-73		KUCH ET AL. (2001)
Deutschland	21	-	62					STUMPF ET AL. (1996)
Kalifornien	0.2-4.1		0.2-2.4					HUANG ET AL. (2001)
Deutschland	0.003	0.07	0.015					TERNES ET AL. (1999b)
Niederlande	<0.3-5.5	<0.1-3.4	<0.1-4.3					BELFROID ET AL. (1999)
Michigan	<0.1-2.7		<0.05-0.5	269-1190		5-81		SNYDER ET AL. (1999)
Schweden	1.1	5.8	4.5	840	490			PARKKONEN ET AL. (2000)
England			<1-7					AHERNE ET AL. (1989)
Deutschland	1.1-15	0.2-22	0.4-12				2.7-38	SPENGLER ET AL. (2001)

8.2.3 Vorkommen in Trinkwasser

Tabelle 47: Trinkwasseranalysen (FENT 2000), verändert.

Substanz	Ort	Jahr	Konzentration [ng/L]
17β-Estradiol	Deutschland	1995	<1
Estron	Deutschland	1995	<1
Estriol	Deutschland	1995	<1
17α-Ethinylestradiol	Deutschland	1977/1996	0.3-22.5/<1
Bisphenol A	USA	1997	<10-40
Nonyl-, Octylphenol	USA	1998	<20-32900

8.3 API3000

In diesem Kapitel sind die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie die Parametereinstellungen der gemessenen Substanzfragmente des API3000 dargestellt.

8.3.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

In folgender Tabelle sind die instrumentellen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des API3000 angegeben. Dabei erfolgte die Messung mit Laufmitteln, denen 0.6 mmol Ammoniumacetat und 0.6 mmol Essigsäure zugesetzt waren.

Tabelle 48: Instrumentelle Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Quantifier am API3000, Bestimmung mit Standardlösungen.

Substanzen	LOD [pg/10 μ L]	LOQ [pg/10 μ L]	LOD [pg/ μ L]	LOQ [pg/ μ L]
17β Estradiol	69.4	231	6.93	23.1
Estron	18.0	60.1	1.80	6.01
Estriol	68.9	229	6.89	23.0
Genistein	4.85	16.2	0.48	1.62
Daidzein	1.06	3.52	0.11	0.35
17α-Ethinylestradiol	307	1023	30.7	102
4-tert-Octylphenol	106	356	10.7	35.6
Bisphenol A	172	573	17.2	57.4
Nonylphenol (techn. Mix.)	135	450	13.5	45.0
Gemfibrozil	28.5	94.9	2.85	9.49
Bezafibrat	2.76	9.20	0.28	0.92
Diclofenac	2.74	9.14	0.27	0.91
Carbamazepin	1.60	5.33	0.16	0.53
Dihydrocarbamazepin	0.87	2.89	0.09	0.29
Estradiol D3	158	529	15.9	52.9
Bisphenol A-D16	1020	3403	102	340

8.3.2 Messparameter API3000

Tabelle 49: MS/MS- Parameter untersuchten Estrogene und estrogen wirkenden Substanzen am API3000.

Substanz	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MRM	NEB	CUR	IS (V)	CAD	TEM (°C)	EP (V)	DP (V)	FP (V)	CE (V)	CXP (V)
17β-Estradiol		271.2	145.0	9	11	-4000	5	250	-10	-91	-240	-58	-9
			183.0									-56	-3
Estron		269.1	145.0	9	11	-4000	5	250	-10	-86	-250	-52	-7
			142.9									-78	-7
Estriol		287.3	145.0	9	11	-4000	5	250	-10	-101	-240	-62	-7
			170.9									-52	-13
Genistein	271.0		91.0	9	11	4400	4	250	10	76	170	63	6
			153.1									39	10
Daidzein	255.1		199.1	9	11	4400	4	250	10	66	180	37	14
			152.2									61	10
17α-Ethinylestradiol		295.2	145.0	9	11	-4000	5	250	-10	-101	-280	-54	-7
			142.9									-74	-11
4tert-Octylphenol		205.2	132.9	9	11	-4000	5	250	-10	-56	-140	-34	-7
			116.9									-82	-7
Bisphenol A		227.1	211.9	9	11	-4000	5	250	-10	-101	-270	-30	-15
			132.9									-32	-7
Nonylphenol (techn. Mix)		219.0	132.9	9	11	-4000	5	250	-10	-61	-160	-42	-7
			116.9									-84	-5

Tabelle 50: MS/MS- Parameter untersuchter Pharmaka und interner Standards am API3000.

Substanz	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MRM	NEB	CUR	IS	CAD	TEM	EP	DP	FP	CE	CXP
Gemfibrozil		249.5	120.8	9	11	-4000	5	250	-10	-31	-100	-22	-7
			126.8										
Bezafibrat	362.2		316.1	9	11	4400	4	250	10	51	140	23	10
			139.0										
Diclofenac	296.2		214.0	9	11	4400	4	250	10	31	90	47	14
			250.1										
Carbamazepin	237.1		194.0	9	11	4400	4	250	10	46	120	29	10
			179.0										
Dihydrocarbamazepin	239.2		194.0	9	11	4400	4	250	10	46	120	33	12
			179.1										
EstradiolD3		274.2	145.0	9	11	-4000	5	250	-10	-91	-240	-56	-7
			185.0										
Bisphenol A D16		242.2	142.9	9	11	-4000	5	250	-10	-91	-210	-36	-7
			97.0										

8.4 Ergebnisse des Enzymtests

Im Folgenden sind Tabellen mit den Messdaten des Enzymtests zur Überprüfung der Aktivität der β -Glucuronidase aufgeführt.

Tabelle 51: Messdaten zur Berechnung der Kalibriergrade des Enzymtests ($y = 0.0119x - 0.0471$).

Messung	Blank	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4
1	0.009	0.154	0.293	0.413	0.611
2	0.008	0.152	0.293	0.412	0.61
3	0.009	0.152	0.292	0.412	0.609

Tabelle 52: Messdaten der dreifachen Enzymaktivitätsbestimmung.

Messung	Test 1	Test 2	Test 3	Blank 1	Blank 2	Blank 3
1	0.287	0.296	0.324	0.01	0.011	0.01
2	0.287	0.295	0.324	0.01	0.011	0.01
3	0.286	0.295	0.324	0.01	0.011	0.01

8.5 Ergebnistabellen der Untersuchung von Realproben

Dieses Kapitel beinhaltet Ergebnistabellen von den Messungen der Aalmuttergallen aus der Wismarer Bucht. Zunächst werden die Matrixeffekte aufgeführt. Es folgen die Rohdaten der Gehalte an estrogen wirkenden Stoffen in den Gallenflüssigkeiten.

8.5.1 Der Matrixeffekt

Tabelle 53: Matrixeffekte der Substanzen in den weiblichen Aalmuttergallen der Station Wismar Klärwerk [%].

Missbildungen:	no	no	no	no	strong	strong	strong	strong
Probemenge [μ L]:	80	80	100	100	100	100	100	100
Probe-Nr.:	44	45	53	61	43	49	50	52
Substanzen [%]								
17 β -Estradiol	18.1	21.8	20.8	22.9	21.3	26.0	18.3	15.6
Estron	28.6	30.1	28.2	31.4	34.8	35.6	28.1	26.4
Estriol	34.0	29.4	26.9	32.1	33.8	31.4	30.5	28.5
Genistein	28.6	33.5	38.9	36.0	44.0	41.3	42.4	46.4
Daidzein	31.9	40.8	55.7	47.1	51.3	56.4	54.4	55.9
17 α -Ethinylestradiol	17.0	17.4	15.4	16.9	21.1	17.7	17.4	15.9
4tert-Octylphenol	80.5	67.2	53.5	73.5	87.3	70.7	67.3	73.9
Bisphenol A	-7.9	81.8	3.1	14.5	71.3	18.5	44.9	29.9
Nonylphenol	87.6	72.3	70.0	67.7	93.7	87.8	51.3	102.4
Gemfibrozil	71.1	71.7	66.3	68.7	86.8	81.8	74.8	71.4
Bezafibrat	26.9	39.1	46.9	45.9	49.1	46.4	48.3	50.6
Diclofenac	17.4	21.7	29.5	29.5	26.1	26.8	29.5	35.7
Carbamazepin	61.0	85.0	98.7	103	80.4	105	114	121
Interne Standards								
Dihydrocarbamazepin	57.3	93.6	118	100	88.1	119	124	135
Estradiol D3	18.1	22.2	18.2	21.5	24.8	24.4	19.0	16.0
Bisphenol A D16	60.6	56.3	53.2	46.9	64.5	57.3	47.0	33.9

Tabelle 54: Matrixeffekte der Substanzen in den weiblichen Aalmuttergallen der Station Salzhaff [%].

Missbildungen:	no	no	no	no	no	low	low >mod	mod
Probemenge [μ L]:	100	50	75	60	60	25	45	75
Probe-Nr.:	152	171	173	179	190	186	174	176
Substanzen [%]								
17 β -Estradiol	19.0	26.1	24.8	26.3	42.3	37.9	32.8	20.7
Genistein	34.1	69.1	65.8	86.0	78.9	86.0	70.8	58.3
Daidzein	48.7	88.2	98.0	109	97.6	106	79.7	71.0
Estron	24.8	34.2	33.5	34.3	47.3	47.9	42.0	22.4
Estriol	27.8	32.4	33.8	30.6	45.1	40.9	36.0	18.5
17 α -Ethinylestradiol	19.2	18.2	19.3	22.7	30.3	24.3	22.6	19.6
4tert-Octylphenol	66.9	75.2	80.6	67.0	83.6	76.0	69.8	59.8
Bisphenol A	23.5	-1.7	44.3	39.9	14.9	25.8	80.0	27.5
Nonylphenol	50.0	75.4	75.4	-51.9	57.0	91.4	85.1	26.3
Gemfibrozil	66.1	79.7	83.8	92.6	95.5	93.1	90.4	64.9
Bezafibrat	35.1	67.8	73.7	94.8	90.5	99.1	68.3	51.2
Diclofenac	23.6	53.7	57.6	71.6	59.2	68.6	48.4	40.9
Carbamazepin	71.2	126	133	147	154	146	93.6	111
Interne Standards								
Dihydrocarbamazepin	88.3	139	155	113	135	130	99.0	109
Estradiol D3	21.1	21.6	22.4	18.8	36.4	32.1	27.5	22.5
Bisphenol A D16	65.2	58.9	65.4	44.1	56.9	58.1	63.8	48.8

Tabelle 55: Matrixeffekte der Substanzen in den männlichen Aalmuttergallen der Station Wismar Klärwerk [%].

Missbildungen:	no	no	no	no	no	low	low	mod
Probemenge [μ L]:	50	80	45	80	43	60	58	100
Probe-Nr.:	51	46	47	62	66	40	54	48
Substanzen [%]								
17 β -Estradiol	37.2	31.0	43.5	32.0	37.0	34.9	36.0	29.7
Genistein	35.9	40.6	53.8	43.5	52.1	46.8	45.4	49.5
Daidzein	61.6	56.5	62.9	68.5	69.7	53.7	57.8	56.9
Estron	43.1	37.8	47.9	41.1	40.6	42.0	40.9	33.2
Estriol	49.6	46.4	49.5	56.6	49.2	46.7	50.3	40.6
17 α -Ethinylestradiol	30.8	26.3	32.3	29.7	29.6	27.2	27.2	27.3
4tert-Octylphenol	78.4	67.4	90.4	80.1	89.0	80.6	83.3	74.4
Bisphenol A	55.4	-6.1	133.1	36.6	62.8	160	62.8	70.0
Nonylphenol	92.7	48.8	63.4	102	94.9	53.8	79.6	52.0
Gemfibrozil	90.6	78.4	88.2	95.4	96.5	82.7	83.3	72.7
Bezafibrat	71.5	65.5	75.0	77.1	79.2	65.7	66.7	61.4
Diclofenac	31.9	34.3	45.8	43.4	47.6	45.4	38.7	43.8
Carbamazepin	62.3	57.2	63.3	66.0	69.8	58.6	62.3	56.7
Interne Standards								
Dihydrocarbamazepin	64.6	64.7	62.6	68.8	71.6	68.0	63.5	61.8
Estradiol D3	40.4	33.4	45.5	30.2	40.7	42.3	36.9	32.2
Bisphenol A D16	54.1	69.2	85.9	52.0	57.5	81.0	46.8	65.4

Tabelle 56: Matrixeffekte der Substanzen in den männlichen Aalmuttergallen der Station Salzhaff [%].

Missbildungen:	no	no	no	no	low	low	mod	strong
Probemenge [μ L]:	30	28	80	38	25	38	25	18
Probe-Nr.:	153	154	157	164	168	169	183	178
Substanzen [%]								
17 β -Estradiol	23.9	32.3	22.8	31.7	27.0	24.4	26.5	34.8
Genistein	60.2	57.7	55.3	80.3	80.3	102	81.0	94.2
Daidzein	66.1	67.9	64.2	80.8	94.0	121	85.5	110
Estron	33.3	42.2	31.4	39.4	36.6	-2.8	36.1	44.5
Estriol	29.7	36.1	32.4	33.6	32.1	31.4	29.8	41.7
17 α -Ethinylestradiol	23.5	24.3	19.9	27.9	22.8	22.0	21.1	28.4
4tert-Octylphenol	82.4	73.7	79.8	91.4	72.8	90.7	78.9	93.8
Bisphenol A	65.6	36.2	48.9	82.5	41.2	105.4	70.3	62.4
Nonylphenol	68.0	66.1	91.9	111	104	115	80.6	101
Gemfibrozil	85.2	90.1	84.8	99.8	86.6	96.8	84.7	95.8
Bezafibrat	66.5	70.9	60.2	80.4	95.3	113	92.6	117
Diclofenac	58.1	65.0	60.1	90.4	75.0	120	89.1	111
Carbamazepin	73.6	85.0	82.7	108	117	141	106	138
Interne Standards								
Dihydrocarbamazepin	66.8	86.2	89.5	97.1	172	158	137	129
Estradiol D3	24.9	38.8	25.9	35.3	33.4	26.4	29.5	39.4
Bisphenol A D16	64.9	74.9	68.5	81.3	102	110	101	107

8.6 Ausgewählte Chromatogramme

Die folgenden sechs Abbildungen zeigen ausgewählte Chromatogramme zum einen von einer Kalibrierstandardlösung und zum anderen von sowohl dotierter als auch undotierter Realprobe (Probe 49). Es sind jeweils Chromatogramme des positiven und negativen Messmodus dargestellt.

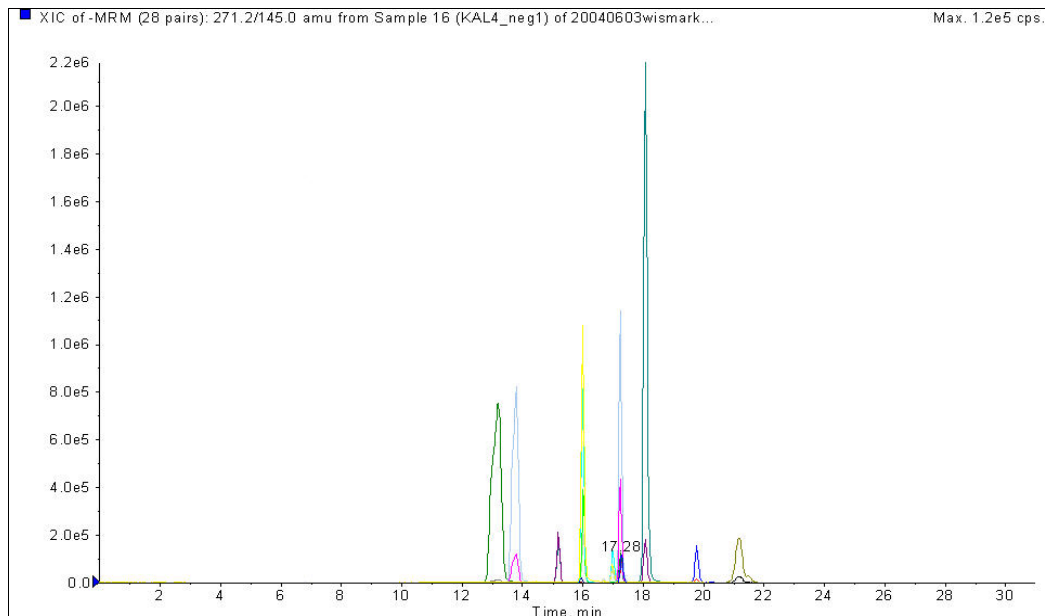


Abbildung 38: Chromatogramm des Kalibrierstandards Nr. 4 (0,25ng/ μ L) im negativen Messmodus.

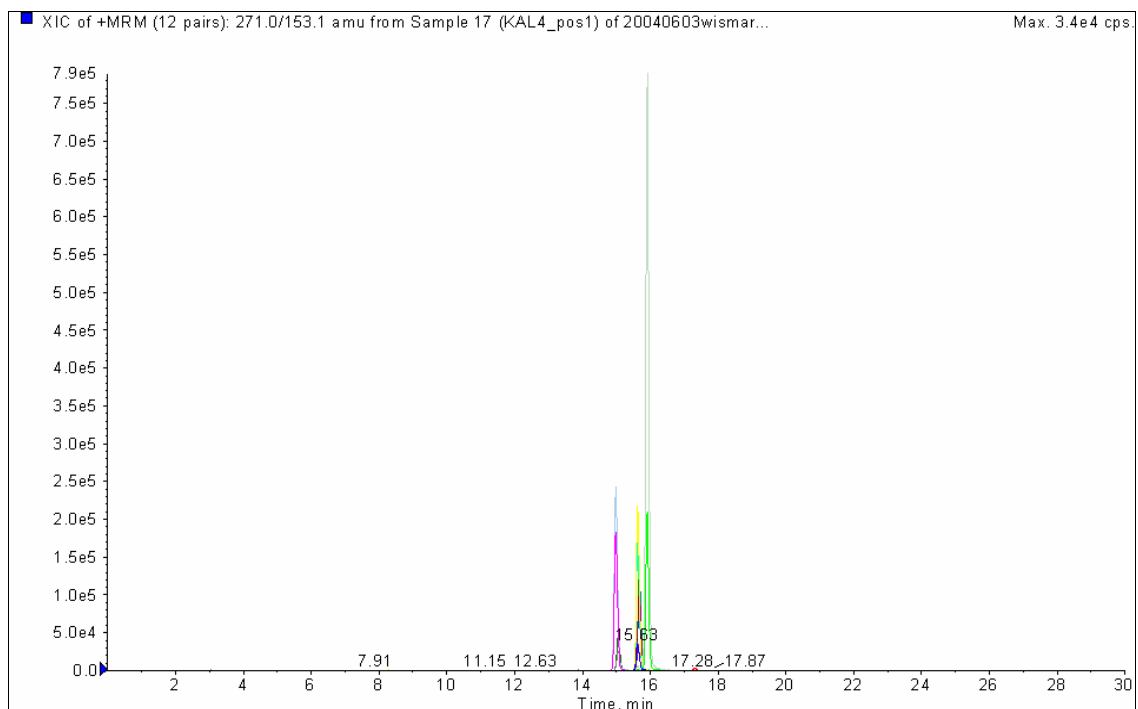


Abbildung 39: Chromatogramm des Kalibrierstandards Nr. 4 (0,25ng/ μ L) im positiven Messmodus.

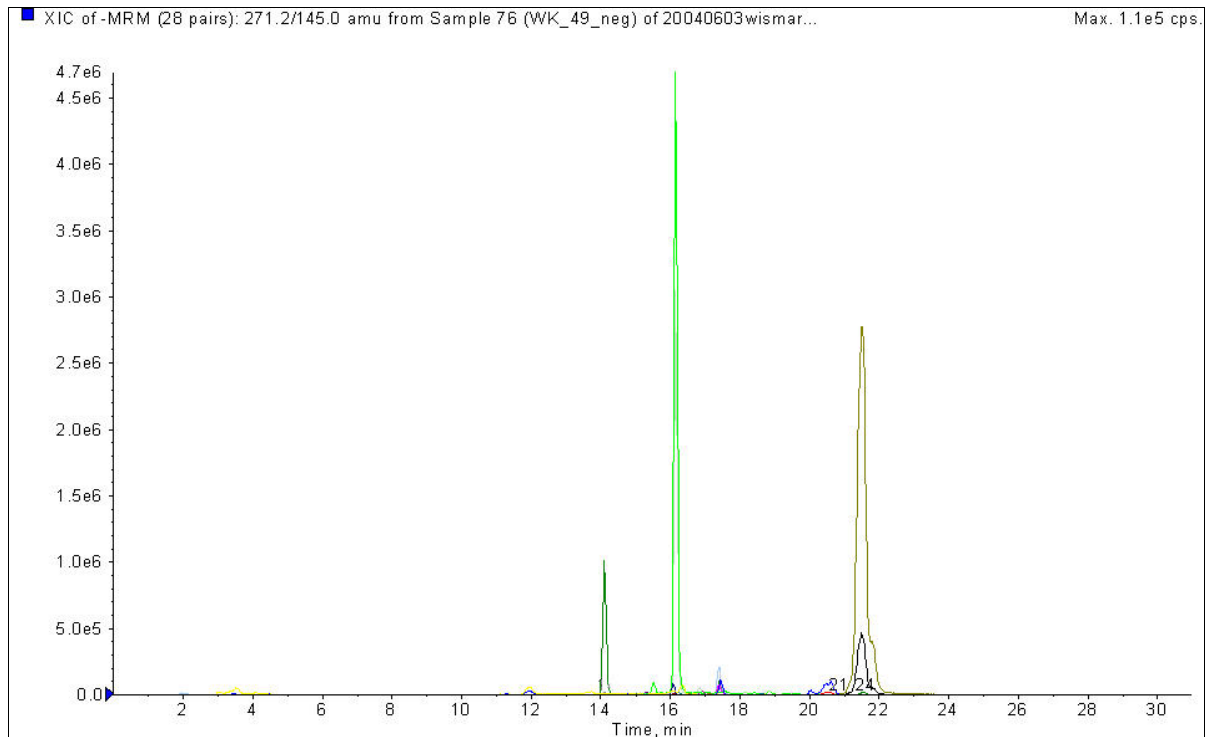


Abbildung 40: Chromatogramm des undotierten Extraktes von Probe 49 (Wismar Klärwerk) im negativen Messmodus.

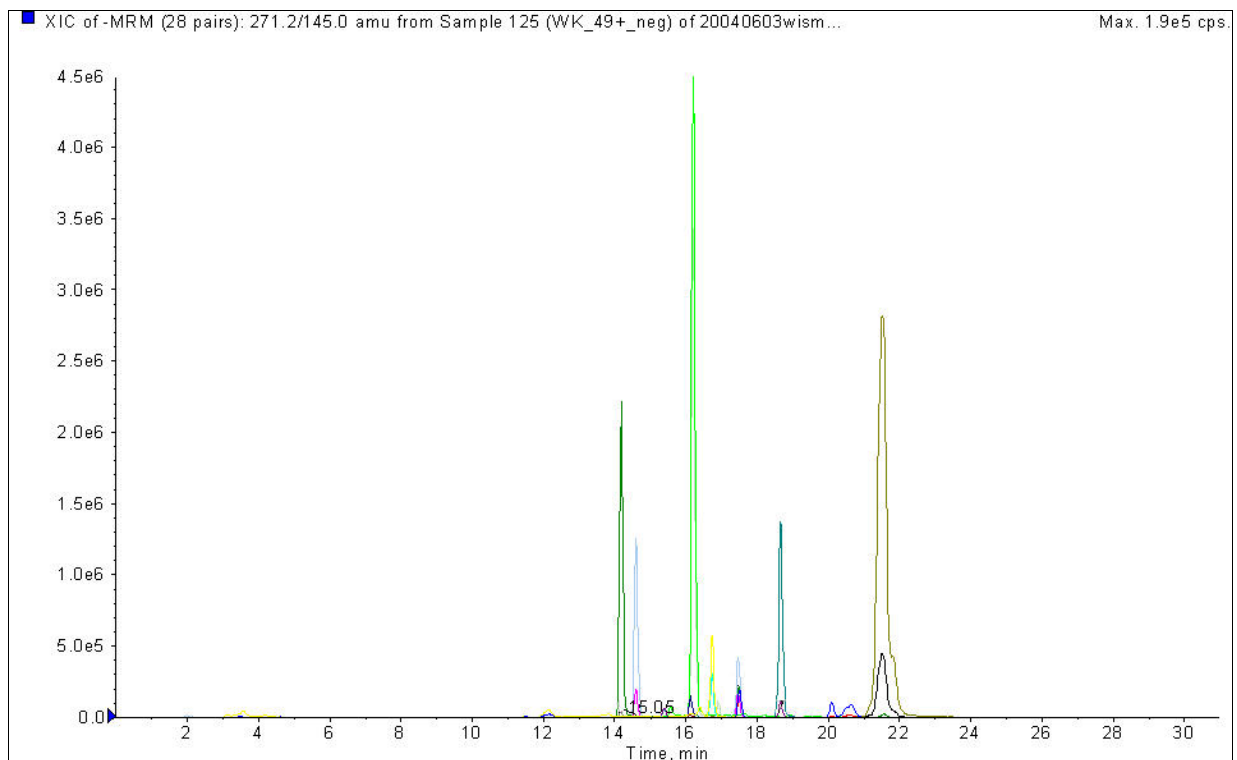


Abbildung 41: Chromatogramm des dotierten Extraktes von Probe 49 (Wismar Klärwerk) im negativen Messmodus.

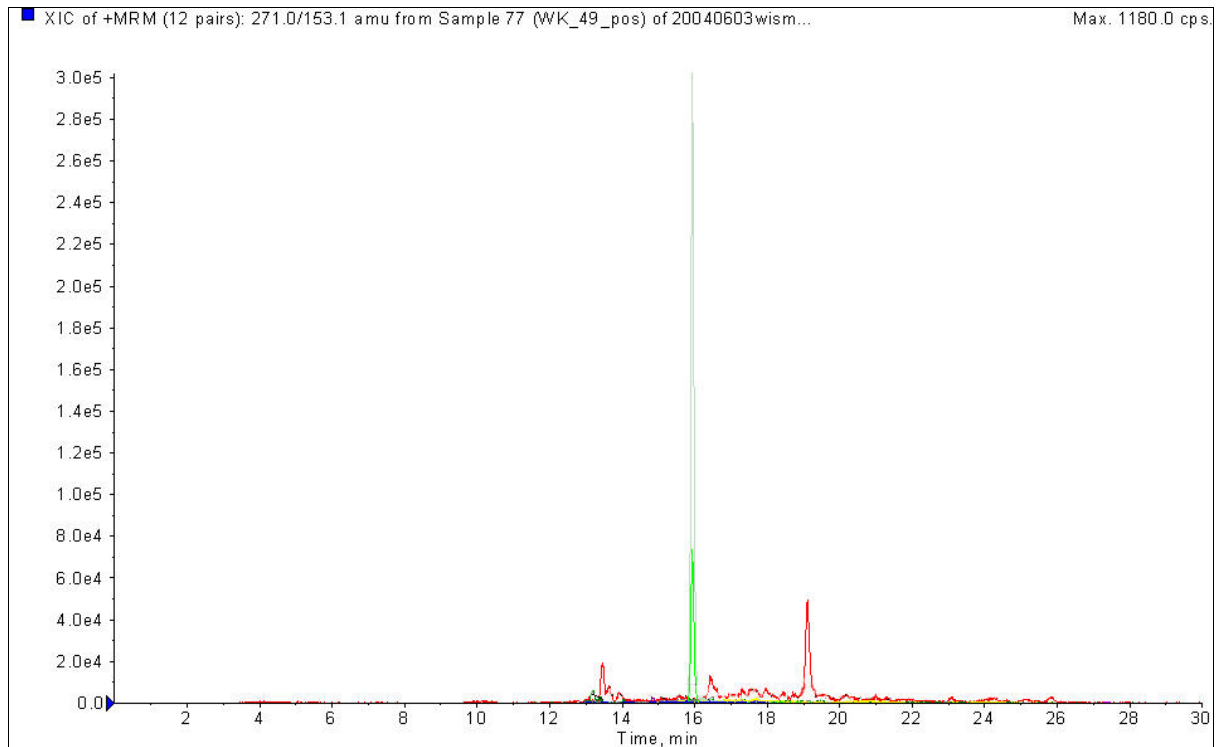


Abbildung 42: Chromatogramm des undotierten Extraktes von Probe 49 (Wismar Klärwerk) im positiven Messmodus.

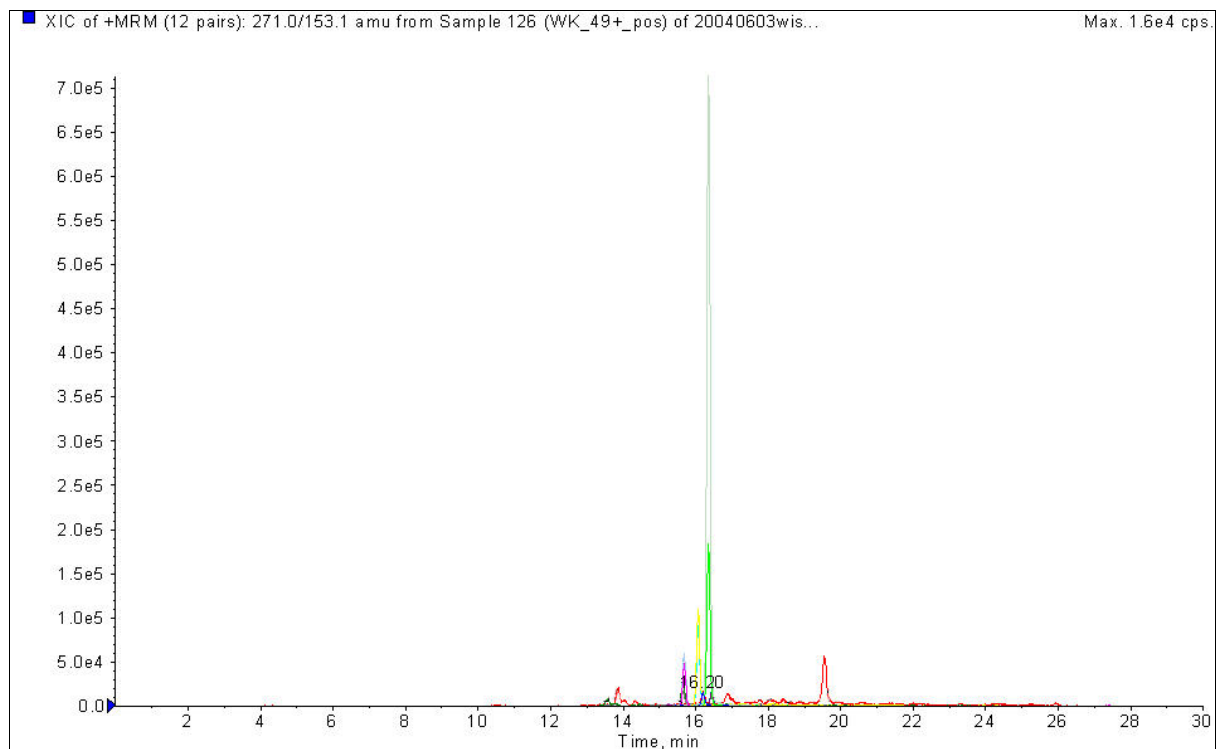


Abbildung 43: Chromatogramm des dotierten Extraktes von Probe 49 (Wismar Klärwerk) im positiven Messmodus.