

---

Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik der  
Technischen Universität München

# **Untersuchungen zur *in vivo* Bildung von Dioxinen mittels radioaktiv markierten Pentachlorphenol**

Hannes Maximilian Hofbauer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum  
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

## **Doktor der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. (Zonguldak Univ./Türkei) H. Parlar

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. (RO) A. Kettrup

2. Univ.-Prof. Dr. M. Schuster

3. Priv.-Doz. Dr. K.-W. Schramm

Die Dissertation wurde am 03.06.2005 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum  
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 05.10.2005  
angenommen.

---

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von August 1999 bis Mai 2004 am Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik der Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau der Technischen Universität München durchgeführt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. A. Kettrup für die interessante Themenstellung und die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Besonders danken möchte ich außerdem Dr. K.-W. Schramm für die hilfreiche Zusammenarbeit bei der Konzeption und Durchführung der Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Weiter danke ich

- Herrn Prof. Dr. Schmidt, Herrn Dr. Berg und Herrn Dr. Ruprecht für die Bereitstellung der Räumlichkeiten zur Tierhaltung, ihre Diskussionsbeiträge zu Tierschutz und Strahlenschutz, und die Betreuung im Anfangsstadium der Arbeit.
- Herrn Ellegaard von der Firma Ellegaard für den informativen Besuch aus Dänemark und die reibungslose Lieferung der Minipigs samt Futter.
- Herrn Dr. A. Reischl vom Geologischen Landesamt Bayern für die Beratung bei der Auswahl und die Bereitstellung der Bodenproben.
- Herrn B. Henkelmann für die Durchführung der PCDD/F-Messungen an der GC-HRMS und die ständige Hilfsbereitschaft bei der Auswertung der Chromatogramme und bei allgemeinen Software-Problemen.
- Herrn A. Behechti für seine ständige Hilfsbereitschaft, unter anderem bei der Fütterung der Minipigs, und seine Einführung am Sample Oxidizer und Szintillationszähler.
- Frau J. Kotalik für die Einarbeitung in das Clean-up der PCDD/F-Analytik.

- 
- Herrn A. Attar für die Synthese des markierten PCP und die praktischen Tips zur Handhabung des aktiven Materials.
  - Herrn Dr. Schäffer, der mir mit seinen Kenntnissen als Pathologe bei der Sezierung eine unschätzbare Hilfe war.
  - Frau V. Meyer für ihre Hinweise zur Gefriertrocknung und Homogenisierung der Proben.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern/innen des Instituts für Ökologische Chemie in der GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

---

## Abkürzungsverzeichnis

AD	Absorbance detector
ALOX	Aluminiumoxid
AOX	An Aktivkohle adsorbierbare organische Halogenverbindungen
ASE	Accelerated Solvent Extraction
BET	spezifische Oberfläche von Mineralien
BSD	Bauchspeicheldrüse
CD	Conductivity detector
DCM	Dichlormethan (Methylenchlorid)
DIN	Deutsche Industrienorm
FLO	Florisil
GC	Gaschromatographie
GLA	Geologisches Landesamt Bayern
HCB	Hexachlorbenzol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hx	Hexan
IC	Ionenchromatographie
KAK <sub>eff</sub>	effektive Kationenaustauschkapazität
MS	Massenspektrometrie
n.n.	nicht nachweisbar
NaPCP	Natriumpentachlorphenolat
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCDD/F	Polychlorierte Dibenzo- <i>p</i> -dioxine und -furane
PCP	Pentachlorphenol
Sox	Soxhlet-Extraktion

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Einführung in das Thema	1
1.2	Problemstellung der Arbeit	2
1.3	Ziel und Konzept	3
<b>2</b>	<b>ALLGEMEINER TEIL</b>	<b>5</b>
2.1	<b>PCDD/F, PCP</b>	<b>5</b>
2.1.1	Polychlorierte Dibenzo-p-dioxine und Dibenzofurane	5
2.1.1.1	Herkunft und Entstehung	5
2.1.1.2	Physikalische und chemische Eigenschaften	7
2.1.1.3	Ökotoxikologische Relevanz	7
2.1.2	Hexachlorbenzol	11
2.1.2.1	Herstellung und Verwendung	11
2.1.2.2	Physikalische und chemische Eigenschaften	12
2.1.2.3	Ökotoxikologische Relevanz	12
2.1.3	Pentachlorphenol PCP	14
2.1.3.1	Herkunft und Entstehung	14
2.1.3.2	Physikalische und chemische Eigenschaften	17
2.1.3.3	Ökotoxikologische Relevanz	18
2.2	<b>Erkenntnisse zur biogenen Bildung von PCDD/F</b>	<b>26</b>
2.2.1	Peroxidasen	26
2.2.2	<i>In vivo</i> Bildung von PCDD/F	29
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>32</b>
3.1	<b>Chemikalien und Geräte</b>	<b>32</b>
3.1.1	Chemikalien	32
3.1.2	Geräte	34
3.2	<b>Darstellung und Aufreinigung des PCP</b>	<b>37</b>

---

<b>3.3</b>	<b>Minipigversuch</b>	<b>43</b>
3.3.1	Vorbereitung und Aufbau	43
3.3.2	Durchführung	44
<b>3.4</b>	<b>Waldbodenversuch</b>	<b>48</b>
3.4.1	Vorbereitung und Aufbau	48
3.4.2	Durchführung	49
<b>3.5</b>	<b>Radioaktivitätsanalytik</b>	<b>51</b>
3.5.1	Verbrennung	51
3.5.2	Szintillationszählung	52
<b>3.6</b>	<b>Analytik der PCDD/F</b>	<b>54</b>
3.6.1	Polychlorierte Dibenzo-p-dioxine und Dibenzofurane	54
3.6.1.1	Vorbereitung der Proben	54
3.6.1.2	Soxhlet-Extraktion	57
3.6.1.3	Clean-up	58
3.6.1.4	Nachweis und Quantifizierung der PCDD/F mit GC/MS	60
<b>3.7</b>	<b>Qualitätssicherung bei der GC-MS-Analyse</b>	<b>65</b>
3.7.1	Wiederfindung	65
3.7.2	Nachweisgrenzen	66
3.7.3	Blindwerte	67
3.7.4	Mehrfachbestimmung	67
3.7.5	Vollständigkeit der Extraktion	68
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>70</b>
<b>4.1</b>	<b>Minipigversuch</b>	<b>70</b>
4.1.1	Radioaktivität	70
4.1.1.1	Urin	70
4.1.1.2	Feces	72
4.1.1.3	Organe	74
4.1.1.4	Bilanz der Radioaktivität	77
4.1.2	Verbleib der Aktivität während des Clean-Up	78
4.1.3	PCDD/F-Belastung	79

---

<b>4.2</b>	<b>Waldbodenversuch</b>	<b>84</b>
4.2.1	Radioaktivität	85
4.2.2	Verbleib der Aktivität während des Clean-Up	88
4.2.3	PCDD/F-Belastung	89
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>97</b>
5.1	Minipigversuch	99
5.2	Waldbodenversuch	107
5.3	Biogene Bildung von PCDD/F - Ausblick	113
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>119</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>131</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung in das Thema

Seit dem Unglück in Seveso 1976 sind Dioxine auch in der Öffentlichkeit bekannt und ein Grund zur Besorgnis. Gemeint sind mit dem umgangssprachlichen Begriff „Dioxine“ polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine (PCDD) und polychlorierte Dibenzofurane (PCDF), und im speziellen 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD), das den giftigsten Vertreter der über 100 verschiedenen Kongenere darstellt. So ist es nicht verwunderlich, wenn sogar große Tageszeitungen wie die Süddeutsche Zeitung in ihrer Ausgabe vom dritten August 1999 über Funde von Dioxinen in Nahrungsmitteln oder Futterzusätzen berichtet. Aus vielen Untersuchungen und Messungen sind die Hauptquellen für Dioxinverunreinigungen bekannt. Zum einen als Nebenprodukte industrieller Synthesen (wie in Seveso oder z.B. auch in „Agent Orange“ zu finden, dass von den USA in Vietnam eingesetzt wurde), zum anderen bei Verbrennungsprozessen, z.B. der Müllverbrennung von chlorhaltigen Kunststoffen wie Polyvinylchlorid (PVC).

In dem Artikel vom 3.8.99 allerdings wurde von etwas anderem berichtet. Nach Funden in Schweinefleisch wurden die Dioxine, die sehr persistent sind, auf tonhaltige Futtermittelzusätze zurückverfolgt. Diese werden in Tagebauen auf der ganzen Welt gewonnen. Nähere Untersuchungen einiger Lagerstätten in Deutschland im Westerwald ergaben das Erstaunliche:

Neben hohen Werten, die bis zu 1654 Pikogramm pro Gramm Ton reichten, was mehr als tausendmal höher wie in unbelasteten Tonproben ist, fielen vor allem die ungewöhnlichen Verteilungsmuster der PCDD/F auf. Es dominiert das OCDD, während die Furane „völlig fehlen“. Dies spreche klar gegen eine pyrogene oder technogene Entstehung oder eine Ablagerung von Giftmüll,

sondern es müsse sich um natürlich entstandene Anreicherungen im Sediment handeln.

## 1.2 Problemstellung der Arbeit

Diese Vermutungen, dass PCDD/F auch auf natürlichem Weg gebildet werden, wenn auch nur in geringsten Mengen, die sich dann im Laufe der Zeit anreichern, ist in der Fachwelt nicht neu. Hayward et al. berichteten 1999 von erhöhten TCDD-Werten in Eiern von Hühnern und Katzenfischen, die in ihrem Futter einen Zusatz aus Tonerden einer Tonmine im Süden der Vereinigten Staaten hatten (Hayward, 1999). Hier wurden PCDD/Fs in den untersuchten Proben detektiert und auf die Tonzusätze im Futter zurückgeführt. Demzufolge wurden Proben dieser Tonerden genommen und mit PCDD/F-haltigen Proben von Flugasche aus einer Müllverbrennungsanlage und konservierten Hühnerfutterproben von 1950 verglichen. Bei diesem Hühnerfutter war damals Fett zugesetzt worden, das bei der Kuhhautverarbeitung mit PCP-haltigen Mischungen angefallen war. Auch hier wurden signifikante Unterschiede in den Verteilungsmustern der PCDD/F gefunden.

Wegen dieser und anderer Untersuchungen wurden bereits einige Versuche unternommen, die Bildung von Dioxinen auf „natürlichen“ Wegen, also nicht in Verbrennungsprozessen oder ähnlichem, nachzuweisen. Die meisten beschränkten sich allerdings auf *in vitro* Simulationen der natürlichen Bedingungen. Zum Beispiel gab es mehrere Untersuchungen zu Peroxidase-katalysierten Reaktionen (Wagner, 1990) (Wittsiepe, 2000). Klimm et al. untersuchten die Vorgänge in Kläranlagen und Klärschlamm in mehreren Versuchen (Klimm, 1996) (Klimm, 1998).

Dies ist natürlich experimentell wesentlich einfacher durchzuführen als *in vivo* zu arbeiten. Dazu gibt es erst seit kurzem Veröffentlichungen, wie zum Beispiel auf der DIOXIN 2000 präsentiert (Fries, 2000) (Hoekstra, 2000).

### 1.3 Ziel und Konzept

Diese Arbeit konzentriert sich auf naturnahe Bedingungen und ein *in vivo* Experiment, und versucht zu beweisen, ob eine biogene Bildung stattfindet. Als biologische Matrices wurden Minipigs und Waldboden ausgewählt. Zur besseren Detektion und Kontrolle der Versuche wurde mit radioaktivem Tracermaterial gearbeitet. Dieses bestand aus  $^{14}\text{C}$ -PCP, das einen potentiellen Precursor für OCDD darstellt und leicht verfügbar war. Außerdem ist PCP ein primäres Abbauprodukt von HCB im menschlichen Organismus, das zwar nicht mehr direkt als Fungizid in die Umwelt eingebracht wird, aber immer noch technisch verwendet wird und aufgrund seiner Persistenz eine hohe Halbwertszeit hat (Rippen, 1994). Dies könnte ein möglicher Grund für die gefundenen ungewöhnlichen Verteilungsmuster mit starkem Übergewicht an OCDD sein.

Weiterhin äußerten Prange et al. die Vermutung, dass für die ungewöhnlich hohen OCDD-Konzentrationen in Bodenproben PCP verantwortlich sein könne. Hierbei wurde bei der Untersuchung eines Bodenprofils in Australien Verteilungsmuster gefunden, wie sie typisch für eine PCP-Kontamination sind. In tieferen Schichten jedoch dominierten OCDD und HpCDD. Da PCDD/Fs generell nicht in tiefere Bodenschichten migrieren, wäre ein mögliche Ursache das Wandern von PCP in die tieferen Bodenschichten und eine Konvertierung dort über noch nicht identifizierte Vorgänge zu den gefundenen OCDD und HpCDDs. (Prange, 2002).

Nach Voruntersuchungen auf den natürlichen Gehalt der Proben und einer sorgfältigen Aufreinigung der PCP sollten sowohl die Schweine als auch die Bodenproben mit einer entsprechenden Menge an radioaktivem Material exponiert werden, die eine Messung auch im erwarteten geringen Umsatzbereich ermöglicht. Gleichzeitig sollten natürlich keinerlei toxische Effekte auftreten, die das Ergebnis verfälschen könnten, da PCP als Toxin nicht unproblematisch ist.

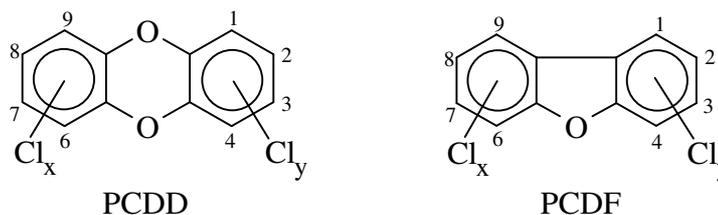
Zur Bewertung der Bildung an PCDD/F sollten sowohl die Radioaktivität verfolgt werden, als auch Spurenanalytik auf Dioxine betrieben werden. Dazu wurden einerseits die Minipigs sezirt und Proben von allen Organen und Gewebearten genommen, mit dem Hauptaugenmerk auf den Fettgehalt. Für die Bodenproben sollte eine Zeitreihe aufgenommen werden, die die Entwicklung der Werte über drei Monate dokumentiert.

## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 PCDD/F, PCP

#### 2.1.1 Polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine und Dibenzofurane

Polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine und Dibenzofurane (PCDD/F) sind zwei chemische Verbindungsklassen tricyclischer, chlorierter, aromatischer Diether bzw. Ether mit insgesamt 75 (PCDD) bzw. 135 (PCDF) Einzelverbindungen (Kongenere). PCDD/F mit gleicher Anzahl von Chloratomen werden als Homologe bezeichnet, solche mit gleicher Anzahl, aber unterschiedlicher Stellung der Chloratome zueinander als Isomere.



**Abb. 2.1-1: Allgemeine Struktur polychlorierter Dibenzo-*p*-dioxine (PCDD) und Dibenzofurane (PCDF)**

##### 2.1.1.1 Herkunft und Entstehung

Außer zur Herstellung analytischer Standards werden PCDD/F nicht gezielt synthetisiert. Sie können jedoch als Nebenprodukte bei vielen chemischen Synthesen von chlororganischen Verbindungen, wie z.B. Pentachlorphenol, gebildet werden. Hauptbildungswege für PCDD/F sind thermische Prozesse in Müll- und Sondermüllverbrennungsanlagen, Verbrennungsmotoren, Hausfeuerungen und unkontrollierte Brände nach Unfällen. Für eine Übersicht der derzeit diskutierten Bildungsmechanismen von PCDD/F bei Verbrennungsprozessen siehe in der Literatur (Addink & Olie, 1995) und (Lenoir & Fiedler, 1992). Weitere Bildungswege für PCDD/F stellen photochemische Prozesse in Atmosphäre und Boden dar (Miller et al., 1989) sowie enzymatische

Reaktionen in Klärschlämmen und Kompost (Öberg et al., 1993). Einen Überblick aller bekannten PCDD/F-Quellen zeigt Tab. 2.1-1.

Neben diesen primären Quellen spielt auch die sekundäre Wiedereinbringung von PCDD/F aus Reservoirs und Senken in die Umwelt eine wichtige Rolle. Dazu gehören der Austritt von Sickerwässern aus Mülldeponien und kontaminierten Gebieten sowie die Ausbringung von Klärschlämmen und Kompost.

**Tab. 2.1-1: Primäre Quellen der PCDD/F (Hutzinger & Fiedler, 1992 und Rappe, 1992)**

<b>1)</b>	<b>Industrielle Quellen</b>
	Prozesse und Produkte der chemischen Industrie Zellstoff und Papierherstellung Chemische Reinigung Metallurgische Prozesse
<b>2)</b>	<b>Verbrennungsprozesse</b>
	<u>Stationäre Quellen</u> Hausmüllverbrennung Sonderabfallverbrennung Verbrennung von Krankenhausabfällen Klärschlammverbrennung Metallverhüttung und Metallrückgewinnung
	<u>Diffuse Quellen</u> Automobilabgase Hausfeuerung (Öl, Kohle, Holz) Waldbrände, Zigarettenrauch, Vulkanausbrüche
	<u>Unfälle</u> PCB-, PVC-, Lagerhaus- und Wohnhausbrände
<b>3)</b>	<b>Enzymatische Prozesse</b> (Klärschlamm, Kompost)
<b>4)</b>	<b>Photochemische Prozesse</b> (Atmosphäre, Boden)

### 2.1.1.2 Physikalische und chemische Eigenschaften

Polyhalogenierte Dibenzo-*p*-dioxine und Dibenzofurane besitzen hohe chemische Resistenz gegen Säuren, Basen und Oxidationsmittel. Sie sind schwerflüchtig, besitzen eine sehr geringe Wasserlöslichkeit und hohe Lipophilie. Niedrigchlorierte PCDD/F sind unter Normalbedingungen in Gas- und Partikelphase verteilt, höherchlorierte treten bevorzugt partikelgebunden auf. Eine Zusammenfassung wichtiger physikalisch-chemischer Eigenschaften von PCDD/F am Beispiel von 2,3,7,8-TCDD und OCDD zeigt Tab. 2.1-2.

**Tab. 2.1-2: Physikalisch-chemische Eigenschaften von 2,3,7,8-TCDD und OCDD (Kaune et al., 1990)**

<i>Eigenschaft</i>	<i>2,3,7,8-TCDD</i>	<i>OCDD</i>
Wasserlöslichkeit (ng/l)	8 - 200	0,074 - 0,4
log K <sub>ow</sub>	5,50 - 8,93	7,57 - 12,72
Dampfdruck bei 25°C (Pa)	2,0 · 10 <sup>-7</sup> - 4,5 · 10 <sup>-6</sup>	1,1 · 10 <sup>-10</sup> - 8,7 · 10 <sup>-7</sup>
Henry-Konstante (Pa m <sup>3</sup> /mol)	2,9 · 10 <sup>-3</sup>	0,683

### 2.1.1.3 Ökotoxikologische Relevanz

#### Umweltpersistenz, Abbaubarkeit

PCDD/F sind ubiquitär vorkommende und sehr persistente Verbindungen. So scheint für 2,3,7,8-TCDD, der gut untersuchten Leitsubstanz aus der Gruppe der PCDD/F, der Photoabbau der einzige wichtige Abbauprozess zu sein. Durch Bindung an Partikel wird diese Photolyse verlangsamt. Auf Sandboden beträgt die Halbwertszeit von 2,3,7,8-TCDD ca. 12 Jahre (Young, 1983). Ein langsamer oxidativer Bioabbau von 2,3,7,8-TCDD erfolgt durch Weißfäulepilze auf geeigneten Substraten mit einer Halbwertszeit von ca. 29 Jahren (Bumpus, et al. 1985). Unter reduktiven Bedingungen in Sedimenten konnte eine wesentlich effizientere mikrobielle Dechlorierung von 2,3,7,8-TCDD mit einer Halbwertszeit von ca. 2 Jahren beobachtet werden (Barkovskii & Adriaens, 1995).

### Bioakkumulation

Aufgrund ihrer Lipophilie und Persistenz zeigen PCDD/F eine starke Tendenz zur Bioakkumulation. Sie werden vor allem mit der Nahrung aufgenommen. Dabei ist die orale Bioverfügbarkeit stark spezies-, dosis- und medienabhängig sowie kongenerenspezifisch. So nehmen Ratten aus mit 2,3,7,8-TCDD verunreinigtem Futter ca. 50% auf. Dagegen wird von einem männlichen Erwachsenen eine Einzeldosis von 1 ng 2,3,7,8-TCDD/kg Körpergewicht, gelöst in Maisöl, zu ca. 90% resorbiert (Sagunski & Perger, 1994). PCDD/F werden nach Aufnahme im Blut an Lipoproteine gebunden. Vor allem die 2,3,7,8-substituierten PCDD/F reichern sich selektiv in Leber und Fettgewebe von Menschen und Säugetieren an. Nur nicht-2,3,7,8-substituierte Kongenere werden in größerem Umfang metabolisiert und rasch ausgeschieden. Die Halbwertszeit für die physiologische Elimination von 2,3,7,8-TCDD ist stark speziesabhängig: Sie beträgt bei der Ratte ca. 25 Tage, beim Menschen ca. 10 Jahre (Schlatter & Poiger, 1989).

### Toxizität

Die meisten Kenntnisse zur Toxizität liegen für das 2,3,7,8-TCDD aus tierexperimentellen Studien und Beobachtungen am Menschen vor. 2,3,7,8-TCDD hat sich dabei als der giftigste Vertreter der polyhalogenierten Arylkohlenwasserstoffe herausgestellt.

Der molekulare Wirkungsmechanismus von TCDD ist bisher nicht im einzelnen aufgeklärt worden (Landers & Bunce, 1991), (Cikryt, 1991). Als Hypothese dient ein Modell, das von der Bindung von 2,3,7,8-TCDD an den cytosolischen Ah(Arylhydrocarbon)-Rezeptor als ersten Schritt auf zellulärer Ebene ausgeht. Dieser Komplex bindet an die „Dioxin Responsive Elements“ der DNA und induziert in der Folge die Expression verschiedener fremdstoffmetabolisierender Enzyme, wie z.B. Cytochrom P450. Zusätzlich kontrolliert der Ah-Rezeptor vermutlich weitere, noch unbekannte Gene zur Regulation des

Zellwachstums und der Zelldifferenzierung. Nicht alle Effekte lassen sich hierbei allein mit der Bindung an den Rezeptor erklären.

Folgende toxische Wirkungen von 2,3,7,8-TCDD, die von der Bindung an den Ah-Rezeptor abhängen, sind bekannt: Hautveränderungen (Chlorakne), Leberschädigung, Schädigung des Immunsystems (Immunsuppression), Störung des Porphyrinstoffwechsels, Thymusschrumpfung (Thymusatrophie) und Gewichtsverlust (wasting syndrome). Diese Wirkungen sind spezie-, alters- und dosisabhängig.

Die akute orale Toxizität variiert stark unter den Säugetierspezies: So reicht die LD<sub>50</sub> von 1 µg 2,3,7,8-TCDD/kg Körpergewicht für Meerschweinchen bis etwa 5000 µg 2,3,7,8-TCDD/kg für Hamster (Cikryt, 1991). Nach akuter Intoxikation ist die häufigste, jedoch nicht für 2,3,7,8-TCDD spezifische Wirkung die Chlorakne. Bei erwachsenen Personen konnte Chlorakne mit einer Menge von 30-200 µg 2,3,7,8-TCDD auf der Haut ausgelöst werden, wie Analysen von >1000 Vergiftungsunfällen ergaben. Daten zur chronischen Toxizität der PCDD/F liegen nur begrenzt vor. So wiesen Langzeituntersuchungen an Ratten bei einer oralen Dosis von 10 ng/kg Körpergewicht Störungen des Porphyrinstoffwechsels, sowie toxische Veränderungen von Leberzellen nach (Sagunski & Perger, 1994).

2,3,7,8-TCDD zeigt im Tierversuch stark kanzerogene Wirkung, wohingegen das kanzerogene Potential beim Menschen deutlich geringer eingeschätzt wird. TCDD wirkt nicht direkt gentoxisch. Die Einstufung als Tumorpromotor gilt dagegen als gesichert. Eine mutagene Wirkung von TCDD für den Menschen wird nicht angenommen.

#### Klassifizierung der Toxizität

Von den insgesamt 210 möglichen chlorierten PCDD/F sind 17 Komponenten mit Chlorsubstituenten in 2,3,7,8-Stellung unter toxikologischen Gesichtspunkten besonders herausragend. Ihre Gehalte werden zu einem gewichteten Wert als toxische Äquivalente (TE) zusammengefaßt. Dabei wird die relative Giftwirkung der einzelnen Kongenere im Verhältnis zum giftigsten

und gut untersuchten Kongener, dem 2,3,7,8-TCDD, ermittelt. Dieses Konzept dient der Risikoabschätzung für Umweltschadstoffe, die stets in Gemischen meist in verschiedenen Zusammensetzungen vorkommen. Die Toxizitäts-Äquivalenzfaktoren (TEF) für PCDD/F dienen dabei vor allem administrativen und gesetzgeberischen Zwecken, da die Grundvoraussetzung, daß alle Kongenere über den gleichen Rezeptor reagieren, für PCDD/F nicht gegeben ist (Neubert, 1994). Im internationalem Vergleich schwanken TEF teilweise beträchtlich. Nationale TEF, wie z.B. das BGA-Schema sind jedoch zunehmend von den internationalen TEF für die Toxizitätsbewertung der PCDD/F abgelöst (Tab. 2.1-3) worden. Der neueste internationale Ansatz stammt von der World Health Organisation (WHO) und wird inzwischen weltweit anerkannt.

**Tab. 2.1-3: Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) für PCDD/F**

<i>Kongener</i>	<i>I-TEF<sup>a)</sup></i>	<i>BGA-TEF<sup>b)</sup></i>	<i>WHO-TEF<sup>c)</sup></i>
2,3,7,8-TCDD	1	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	0,1	0,5	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	0,01	0,01
OCDD	0,001	0,001	0,0001
2,3,7,8-TCDF	0,1	0,1	0,1
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	0,1	0,5
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	0,1	0,05
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	0,01	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01	0,01	0,01
OCDF	0,001	0,001	0,0001

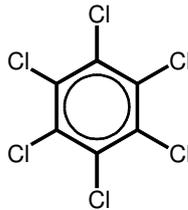
a) NATO/CCMS (1988)

b) UBA (1985)

c) WHO (1998)

## 2.1.2 Hexachlorbenzol

Hexachlorbenzol (HCB) gehört zur Gruppe der chlorierten Benzole, von denen insgesamt 12 Einzelverbindungen existieren.



**Abb. 2.1-2: Strukturformel von Hexachlorbenzol (HCB)**

### 2.1.2.1 Herstellung und Verwendung

HCB wird im großen Maßstab industriell durch erschöpfende Chlorierung von Benzol mit Eisenchlorid als Katalysator erzeugt. Die jährliche weltweite Produktionsmenge betrug 1978 10000 t und wird heute noch auf 5000 t geschätzt (Rippen, 1994). HCB dient als Ausgangsstoff zur Herstellung von Pentachlorthiophenol, dessen Zink-Salz als Mastiziermittel in der Kautschukindustrie verwendet wird (Drotleff et al., 1992) und Pentachlorphenol. Daneben wurde HCB in offenen Anwendungen als Weichmacher und flammhemmender Zusatz für Kunststoffe und Schmiermittel verwendet. Die Verwendung von HCB als fungizides Saatgutbeizmittel ist in Deutschland seit 1977 verboten (Heinisch & Schieferdecker, 1983). Seitdem ist ein kontinuierlicher Rückgang der HCB-Belastung in Nahrungsmitteln erkennbar.

Neben der gezielten Herstellung wird HCB in nicht unerheblichen Mengen als unerwünschtes Nebenprodukt bei der Herstellung von chlorierten Kohlenwasserstoffen wie Tetrachlorethen, Trichlorethen, Tetrachlorkohlenstoff und Vinylchlorid gebildet (Rippen, 1994). Auch viele heute nicht mehr verwendete chlorierte Pestizide und Fungizide wie z.B. Lindan und Pentachlorphenol enthielten als Verunreinigung häufig HCB (Heinisch & Schieferdecker, 1983). Darüber hinaus wird HCB wie die PCDD/F bei

thermischen Prozessen in Müll- und Sondermüllverbrennungsanlagen gebildet (Öberg & Bergström, 1985).

### 2.1.2.2 Physikalische und chemische Eigenschaften

HCB besitzt ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften wie die PCDD/F (Tab. 2.1-4). Es ist chemisch sehr stabil, schwerflüchtig, besitzt geringe Wasserlöslichkeit und hohe Lipophilie und tritt bevorzugt partikelgebunden auf.

**Tab. 2.1-4: Physikalisch-chemische Eigenschaften von HCB (Rippen et al., 1994)**

<i>Eigenschaft</i>	<i>HCB</i>
Wasserlöslichkeit bei 20°C (ng/l)	1,1 - 17,0
log K <sub>ow</sub>	5,0 - 6,53
Dampfdruck bei 20°C (Pa)	4,1 · 10 <sup>-4</sup> - 1,7 · 10 <sup>-3</sup>
Henry-Konstante bei 20°C (Pa m <sup>3</sup> /mol)	2,8 · 10 <sup>-2</sup>

### 2.1.2.3 Ökotoxikologische Relevanz

#### Umweltpersistenz

HCB ist eine sehr persistente und ubiquitär vorkommende Verbindung. Unter aeroben Bedingungen erfolgt nur eine geringfügige mikrobielle Transformation (Klein & Scheunert, 1985). Die Halbwertszeit von HCB in der Umwelt wird auf mehr als 1 Jahr geschätzt (Rippen, 1994). Nur in anaerobem Klärschlamm wurde eine vollständige Dechlorierung von HCB nach 3 Wochen beobachtet (Fathepure et al., 1988).

#### Bioakkumulation, Elimination

Das persistente Vorkommen von HCB führt zu einer Anreicherung in der Nahrungskette. Besonders betroffen sind Lebensmittel mit hohem Lipidanteil.

Hauptzufuhrpfad für die Allgemeinbevölkerung ist dementsprechend Verzehr HCB-kontaminierter Lebensmittel. Die Resorptionsquote lag in Studien an Versuchstieren bei 80 %. Es wird angenommen, daß ähnliche Quoten auch für Menschen zutreffen. HCB reichert sich wie PCB und PCDD/F selektiv v.a. im Fettgewebe (90%) an. Die biologische Halbwertszeit liegt bei Warmblütern bei 8 Tagen innerhalb der ersten 2 Wochen und bei ca. 1 Jahr nach ca. 18 Monaten (biphasische Ausscheidung) (Sagunski & Perger, 1994).

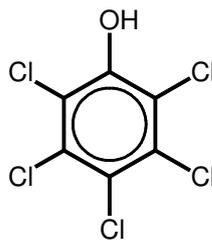
### Toxizität

Die LD<sub>50</sub> bei Versuchstieren nach oraler Zufuhr liegt zwischen 1 und 19 g/kg Körpergewicht. Damit ist die akute Toxizität als niedrig einzustufen. Akute Symptome bei Versuchstieren sind vor allem neurotoxische Wirkungen. Chronische HCB-Vergiftung stellt sich klinisch unter dem Krankheitsbild einer *Porphyria cutanea tarda* (hepatische Porphyrie) dar, wie die epidemische HCB-Intoxikation im Südosten der Türkei 1955-1957 zeigte (Sagunski & Perger, 1994).

HCB wirkt im Tierversuch teratogen und kanzerogen. Eine mutagene Wirkung konnte tierexperimentell nicht nachgewiesen werden (Rippen, 1994).

### 2.1.3 Pentachlorphenol PCP

Pentachlorphenol gehört zur Gruppe der chlorierten Phenole und stellt eines der primären Abbauprodukte von HCB im Organismus dar.

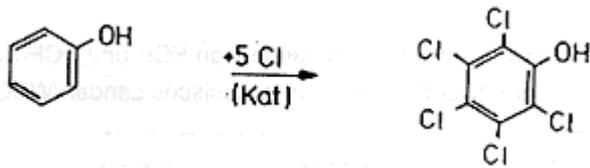


**Abb. 2.1-3 Strukturformel von Pentachlorphenol (PCP)**

#### 2.1.3.1 Herkunft und Entstehung

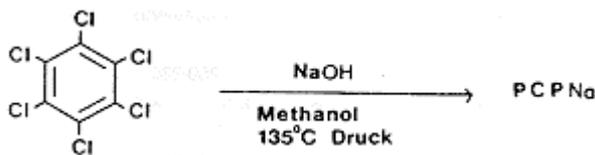
PCP wurde erstmals 1841 gleichzeitig von Erdmann (bei seinen Studien über Indigo) und von Laurent synthetisiert (Ahlborg, 1980). Merz und Weith (1872) stellten PCP zum ersten Mal mit einer dem heutigen Verfahren ähnlichen Methode her ((WHO), 1987).

In der Bundesrepublik wurde PCP aus handelsüblichem Phenol und gereinigtem Chlor hergestellt (Abbildung 2). Bei der Darstellung von PCP erfolgte die Chlorierung des Phenols bis zur Stufe des 2,4,6-Trichlorphenol kontinuierlich bei einer Temperatur von 60-70 °C. Die Weiterchlorierung fand diskontinuierlich in einem geschlossenen Kreislauf ohne Zwischenlagerung von 2,4,6-Trichlorphenol statt. Die Anlagerung des vierten und fünften Chloratoms erfolgte in Gegenwart von Aluminiumchlorid als Katalysator. Dabei wurde die Reaktionstemperatur stets direkt über dem Erstarrungspunkt gehalten, der mit steigendem Chlorgehalt bis auf einen Endpunkt von ca. 180 °C anstieg. Die Beendigung der Chlorierung wurde durch Erstarrung angezeigt ((BUA), 1985)



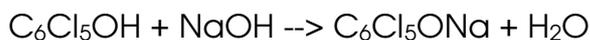
**Abb. 2.1-4: Darstellung von PCP**

Zur Herstellung von PCP-Na gibt es zwei technische Verfahren. Die alkalische Hydrolyse von Hexachlorbenzol (HCB) erfolgte meist mit konzentrierter, wässriger oder alkoholischer (Methanol) NaOH-Lösung in einem Autoklaven bei 130-170 °C ((WHO), 1987). Die Verseifung verläuft mit 85%iger Ausbeute (Gebefügi, 1978):



**Abb. 2.1-5: Darstellung von PCP-Na**

Nachteile der alkalischen Hydrolyse von HCB sind der Abwasseranfall und das Problem der Regenerierung des Lösungsmittels (Gebefügi, 1978). Bis Juli 1984 erfolgte die Herstellung von PCP-Na in der Bundesrepublik auf diesem Wege, dann wurde auf PCP als Ausgangsprodukt umgestellt. Die PCP-Schuppen wurden in Natronlauge aufgelöst ((BUA), 1985):



Nach Filtration wurde die PCP-Na-Lösung aufkonzentriert und zum fertigen Verkaufsprodukt sprühgetrocknet ((BUA), 1985).

### Verwendung

PCP diente in der BRD als Ausgangsprodukt zur PCP-Na-Herstellung (ECDIN, 1989). Da PCP ein starkes Gift für Insekten, Schwämme, Pilze, Hefen und Bakterien ist, fand es vielseitige Verwendung als Insektizid, Herbizid, Fungizid, Bakterizid, Algizid und Molluskizid ((Gebefügi, 1978); (Fränzle, 1982); ((BUA), 1985); ((WHO), 1987); (ECDIN, 1989)). Die Hauptvorteile von PCP und seinen Derivaten lagen darin, daß sie wirksame Breitbandbiozide sind, gute Löslichkeit in Öl (PCP) oder Wasser (PCP-Na) zeigen und kostengünstig herzustellen sind ((WHO), 1987).

Wegen der breiten Anwendbarkeit wurden PCP und seine Salze vor allem im Holz-, Leder- und Textilschutz sowie in der Zellstoff-, Papier- und Pappeproduktion als Konservierungsmittel verwendet.

PCP hat aber auch noch ganz andere Einsatzbereiche: In der Baumwollgewinnung wird es ebenso verwendet wie in der Papierindustrie, der Textil- und Lederindustrie und bei der Herstellung von Klebern und Leimen, in Dispersions- und Ölfarben. Als Zusatzstoff kann sich PCP in Kautschuk und Kosmetika finden. Weitere Umweltgefährdung kann aus handelsüblichen PCP-Produkten zum einen durch möglicherweise enthaltene Verunreinigungen wie PCDD/Fs ausgehen. Des Weiteren können bei Verbrennung PCP-haltiger Produkte oder Lichteinwirkung Dioxine entstehen.

1991 schwankten die Angaben über weltweite jährliche Produktionsmengen zwischen 25.000 t und 90.000 t. In Deutschland wurden 1985 noch über 1.000 t PCP hergestellt. Die PCP-Verbotsverordnung gilt für die Bundesrepublik seit 1989 bzw. die Chemikalien-Verbotsverordnung seit 1993 und untersagt die Herstellung, das Inverkehrbringen und die Verwendung von PCP und PCP-haltigen Materialien vollständig.

In einigen Ländern wie den USA, Frankreich, Indien, Taiwan und der VR China wird PCP weiterhin produziert und verwendet, so dass durch den Import von

PCP-behandelten Produkten (z.B. Leder und Textilien) noch ein Eintrag bestehen kann (HBM, 1997).

### 2.1.3.2 Physikalische und chemische Eigenschaften

Die wichtigsten physikalischen und chemischen Daten von PCP und PCP-Na sind in Tab. 2.1-5 zusammengefaßt. PCP ist eine geruchlose Verbindung, die in farblosen Nadeln kristallisiert. Technische Produkte sind grau bis braun gefärbt ((BUA), 1985).

**Tab. 2.1-5: Physikalische und chemische Eigenschaften von PCP und PCP-Na**

<i>Eigenschaft</i>	<i>PCP</i>	<i>PCP-Na</i>	<i>Zitat</i>
Molekulargewicht:	266,34	288,4	a
Dampfdruckkurve	A=5060		c
Log p = -0,9146·A (J/mol)/T (K) + B:	B=13,490		
Dampfdruck (hPa) bei 25 °C	5,5; 9,3·10 <sup>-5</sup>		a
Löslichkeit in Wasser (g/l):			
(20 °C, pH 5)	0,014	22,4	a, d
(20 °C, pH 7)	2,0		a
(20 °C, pH 8)	8,0		a
(20 °C, pH 10)	15,0	>200	a, b

*Quellen:*

a) BUA, 1985; b) WHO, 1987; c) Rippen, 1995; d) UBA, 1976

Reines unhydratisiertes PCP schmilzt bei ca. 190 °C (das Monohydrat bei 174 °C). Beim Siedepunkt von 309°-310 °C zersetzt sich PCP teilweise unter Bildung von Hexachlorbenzol (HCB), Octachlordibenzodioxin (OCDD) und Tetrachlorkohlenstoff (CCl<sub>4</sub>). Schon bei Normaltemperaturen muss PCP als relativ flüchtig betrachtet werden (Crosby, 1981).

In organischen Lösungsmitteln löst sich PCP gut, in Wasser dagegen weniger gut. Mit einem pH-Wert von 4,7 entspricht die Säurestärke von PCP ungefähr der der Essigsäure. Die Acidität ist weit größer als die des Phenols, weil das Pentachlorphenolatanion durch die Chlorsubstituenten am aromatischen Ring stabilisiert wird (Fränze, 1982). Bei pH 2,7 in wässriger Lösung liegt PCP nur zu 1% dissoziiert vor, während bei pH 6,7 (dem pH vieler natürlicher Gewässer) die Dissoziation 99% erreicht hat (Crosby, 1981). Aufgrund des protolytischen Gleichgewichts PCP/PCP<sup>-</sup> nimmt die Löslichkeit von PCP in Wasser also rapide mit steigendem pH zu, der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient dagegen ab ((BUA), 1985).

Wie bei allen Phenolen reagiert die Hydroxylgruppe des PCP nucleophil (d.h. PCP bildet Ester mit organischen und anorganischen Säuren und Ether mit Alkylierungsmitteln wie Methyljodid oder Diazomethan) (Crosby, 1981).

Obwohl der hohe Chlorierungsgrad und die damit verbundene Positivierung des aromatischen Ringes die Bildung stabiler Charge-Transfer-Komplexe mit Elektronendonoren begünstigt, sind die Chlorsubstituenten des PCP unter Normalbedingungen resistent gegenüber nucleophiler Substitution wie die chlorierter aromatischer Kohlenwasserstoffe (Crosby, 1981).

### **2.1.3.3 Ökotoxikologische Relevanz**

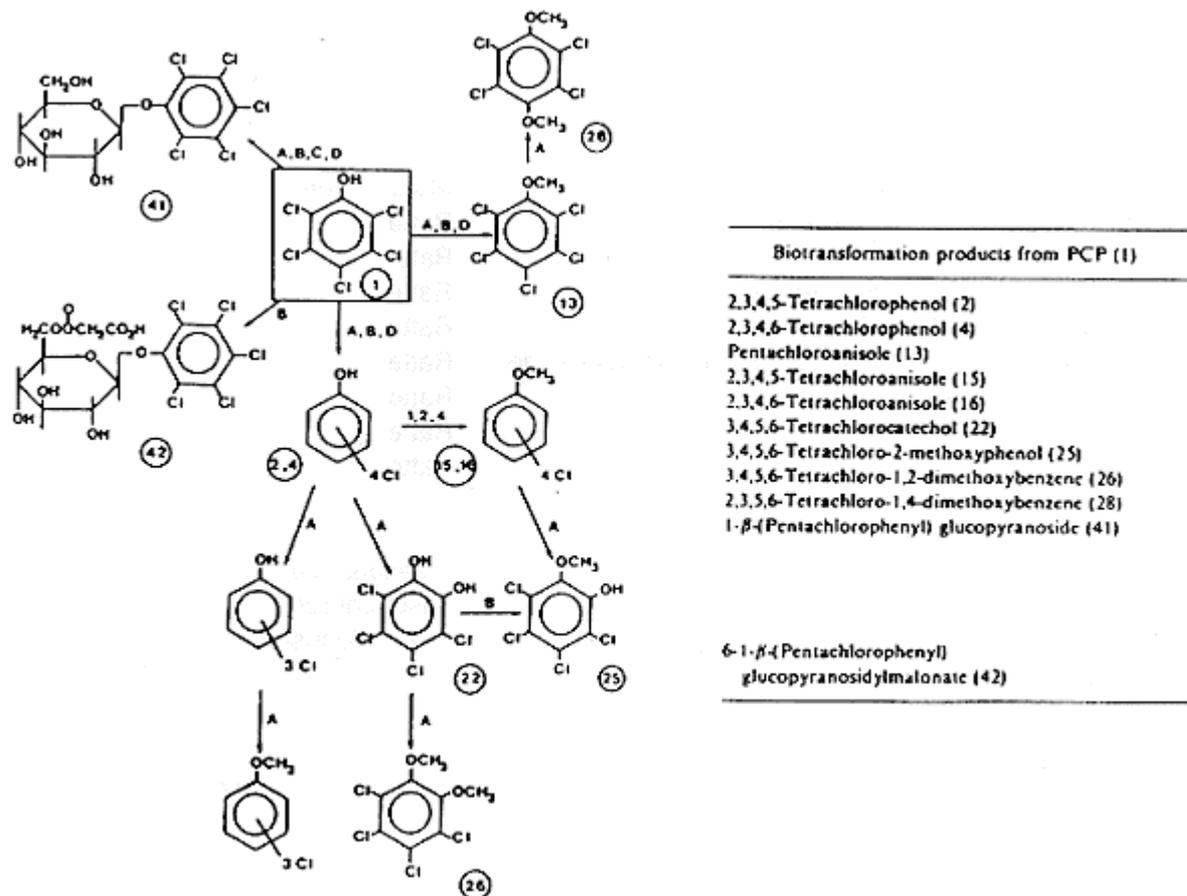
#### Umweltpersistenz, Abbaubarkeit

Der Mensch nimmt PCP durch Inhalation, durch Hautkontakt und über den Magen-Darmkanal auf und PCP verteilt sich anschließend in den Geweben (Gebefügi, 1978).

Lösungen von PCP und PCP-Na werden gut über die Haut resorbiert. Aus den in der Literatur vorliegenden Erkenntnissen lässt sich zudem ableiten, daß inhaliertes PCP mindestens zehnmal wirksamer ist, als bei Zufuhr über den Magen-Darm-Trakt (Grimm, 1987).

PCP wirkt als nicht-strukturspezifischer Inhibitor grundlegender metabolischer Prozesse und ist somit ein starkes Zellgift. Wie alle Chlorphenole fungiert PCP als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung. Dabei wirkt PCP auf die Mitochondrien und auf mikrosomale Enzymsysteme. Die normalerweise mit der Oxidation (z.B. von Glutamat, Pyruvat) verbundene Aufnahme von anorganischem Phosphat wird in Gegenwart von PCP vollständig gehemmt. Morphologisch ist die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung durch eine reversible Schwellung der Mitochondrien gekennzeichnet. Durch die Unterbrechung der Elektronenübertragung zwischen Flavin und Cytochrom b wird der Elektronenfluß zum Sauerstoff unterbrochen. PCP greift also in den Prozeß der zellulären Energieversorgung ein und verhindert die Speicherung der gebildeten Energie in Form von ATP. Ein rapider Anstieg der Stoffwechselaktivität ist die Folge. Diese Wirkungen werden vom PCP selbst und nicht von seinen möglichen Verunreinigungen verursacht (Gebefügi, 1978); ((BUA), 1985); (Grimm, 1987); ((UBA), 1987).

Abb. 2.1-6 gibt eine Übersicht über mögliche Umwandlungsprodukte des PCP in Pflanzen.



**Abb. 2.1-6: Umwandlung von PCP in Pflanzen: Reis-Wurzeln (A), Sojabohnen (B), Weizen (C), Spinat (D) (Engelhardt, 1986)**

Diese unter Treibhausbedingungen oder mit Zellsuspensionen gemachten Beobachtungen zeigen, dass PCP sowohl zu niedriger chlorierten Phenolen und Anisolen, als auch zu Oxidationsprodukten, wie 1,2- und 1,4-Dimethoxytetrachlorbenzol sowie konjugierten Formen chlorierter Phenole, metabolisiert wird (Engelhardt, 1986).

Der Metabolismus von PCP ist bei den verschiedenen Tierarten unterschiedlich und abhängig von der Verabreichungsart.

Tab. 2.1-6 stellt zusammenfassend die in menschlichen und tierischen Leberhomogenaten oder Mikrosomen gefundenen Metabolite dar.

**Tab. 2.1-6 Metabolite des PCP in Mensch und Tier (Renner und Mücke, 1986)**

<i>Biotransformationsprodukte von PCP</i>	<i>in folgender Spezies enthalten</i>
Pentachlorphenylglucuronid	Ratte, Hase, Mensch, Fisch
Pentachlorphenylkonjugate <sup>a</sup>	Maus, Ratte, Schnecke, Wasserläufer, Fisch, Moskito
2,3,5,6-Tetrachlor-1,4-benzochinon (Chloranil)	Hase, Maus
Tetrachlorhydrochinon	Maus, Ratte, Mensch, Raupe, Schnecke, Fisch
Tetrachlorhydrochinonkonjugate <sup>a</sup>	Maus, Ratte
Tetrachlorhydrochinonglucuronide	Ratte
2,3,4,5-Tetrachlorphenol	Ratte
2,3,4,5-Tetrachlorphenylglucuronide	Ratte
2,3,4,6- und/oder 2,3,4,5-Tetrachlorphenol	Ratte
2,3,4,6- und/oder 2,3,4,5-Tetrachlorphenylglucuronide	Ratte
2,3,4-Trichlorphenol	Ratte
2,3,4-Trichlorphenylglucuronide	Ratte
2,3,5-Trichlor-1,4-hydrochinon	Ratte
Pentachlorphenylacetat	Wasserläufer
Pentachloranisol	Taschenkrebs
Pentachlorphenylsulfat	Fisch, Venusmuschel, Hummer <sup>b</sup> , Ratte <sup>b</sup>

<sup>a</sup>) Metabolite können nicht eindeutig dem PCP zugeordnet werden

<sup>b</sup>) Metabolite, die in den Leberhomogenaten oder beziehungsweise den Mikrosomen gefunden wurden

Die Umwandlung von PCP in Tieren und im Menschen erfolgt überwiegend auf drei Wegen (Renner, 1986):

- Konjugation
- hydrolytische Dechlorierung
- reduktive Dechlorierung.



### Bioakkumulation

Die Wasserlöslichkeit von PCP nimmt mit steigendem pH-Wert zu. Umgekehrt verhält sich seine Neigung zur Anreicherung in der organischen Phase, insbesondere im Fettgewebe (Fettlöslichkeit 213 g/kg nach OECD).

Bei Fischen stellen Galle und Leber die Hauptspeicherorgane für PCP dar. Hier wird PCP überwiegend als Glucuronid nachgewiesen. Nach Rücküberführung der belasteten Tiere in reines Wasser erfolgt meist rasche und vollständige Eliminierung ((BUA), 1985).

PCP kann von Pflanzen aufgenommen werden. Baumwollpflanzen, die mit einer PCP-Formulierung besprüht worden waren, nahmen bis ca. 2 mg PCP/kg in die Samenkörner und das zehnfache bis fünfzehnfache in die Samenkapseln auf ((BUA), 1985).

Aufgrund einer Studie der Dow Chemical Company (Braun, 1979) an vier freiwilligen Versuchspersonen nahm man bisher an, daß die Ausscheidungskinetik des Menschen gut mit dem Rattenmodell übereinstimmt. Aus der kurzen Plasma-Eliminationshalbwertszeit von 30 Stunden errechnete sich eine nach 8,4 Tagen erreichbare Plasma-Gleichgewichtskonzentration (steady state) von 0,5 mg PCP/l bei täglicher Aufnahme von 0,1 mg/kg Körpergewicht. Diese Dosis entspricht in etwa der pulmonalen Aufnahme bei einer PCP-Konzentration von 0,5 mg/m<sup>3</sup>.

Eine Studie aus der Arbeitsgruppe des Schweizer Toxikologen Schlatter (Uhl, 1986) kam zu völlig anderen Ergebnissen: Die Ausscheidungs-Halbwertszeiten lagen um das dreizehnfache höher als bei der Dow-Studie. Somit errechnete sich eine entsprechend höhere PCP-Plasmakonzentration, die erst nach drei Monaten bei täglicher Aufnahme von 0,1 mg/kg Körpergewicht erreicht wird. Die Autoren folgern aus ihrem Selbstversuch, daß die Belastung im steady state ca. zehn bis zwanzigmal höher liegt als der Wert, den man durch Extrapolation aus pharmakokinetischen Untersuchungen beim Tier erhält (Rosner, 1987).

Die von Lu et al. (1978) in einem aquatischen Ökosystem gefundenen Konzentrationen deuten auf eine Anreicherung in der Nahrungskette hin (Tab. 2.1-7).

**Tab. 2.1-7 PCP-Konzentrationen in verschiedenen Spezies eines Modell-Ökosystems ((Lu, 1978) entnommen aus ((BUA), 1985))**

<i>Vorkommen</i>	<i>Konzentration</i>
Wasser	0,0027 mg/l
Algen (Oedogonium card.)	0,0043 mg/l
Moskitolarven (Culex pipiens)	0,0465 mg/l
Schnecken (Physa spp.)	0,329 mg/l
Daphnien (D. magna)	0,448 mg/l
Moskitofisch (Gambusia affinis)	0,804 mg/l

### Toxizität

Bei verschiedenen Vergiftungsfällen, vor allem durch berufliche Exposition mit PCP, wurden u. a. folgende Symptome beschrieben: Hyperthermie (starkes Schwitzen, starkes Durstgefühl, erhöhte Körpertemperatur), Hyperventilation (Beschleunigung von Puls und Atmung), allgemeine Mattigkeit, Schwindelgefühl, mentale Desorientierung, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Reizungen der Schleimhäute der Augen und Atemwege, Hyperglykämie (hoher Blutzuckergehalt) und Glucosurie (Ausscheidung von Zucker im Harn). Erste toxische Wirkungen traten nach Beobachtungen am Arbeitsplatz im Bereich zwischen 300 und 4.000 µg/l in Serum auf. Typisch bei hoher Dosis ist eine rasche Verschlechterung des Zustandes bis zum Tod infolge Herzversagens, Atemlähmung oder Lungenödem. Bei den in der Literatur beschriebenen akuten PCP-Vergiftungen starben fast alle Patienten innerhalb von 24 Stunden nach dem ersten Auftreten der Symptome (Rosner, 1987); ((UBA), 1987). Für den Menschen wird eine letale Dosis von 50-500 mg/kg geschätzt (Rippen, 1995).

Dagegen existieren viele Untersuchungen zur toxischen Wirkung des PCP, von Pflanzen über Invertebraten bis hin zu höheren Lebensformen wie Fischen und Säugetieren. Tab. 2.1-8 zeigt eine Auswahl verschiedener Wirbeltiere, da in dieser Arbeit nur mit Minipigs gearbeitet wurde. Genaue Daten für Minipigs konnten allerdings nicht gefunden werden.

**Tab. 2.1-8 Letale Dosis von PCP für verschiedene Wirbeltiere**

<i>Tierart</i>	<i>LD<sub>50</sub> (mg/kg)</i>	<i>Applikation</i>	<i>Zitat</i>
Maus	36-177	oral	a, b
Ratte	71-210	oral	a, b
Kaninchen	550	dermal	c
Meerschweinchen	266	dermal	b
Hamster	70-85	subkutan	b
Hund	135	subkutan	b
Schaf	120	oral	b
Rind	140	oral	b
Mensch	50-500 geschätzt	oral	c

a) BUA 1985      b) WHO 1987      c) Rippen 1995

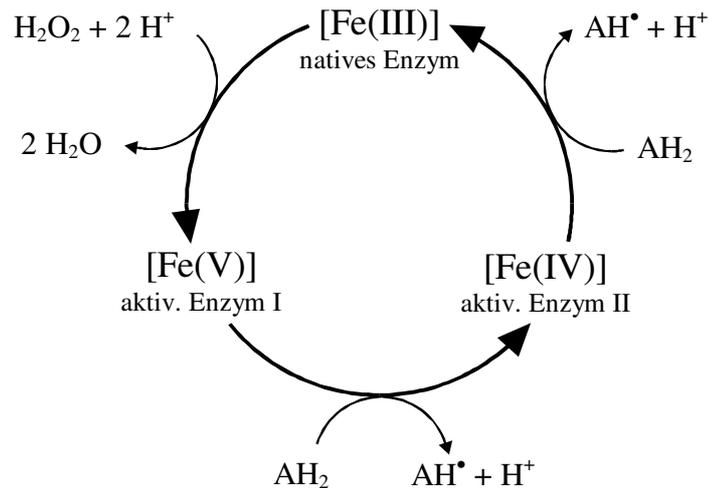
Einige Langzeitversuche mit Mäusen, die zwei Jahre lang technisches PCP erhalten hatten, ergaben neben anderen Wirkungen eine eindeutige kanzerogene Wirkung von PCP. Ein Einfluss von Verunreinigungen wie Dioxinen oder Furanen in den verabreichten Produkten konnte ausgeschlossen werden. Dagegen zeigte sich bei einem Langzeitversuch an Ratten mit täglichen PCP-Dosen von bis zu 30 mg/kg Körpergewicht kein Anzeichen einer kanzerogenen Wirkung. Der epidemiologische Nachweis, dass PCP auch beim Menschen bösartige Neubildungen hervorrufen kann, konnte bislang nicht erbracht werden (Letzel, 1996).

## 2.2 Erkenntnisse zur biogenen Bildung von PCDD/F

### 2.2.1 Peroxidasen

Peroxidasen sind meist Fe(III)-haltige Hämoproteide, die Bisubstratreaktionen katalysieren. In der Regel übertragen sie unspezifisch Elektronen von einem Donormolekül auf Wasserstoffperoxid. Als Substrate eignen sich phenolische Verbindungen, aromatische Amine, Hydrochinone und Benzidinderivate (Pütter & Becker 1983). Daneben katalysieren Peroxidasen auch Halogenierungs- und Dehalogenierungsreaktionen (Libby et al. 1981). Peroxidasen sind in biologischen Systemen weit verbreitet und obligate enzymatische Bestandteile aller aeroben Organismen (Pütter & Becker 1983). So sind z.B. die Myeloperoxidase in den Granulocysten des Blutes und die Lactoperoxidase in Kuhmilch zentraler Bestandteil antimikrobieller Systeme, und die Lignin- und Chloroperoxidase verschiedener Pilze spielen eine entscheidende Rolle beim Ligninabbau.

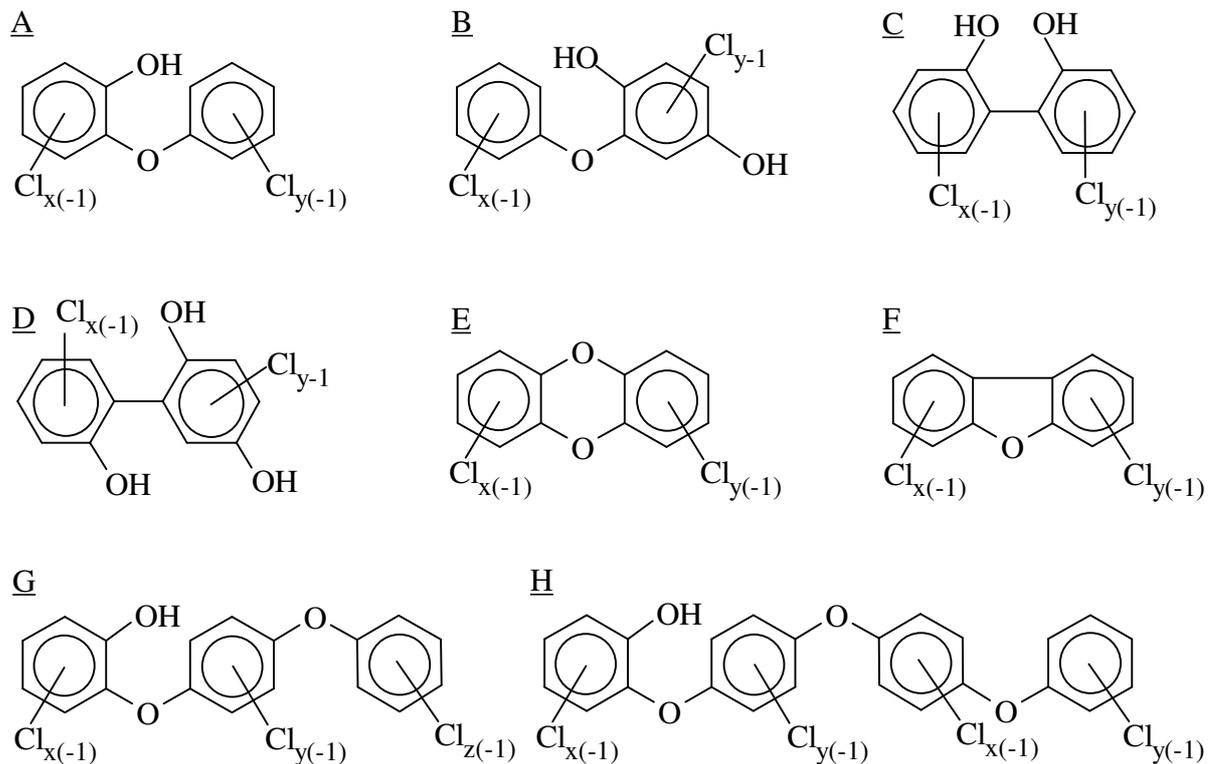
Peroxidasen bilden in einem katalytischen Zyklus an zwei Stellen radikalische Substratintermediate (Öberg et al. 1990). Native Peroxidasen besitzen als prosthetische Gruppe einen Porphyrinringsystem mit dreiwertigem Ferri-Eisen als Zentralatom. In diesem Grundzustand reagieren Peroxidasen mit in biologischen Systemen allgegenwärtigem Wasserstoffperoxid als Elektronenakzeptor zum Komplex I. Dieser reagiert in zwei diskreten 1-Elektron Schritten über den Komplex II wieder zurück in den Grundzustand, wobei zwei Substratmoleküle oxidiert werden (Abb. 2.2-1).



**Abb. 2.2-1: Reaktionsmechanismus von Peroxidasen (Öberg et al. 1990)**

Die im katalytischen Zyklus gebildeten freien Substratradikale reagieren sekundär in radikalischen Kopplungsreaktionen weiter. Phenoxyradikale als Oxidationsprodukte phenolischer Substrate dimerisieren bevorzugt über eine C-O-C Etherbindung zu Phenoxyphenolen und dechlorierten chinoiden Dihydroxydiphenylether (Abb. 2.2-2: A, B) (Wagner 1990). Die Kopplung zweier Kohlenstoffatome führt zur Bildung von Dihydroxybiphenylen und dechlorierten chinoiden Trihydroxybiphenylen (Abb. 2.2-2 :C, D). Neben dimeren Kopplungsprodukten entstehen auch trimere und tetramere Strukturen, in denen die Monomere über C-O-C Etherbindungen und/oder C-C Bindungen verknüpft sind (Abb. 2.2-2: G, H) (Maloney et al. 1986). Parallel zu diesen Kopplungsreaktionen treten Dechlorierungs- und Umchlorierungsprozesse auf.

Die Dimerisierung zweier niederchlorierter Phenoxyradikale zu PCDD/F (Abb. 2.2-2: E, F) ist verglichen mit der Bildung der obengenannten Polymerisationsprodukte quantitativ von untergeordneter Bedeutung. Mit steigendem Chlorierungsgrad der eingesetzten Chlorphenole erhöht sich allerdings die Ausbeute an PCDD/F bei peroxidasekatalysierten Kopplungsreaktionen. Dies wird mit einer verringerten Anzahl von konkurrierenden Kopplungsmöglichkeiten der gebildeten Phenoxyradikale erklärt (Wagner 1990).



**Abb. 2.2-2: Reaktionsprodukte der peroxidasekatalysierten Kopplung von Chlorphenolen (nach (Wagner, 1990) und (Maloney et al. 1986))**

Klimm et al. untersuchten 1995 nach der Feststellung von erhöhten Konzentrationen an polychlorierten Dibenzo-p-dioxinen (insbesondere von OCDD) in Klärschlämmen die mögliche biogene Bildung in den einzelnen Prozeßstufen, da unter Berücksichtigung aller bekannten PCDD/F-Quellen, Eintragswege und Anreicherungen nur ca. 60% der bestimmten Menge erklärt werden können. Auch hier kam PCP als Precursor und Tracersubstanz zum Einsatz. Diese Untersuchungen konnten zwar eine Bildung von Dioxinen im Klärschlamm nachweisen, aber die detektierten Mengen reichten jedoch in keinsten Weise zur Erklärung der erhöhten Werte im Klärschlamm aus.

Auch Wittsiepe et al. beschäftigten sich 2000 mit der Peroxidase-katalysierten *In-vitro*-Bildung von PCDD/F aus Chlorphenolen. Unter Verwendung von Myeloperoxidase konnten Kondensationsprodukte nachgewiesen werden.

Die hierbei gebildeten Mengen an PCDD/F bewegten sich ebenfalls im Bereich von  $\mu\text{mol/mol}$  Precursor.

### **2.2.2 *In vivo* Bildung von PCDD/F**

Erst in allerjüngster Zeit wurden auch *In-vivo*-Untersuchungen zur möglichen biogenen Bildung von Dioxinen unternommen. In Versuchen an Kühen (Fries et al. 2000) wurden erhöhte Mengen an HpCDD und OCDD nach der Verfütterung von PCP-behandeltem Holz festgestellt. Der größte Anteil daran wurde in den Exkrementen gefunden, und Inkubationsversuche deuteten mehr auf eine verstärkte Bildung nach der Ausscheidung als während der Verdauung im Darm hin.

Mehrere andere Forschungsgruppen beschäftigten sich dagegen mit Vorgängen in Sedimenten.

Hoekstra et al. 2000 versuchten die völlige Neubildung von Dioxinen, nicht nur aus Vorstufen, sondern sozusagen die biogene Komplettsynthese zu beweisen. Dazu wurden verschiedene Probenahmestellen in einem Nadelwald, an denen bereits früher eine Chloroformbildung nachgewiesen wurde, mit  $\text{Na}^{37}\text{Cl}$  markiert und für ein Jahr versiegelt. In mehreren Fällen konnte eine deutliche Verschiebung des natürlichen Chlor-35/37-Verhältnisses bestätigt werden, sowohl in verschiedenen Chlorphenolen als auch Dioxinen, was nur durch einen Einbau des markierten  $\text{Na}^{37}\text{Cl}$  zu erklären ist.

Dagegen beschäftigten sich Gaus et al. und Green et al. mit historischen Bodenproben, die zum einem aus (mittels Radionuklidmethode auf ca. 1900) datierten Meeressedimenten aus North Queensland, Australien, zum anderen aus bereits um 1870 gesammelten und versiegelt aufbewahrten Bodenproben aus Großbritannien und Illinois, USA bestanden. In beiden Fällen konnten ungewöhnliche Mengen und Verteilungsmuster an PCDD/F festgestellt werden.

Außerdem wurden nach Medienberichten über hohe Dioxinwerte in Tierfutter, die auf die beigemengte Tonerde zurückgeführt werden konnten, von Rappe et al. verschiedene Ton- und Kaolinproben aus den USA und Deutschland auf ihren Dioxingehalt untersucht. Hier wurde erstaunlicherweise festgestellt, daß

alle Tonerden und die deutsche Kaolinprobe extrem hohe Dioxingehalte aufwiesen, besonders an OCDD (bis zu 23000 pg/g), aber auch das stark toxische 2,3,7,8-TCDD konnte einwandfrei nachgewiesen werden (bis 240 pg/g), jedoch kaum Furane. Dagegen waren die übrigen Kaoline nur gering belastet.

Rappe et. al. untersuchten außerdem mehrere Bodenproben von natürlichen und künstlichen Seen im Mississippigebiet. Diese wurden ebenfalls mit <sup>137</sup>Cs-Radionuklidmethode auf einen Zeitraum von 1970 bis deutlich vor 1950 datiert. Mit einer „umfangreichen Methodik“ wurden mit einem „angemessenen Grad an wissenschaftlicher Sicherheit“ menschliche Quellen für die gefundenen PCDD/F-Werte ausgeschlossen und somit auf eine natürliche Bildung zurückgeführt.

In den Jahren 2002 und 2003 veröffentlichte eine Arbeitsgruppe um Gaus und Prange mehrere Arbeiten über bisher ungeklärte PCDD/F-Werte in Bodenproben aus Queensland, Australien. Diese zeigten ebenfalls ungewöhnliche Verteilungsmuster. Als mögliche Ursache dafür wurden Waldbrände vermutet, dies konnte jedoch ausgeschlossen werden. Sie tragen aber zur Umverteilung der vorhandenen Kontaminationen bei, was weitere Untersuchungen erschwert. Dagegen ließen die Untersuchungen einen weiteren möglichen Grund wahrscheinlicher erscheinen:

Während in der obersten Bodenschicht noch hohe Konzentrationen sowohl an PCDD als auch PCDF gefunden wurden, waren in tieferen Schichten (bis 3,5 m) fast nur noch OCDD und HpCDD zu finden. Generell werden PCDD/Fs als unbeweglich betrachtet, was vertikale Migration im Boden betrifft. Deshalb, und weil im seltenen Fall einer Überladung und Migration in tiefere Schichten alle PCDD/F gleichermaßen betroffen wären, wurde dies ausgeschlossen. Vielmehr waren die Verteilungsmuster in der obersten Schicht typisch für eine Kontamination mit PCP. Dieses besitzt eine bessere Mobilität, könnte in die tieferen Schichten migrieren und dort unter unbekanntem Umständen zu OCDD und HpCDD kondensieren.

Insbesondere diese letzten Resultate sind für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse, aufgrund der Verwendung von markiertem PCP als Precursor. Sie legen nicht nur eine Verunreinigung des PCP und anderer Chlorphenole mit PCDD/F bedingt durch die industrielle Synthese nahe, sondern auch eine Aufbaureaktion nach dem Einbringen in die Umwelt. Dieser Möglichkeit soll in dieser Arbeit unter möglichst naturnahen Bedingungen nachgegangen werden.

## 3 Experimenteller Teil

### 3.1 Chemikalien und Geräte

#### 3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, die für die Extraktionen und für analytische Zwecke verwendet wurden, entsprachen dem Reinheitsgrad „p.A.“, außer den Lösungsmitteln mit Reinheitsgrad „zur Rückstandsanalyse“. Die eingesetzten Chemikalien und deren Bezugsquellen sind im folgenden aufgeführt:

<b>Chemikalie</b>	<b>Firma, Firmensitz</b>
<b>PCP-Lösung:</b>	
• $^{14}\text{C}$ -PCP Pulver kristallin	GSF, Neuherberg
• Natriumhydroxid-Lösung (2 mol/l)	Merck, Darmstadt
• n-Hexan	Promochem, Wesel
<b>Soxhlet-Extraktion:</b>	
• Toluol	Promochem, Wesel
• Papierhülsen	Schleicher & Schüll, Dassel- Relliehausen
• Natriumhydroxid-Lösung (2 mol/l)	Grüssing, Filsum
• Aceton	Promochem, Wesel

**Verbrennung:**

- Ultima Gold XR Packard Chemical Operations,  
Groningen, Niederlande
- Permafluor E+ Packard Chemical Operations,  
Groningen, Niederlande
- Carbosorb E Packard Chemical Operations,  
Groningen, Niederlande

**Säulenchromatographie:**

- n-Hexan Promochem, Wesel
- Dichlormethan Promochem, Wesel
- Aceton Promochem, Wesel
- Toluol Promochem, Wesel
- Silica Gel 60 Promochem, Wesel
- Alumina B – Super I ICN Ecochrom, Eschwege
- Florisil RR Promochem, Wesel
- Natriumsulfat Promochem, Wesel
- Int. Standard (100pg/ $\mu$ l PCDD/F) GSF, Neuherberg
- Ausb. Standard (100pg/ $\mu$ l PCDD/F) GSF, Neuherberg

**Szintillationszählung:**

- Ultima Gold XR Packard Chemical Operations,  
Groningen, Niederlande
- Background-Standard LL Packard Chemical Operations,  
Groningen, Niederlande
- $^{14}\text{C}$ -Standard 134800 dpm Packard Chemical Operations,  
Groningen, Niederlande

### 3.1.2 Geräte

- **PCP-Aufreinigung:**

Gerät	Typ	Firma, Firmensitz
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510 H	Bandelin, Berlin
Fein-Waage	R 200 D	Sartorius, Göttingen
Multipipette	Reference 100	Eppendorf, Hamburg

- **Soxhletextraktion:**

Gerät	Typ	Firma, Firmensitz
Heizpilz	U2 500 ml	Isopad, Heidelberg
Multipipette	Reference 100	Eppendorf, Hamburg

- **Verbrennung:**

Gerät	Typ	Firma, Firmensitz
Verbrennungsofen	Tri-Carb Sample Oxidizer	Packard Instrument Company, Meriden, USA
Drucker	LX 850 Modell P80SA	Epson, Meerbusch
Multipipette	Reference 100	Eppendorf, Hamburg

- **Säulenchromatographie:**

Gerät	Typ	Firma, Firmensitz
Rotationsverdampfer	Rotavapor EL 131	Büchi, Flawil, Schweiz
Rotationsverdampfer	Rotavapor RE 121	Büchi, Flawil, Schweiz
Wasserbad	Water Bath 461	Büchi, Flawil, Schweiz
Präzisionswaage	LC 480	Sartorius, Göttingen
Stickstoffabblas- apparatur	Barkey vapo therm basis mobil I	Labortechnik Barkey, Bielefeld
Multipipette	Reference 100	Eppendorf, Hamburg
Multipipette	Reference 1000	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	WU 6100	Haereus, Hanau

- **Szintillationszählung:**

Gerät	Typ	Firma, Firmensitz
Szintillationszähler	Tri-Carb 1000 TR	Packard Instrument Company, Meriden, USA
Drucker	LX 850 Modell P80SA	Epson, Meerbusch

- **Gaschromatographie:**

Gerät	Typ	Firma, Firmensitz
Gaschromatograph	HP 6890	Hewlett Packard, Böblingen
Massenspektrometer	MAT 95S	Finnigan, Bremen
Autosampler	Liquidsampler A 200 SE	CTC Analytics, Zwingen, Schweiz
Drucker	DECLaser 3500	Digital, Palo Alto, USA

- **ASE:**

Gerät	Typ	Firma, Firmensitz
Accelerated Solvent Extraktor	ASE 200	Dionex, Idstein
Gradientenpumpe	ASE 200	Dionex, Idstein

- **Probenvorbereitung:**

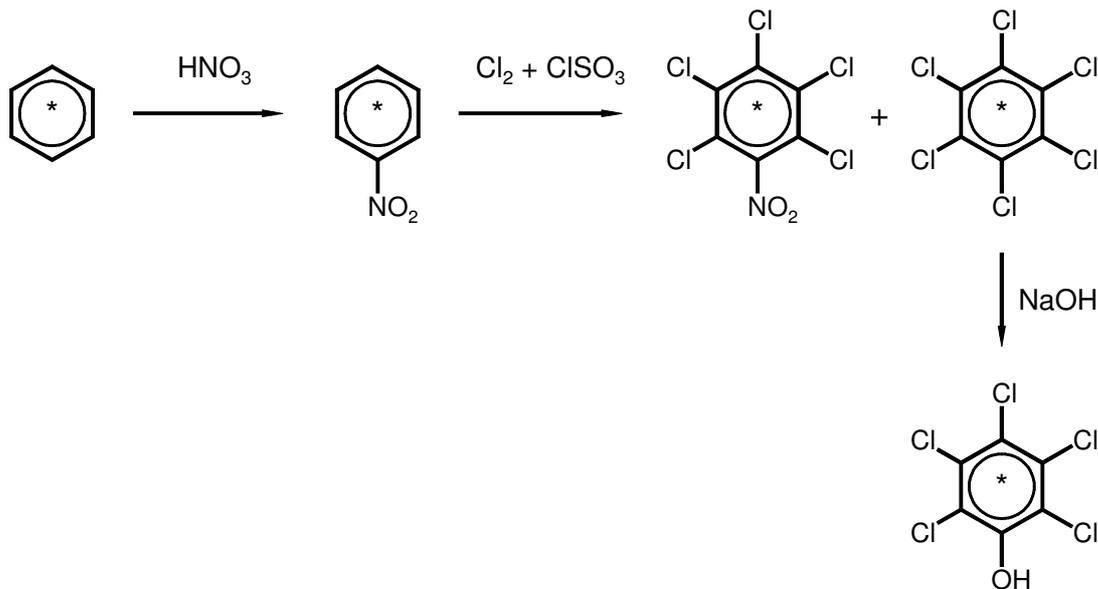
Gerät	Typ	Firma, Firmensitz
Mixer	MX 32 Z	Braun, Kronberg/Taunus
Schüttler	REAX 20	Heidolf
Gefriertruhe	Öko super cc	Liebherr, Bulle, Schweiz
Siebmaschine	Analysette 3	Fritsch, Idar Oberstein
Multipipette	Reference 100	Eppendorf, Hamburg
Multipipette	Reference 1000	Eppendorf, Hamburg

- **Gefriertrocknung:**

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Firma, Firmensitz</b>
Gefriertrockner	Beta 1-16	Christ, Osterode am Harz
Mühle	ZM1	Retsch, Haan

### 3.2 Darstellung und Aufreinigung des PCP

Das PCP wurde hierzu als radioaktiv markierte Tracersubstanz synthetisiert. Als Markierung dient  $^{14}\text{C}$  im phenylischen Ring.



**Abb. 3.2-1 Darstellung des  $^{14}\text{C}$ -markierten PCP**

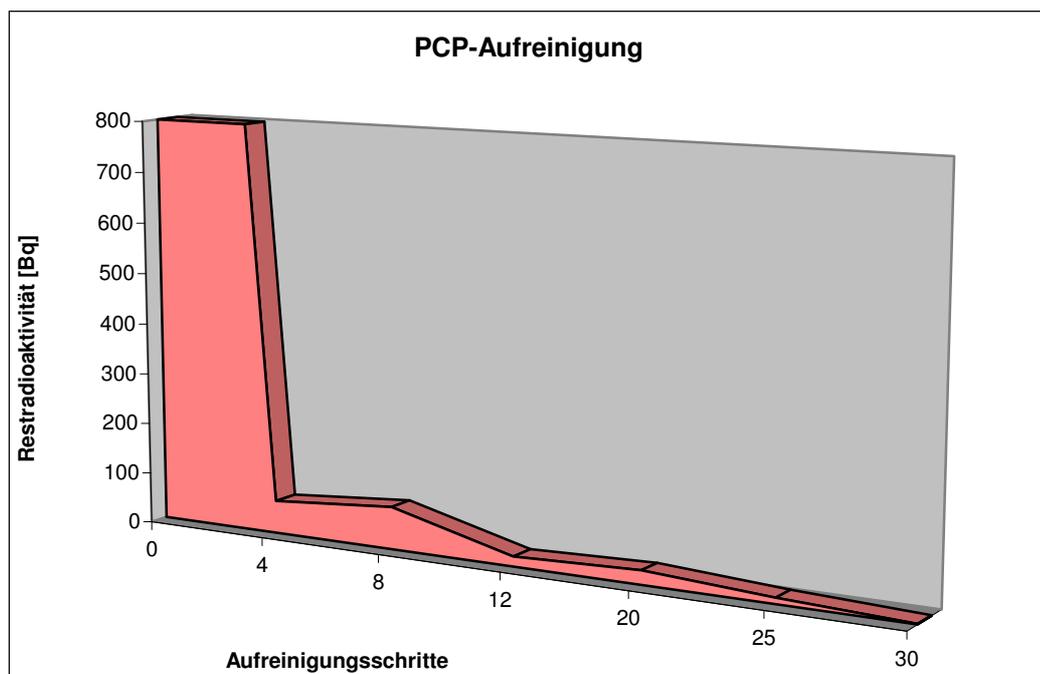
Die Synthese erfolgte bereits im Vorfeld dieser Arbeit durch A. Attar (Sandrock, 1978).

Ausgehend von industriell hergestelltem  $^{14}\text{C}$ -Benzol wird erst zu  $^{14}\text{C}$ -Nitrobenzol nitriert, um anschließend mit gasförmigen Chlor in Chlorsulfonsäure (in Gegenwart von Iod) behandelt zu werden. Man erhält  $^{14}\text{C}$ -Pentachlornitrobenzol (36%) und  $^{14}\text{C}$ -Hexachlorbenzol (45%). Aus letzterem wird mittels alkalischer Hydrolyse mit Natronlauge in Methanol/Wasser  $^{14}\text{C}$ -Pentachlorphenol.

#### Aufreinigung des PCP:

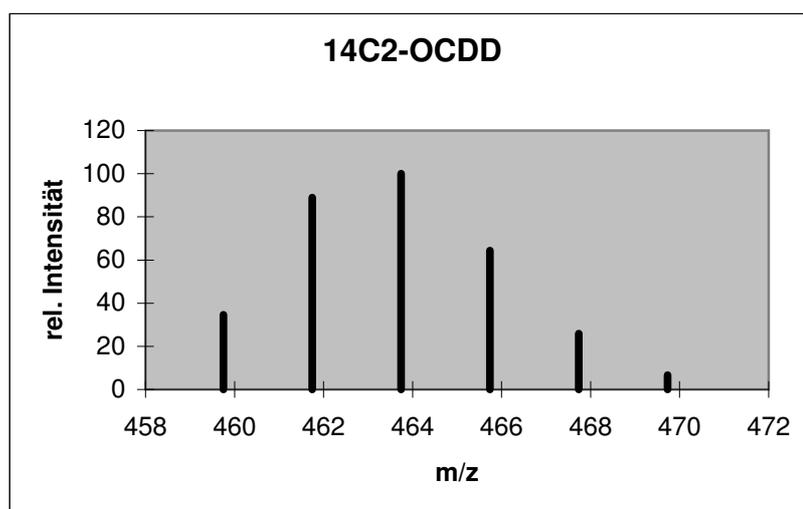
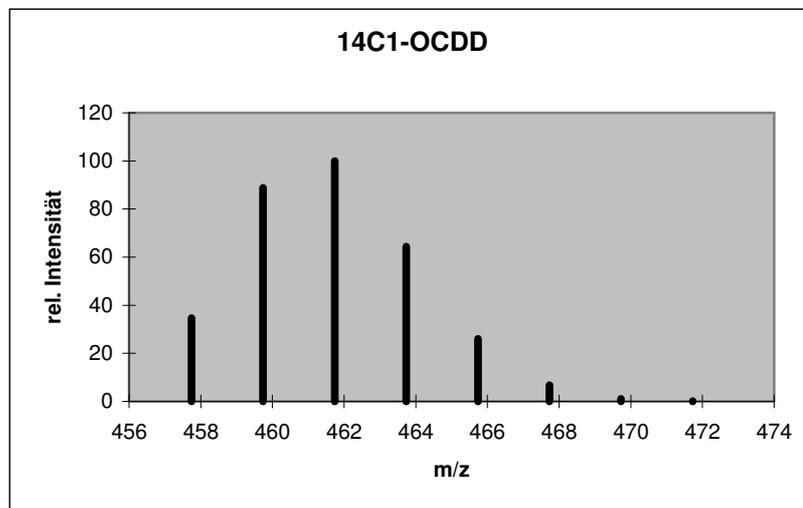
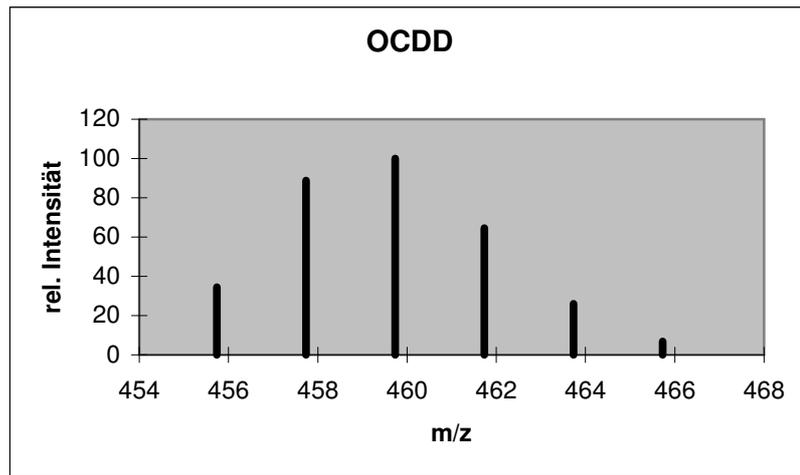
Das kristallin vorliegende PCP mit einer spezifischen Aktivität von 5 Ci/mol wurde in 2N-NaOH-Lösung aufgenommen, bis eine Aktivität von ca.

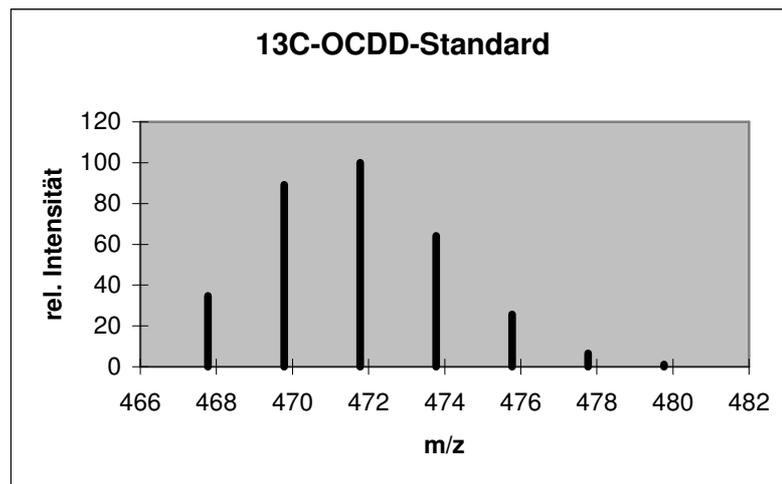
30000 Bq/µl erreicht wurde. Zur Entfernung störender Verunreinigungen, insbesondere von markierten Dioxinspuren, wurde die Stammlösung in mehreren Arbeitsschritten mit n-Hexan im Ultraschallbad ausgeschüttelt. Der Überstand wurde nach erfolgter Phasentrennung vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, um eine unnötige Kontamination zu vermeiden. Dabei war eine vollständige Entnahme der Hexanphase unmöglich, so daß immer ein geringer Anteil Resthexan in den nächsten Vorgang übernommen wurde. Dies führte zu einer Herabsetzung der Trennleistung, was wiederum die hohe Anzahl an Arbeitsschritten begründet. Die Höhe der Restradioaktivität der Hexanphase wurde alle vier Schritte mittels Szintillationszählung überprüft. Abb. 3.2-2 gibt den Verlauf der Aufreinigung wieder.



**Abb. 3.2-2: Abnahme der Radioaktivität der Hexanphase**

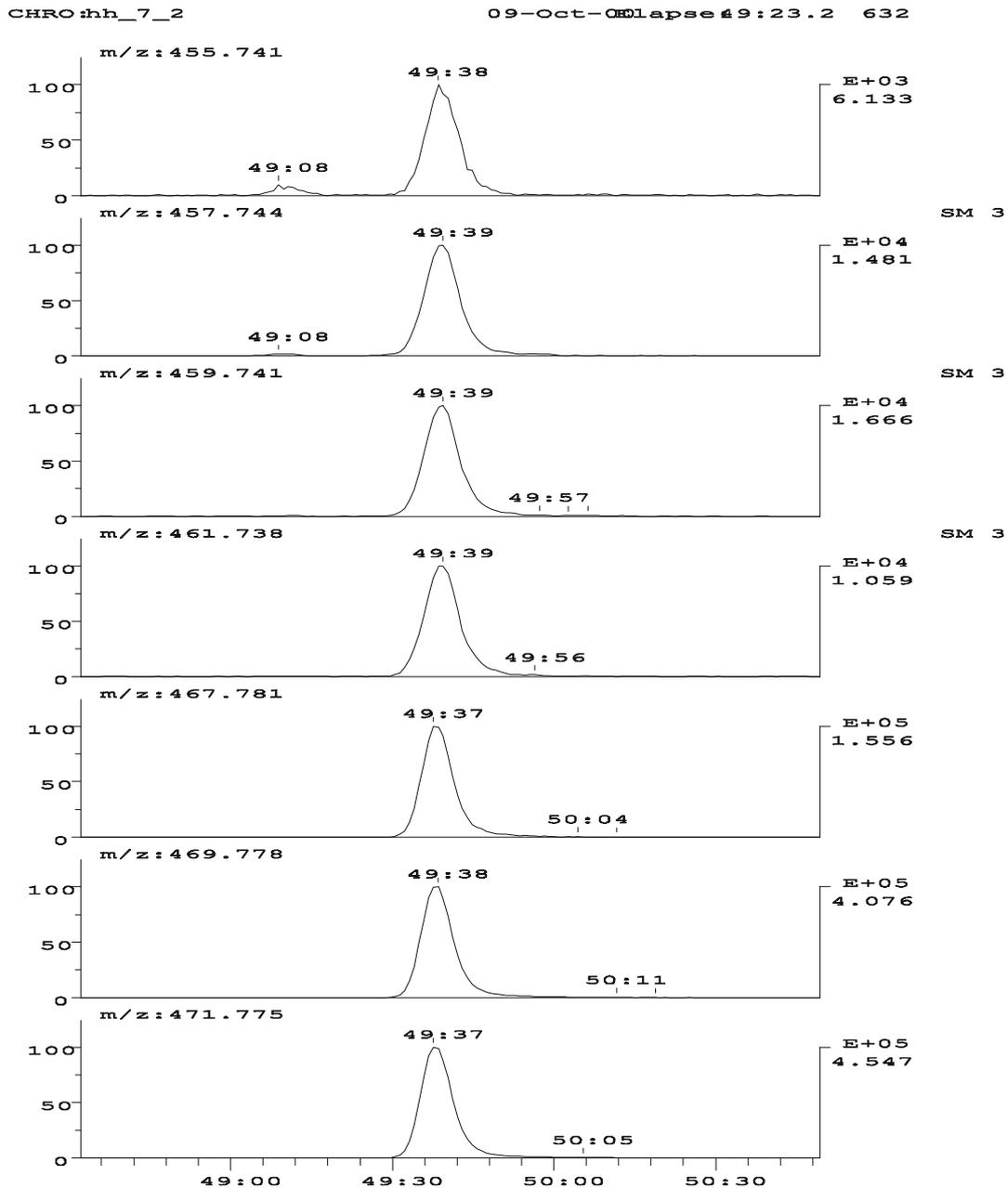
Außerdem wurden die Substanz und die jeweilige Hexanphase mittels GC-MS vermessen, mit besonderem Augenmerk auf etwaige ein- oder zweifach markierte Dioxine und mit der Szintillationszählung verglichen.





**Abb. 3.2-3: Massenverteilung von  $^{14}\text{C}_1\text{-OCDD}$**

Dabei waren für eine genaue Quantifizierung mehrere Hindernisse zu überwinden, da Moleküle mit unterschiedlichen Isotopen trotzdem fast völlig identische Retentionszeiten haben und sich überlagern (siehe auch 3.6.1.4). Ferner haben ein-, zweifach oder gar nicht  $^{14}\text{C}$ -markierte Moleküle sowie  $^{13}\text{C}$ -markierte (als Standard) sehr ähnliche Isotopen- und Zerfallsmuster und überlagern sich demnach auch bei den einzelnen Massenspuren im MS-Spektrum (siehe Abb. 3.2-3: neben nativem OCDD sind auch die gesuchten Kondensationsprodukte aus markiertem PCP,  $^{14}\text{C}_1\text{-OCDD}$ ,  $^{14}\text{C}_2\text{-OCDD}$ , gezeigt). Abb. 3.2-4 zeigt den entsprechenden Ausschnitt aus dem Gaschromatogramm mit den zugeordneten Massenzahlen, aus denen dann die einzelnen Massenprozentanteile der verschiedenen Verbindungen ermittelt werden müssen, um aus der Intensität auf die in der Probe enthaltene Menge zu schließen.



**Abb. 3.2-4: Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Hexanphase**

Natürlich waren die so errechneten Werte niedriger als die Ergebnisse aus der Szintillationszählung, da hier sämtliche radioaktiven Zerfälle aus allen Molekülen gewertet werden, während mit GC-MS nur die Dioxine erfaßt wurden.

**Tab. 3.2-1 Verunreinigung des PCP**

<i>Aufreinigungsschritte</i>	<i>Beginn</i>	<i>4</i>	<i>8</i>	<i>12</i>	<i>20</i>	<i>25</i>	<i>Ende</i>
Gehalt bestimmt mit:							
Szintillationszählung	4921	92	119	28	39	17	n.n.
GC-MS	1013			17			5
Werte in (pg/ $\mu$ l)							

Nur beim letzten Wert dreht sich das Verhältnis um und das Ergebnis der GC-MS-Messung ist höher als das der Szintillationszählung. Dies ist aber nicht weiter verwunderlich, weil hier die Auflösung der Szintillationsmethode erreicht wurde. Der eigentliche Messwert betrug 1 Bq, was bereits unter die natürliche Hintergrundstrahlung fällt. Aber auch der Wert mittels GC-MS bewegt sich nahe an der Nachweisgrenze. Deshalb wurden hier für die Bestimmung die Molekülonen M+2 und M+4 und nicht wie sonst M+6 und M+8 herangezogen, da diese nicht das geforderte Signal/Rauschverhältnis von 3:1 erreichten (siehe 3.6.1.4).

### 3.3 Minipigversuch

#### 3.3.1 Vorbereitung und Aufbau

Naheliegendste Möglichkeit eines *in vivo* Experiments ist ein Tierversuch. Für die Wahl der Versuchstieres waren folgende Faktoren ausschlaggebend:

- Physiologisch möglichst nah am Menschen liegend
- Nicht zu aufwendige artgerechte Haltungsbedingungen
- Kosten
- Platzbedarf

Physiologisch am nächsten zum Menschen sind Affen, aber derartige Tiere würden allen anderen Anforderungen zuwider laufen. Außerdem ist eine Ähnlichkeit zum Menschen vor allem bei der Darmflora und dem Stoffwechsel von Interesse, deshalb fiel die Wahl auf Göttingen Minipigs, da Schweine dem Menschen in diesen Punkten sogar ähnlicher sind als Primaten. Ferner sind Göttingen Minipigs spezielle Zuchttiere, die mikrobiologisch definiert und kontrolliert sind. Sie stammen aus abgeschlossenen Zuchtstationen mit Zertifikat und Gesundheitsüberwachung. Aufgrund der geringeren Größe sind sie auch leichter zu handhaben als gewöhnliche Hausschweine und benötigen weniger Platz und Nahrung. Einziger Züchter dieser Tiere weltweit mit Genehmigung der Universität Göttingen stellt die Firma Ellegaard aus Dänemark dar, von wo die Tiere bezogen wurden.

Ursprünglich war die Anschaffung von sechs Tieren geplant, je drei männlichen und drei weiblichen. Aus Personal- und Platzmangel wurde die Zahl aber auf zwei männliche Minipigs reduziert. Das Alter betrug 6 Monate, bei dem die Geschlechtsreife bereits erreicht ist, das Gewicht ca. 14 kg. Die Haltung erfolgte im Gebäude 35 der GSF, Bereich Tierhaltung (Prof. Schmidt). Ein abgetrennter Bereich wurde mit Schutzfolie ausgelegt, um eine Kontamination der Raumes zu verhindern. Da auch Urin- und Fecesproben

gesammelt werden sollten, wurden zwei Metabolismuskäfige verwendet, mit einer Stangenbreite von 1 cm und einer Lückenbreite von 0,5 cm:



**Abb. 3.3-1 Metabolismuskäfige der Minipigs**

### **3.3.2 Durchführung**

Zweimal täglich wurden die Minipigs mit je 170 g speziellen Trockenfutter in Pelletform gefüttert (am Wochenende nur einmal täglich mit 320 g). Wasser stand *ad libitum* den ganzen Tag in einem Trog zur Verfügung, nachdem sich eine Tränke mit Nippelventil und Schlauchzuführung (wie in Abb. 3.3-1 noch zu erkennen) als unbrauchbar erwiesen hatte, da das Ventil von den Schweinen zum Spielen verwendet wurde und sich unnötig viel Wasser mit dem Urin vermischte.

Nach einer Eingewöhnungsphase von zwei Wochen erfolgte die Applikation des  $^{14}\text{C}$ -PCP mit dem Futter. Dazu wurden einmal täglich (9:00h) zur ersten Fütterung mehrere Pellets mit 100  $\mu\text{l}$  (= 119000 Bq oder 0,17 mg  $^{14}\text{C}$ -PCP) der verdünnten PCP-Lösung (ausgehend von einer Strahlendosis von 1,19 MBq/ml) mittels einer Eppendorfpipette dotiert und vor der Mahlzeit dem Minipig mit einer Art Schöpflöffel verabreicht, um die vollständige Aufnahme zu gewährleisten (Abb. 3.3-2 und Abb. 3.3-3). Nach zwei Wochen wurde die Dosis auf 200  $\mu\text{l}$  verdoppelt.



**Abb. 3.3-2** Dotierung des Futters



**Abb. 3.3-3 Vorabfütterung mit der Tracersubstanz**

Die gewählte Dosierung stellte sicher, dass eine Vergiftung der Tiere vermieden werden konnte, und ihnen unnötiges Leiden zu ersparen. Es sollte jedoch auch eine gut detektierbare Radioaktivität gewährleistet werden. 0,17 mg pro Tag entsprechen bei einem Gewicht von 14 kg demnach 0,012 mg/kg Körpergewicht.

Diese Dosis sollte keinerlei toxische Wirkung zeigen, da die  $LD_{50}$  zwischen 27 und 300 mg/kg angegeben wird (BUA-Stoffbericht von 1985, diverse Tiere).

Zur vollständigen Bilanzierung wurde Urin über den ganzen Tag gesammelt, das Volumen notiert und eine Probe von 500ml genommen und eingefroren, der Rest als Sondermüll vernichtet. Kot wurde täglich vom Zwischenrost

gesammelt, und möglichst alle Reste aus dem Käfig entfernt, um komplett eingefroren zu werden.

Nach Ablauf der Versuchszeit von einem Monat wurden die Tiere von Dr. Ruprecht (Tierschutzbeauftragter der GSF) eingeschläfert und anschließend von Dr. Schäffer (Pathologie) sezirt. Dabei wurden alle inneren Organe (Leber, Niere, Milz, Galle, Bauchspeicheldrüse, Herz, Großhirn, Kleinhirn, Teile von Lunge, Dickdarm und Dünndarm) aber auch Hoden, Muskelgewebe und Fettgewebe ganz oder teilweise entnommen und in Gefrierbeuteln bei  $-40^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 3.4 Waldbodenversuch

#### 3.4.1 Vorbereitung und Aufbau

Für das zweite Experiment wurde Waldbodenstreuauflage als Matrix gewählt. Durch Kontakt mit Dr. Reischl vom Geologischen Landesamt Bayern (GLA) wurden zwei Gebiete ausgewählt, die auch vom GLA beprobt und überprüft wurden. Es sollten zwei verschiedenen Böden sein, die sich in natürlichem Halogengehalt, AOX-Werten und Dioxinbelastung unterscheiden. Deshalb fiel die Wahl auf die Regionen Hof/Weiden (Nr. 690) und Burghausen (Nr. 315). Vom GLA wurden folgende physikalischen und chemischen Daten ermittelt:

**Tab. 3.4-1 Bodendaten**

	315	690
Horizont-Symbol	L, Of, Oh	L, Of, Oh
Kohlenstoffgehalt (%)	42,9	42,8
Stickstoffgehalt (%)	1,8	1,4
PH-Wert	3,42	2,92
KAK <sub>eff</sub> (meq/kg)	261	266
AOX (mg/kg TS)	266	351
BET (qm/g)	2,18	2,91

Da es sich um Auflagematerial handelt, wurde eine Korngrößenbestimmung nicht durchgeführt

Nach ihrer Lieferung wurden die Bodenproben bis zu ihrer Verwendung bei 10°C gelagert. Dann wurden sie zuerst gesiebt (Maschenbreite 2 mm, Siebmaschine delta), um Steine und Kiesel zu entfernen. Diese würden zu einer unregelmäßigen Gewichtsverteilung führen, und im folgenden Schritt den Mixer beschädigen. Da die Proben außer Erde auch Nadeln, Zweige,

Wurzeln, Moos und einige wenige Blätter enthielten, wurden sie anschließend noch mit einem handelsüblichen Mixer (Marke Braun) zerkleinert, um homogene einzelne Proben bei der Aufteilung (siehe 3.4.2) zu erzeugen. Auf eine Trocknung wurde verzichtet, um möglichst nah an natürlichen Bedingungen zu bleiben.

### 3.4.2 Durchführung

Zur vollständigen Durchmischung des Probenmaterials mit der markierten PCP-Lösung wurde der fertig vorbereitete Boden komplett in eine große Flasche mit Schliffkolben überführt. Die Flasche hatte ein Volumen von 10 l und war seitlich vom Glasbläser durch Eindrücken der Wand modifiziert worden, und so zu einer Art Waschtrommel umfunktioniert, um eine gute Durchmischung zu erreichen.

Jeweils die Hälfte der PCP-Lösung, mit einer Aktivität von 257200 Bq/ml, was einer absoluten Menge von 18,4 mg PCP entspricht, wurde der Probe zugesetzt und 24 Stunden durch Rotation um die Längsachse der Flasche gemischt.



Abb. 3.4-1 Homogenisierung der Bodenproben

Anschließend wurde der fertige Ansatz auf 200ml Erlenmeyerkolben verteilt, die mit luftdurchlässigen Kulturstopfen aus Kunststoff verschossen wurden. Insgesamt wurden pro Bodentyp 18 Kolben mit je 20 g PCP-versetzter Probe gefüllt.

Die Inkubation der Proben erfolgte über einen Zeitraum von 3 Monaten, im Abzug unter einer Schutzhaube, um kontinuierlich gleiche Temperatur, Luftfeuchte und Luftdruck zu gewährleisten.

Alle zwei Wochen wurden je drei Kolben entnommen, und nach Einschweißen in Gefrierbeuteln bei  $-40^{\circ}\text{C}$  bis zur Analyse eingefroren.

### 3.5 Radioaktivitätsanalytik

Zur Bestimmung der Radioaktivität einer Probe wurde ein Flüssigszintillationszähler (Marke Packard Tri-Carb 1600) verwendet. Dazu muss der Analyt allerdings in flüssiger Phase vorliegen bzw. selbst flüssig sein. Im Falle von Feststoffen wie den Feces- oder Organproben der Minipigs war deshalb vorher eine Verbrennung nötig.

#### 3.5.1 Verbrennung

Bei dieser Methode werden alle oxidierbaren organischen Kohlenstoffverbindungen vollständig zu Kohlenstoffdioxid verbrannt, und anschließend in einer Gasfalle absorbiert und in den Cocktail zur Szintillationszählung überführt. Da alles radioaktive Material als PCP vorlag, sollten also sämtliche markierten PCP und eventuellen Metaboliten und Abbauprodukte, die bei den Versuchen entstanden sein könnten, auf diese Weise komplett erfasst werden.

Von den zu untersuchenden Proben wurden dazu jeweils dreimal ca. 200 mg abgewogen und in drei Verbrennungshütchen aus Zellstoff gefüllt, das mit einem Zellstoffdeckel verschlossen wurde. Diese Dreifachbestimmung sollte Ausreißer durch z.B. Mengenschwankungen ausgleichen.

Vor Beginn der Vermessung der Proben wurden erst eine Leerverbrennungen durchgeführt, um die Apparatur von eventuellen Rückständen, die Blindwerte verursachen könnten, zu reinigen. Dies wurde dann durch Verbrennung einer Standardprobe mit einer Sollaktivität von 480 kBq/10 µl überprüft. Erst dann wurde mit der eigentlichen Analyse begonnen. Die Hütchen werden dabei in einer Heizspule mittels Induktion auf ca. 2000°C erhitzt. Die Dauer der Heizperiode ist variabel und sollte zur vollständigen Verbrennung der Probe führen. Ein Wert von 2 min erwies sich als angemessen mit genügend Spielraum für leichte Schwankungen aufgrund unterschiedlicher Konsistenz oder höherer Einwage der Probe. Nach 30 Verbrennungsschritten wurden

wieder drei Leerverbrennungen durchgeführt und erneut ein Standard verbrannt. Diese Überprüfung auf Blindwerte war eine Maßnahme zur Qualitätssicherung und ergab stets nur den Sollwert innerhalb tolerierbarer Schwankungen von 2%.

### **3.5.2 Szintillationszählung**

Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte in einem Szintillationszähler der Firma Hewlett-Packard (Tri-Carb 1600 TR). Das Vorgehen und das Messprotokoll hingen dabei vom Aggregatzustand, Aktivität und Menge der Probe ab.

Feste Proben waren nach dem Verbrennungsvorgang (siehe 3.5.1) bereits automatisch in einem Szintillationsgefäß mit 15 ml Szintillationscocktail (Carbosorb/Permafluor) vorgelegt.

Für flüssige Proben wurden verschiedene Methoden angewendet:

Von Urinproben wurden direkt ein Aliquot (5 ml) im Vial mit 10 ml Carbosorb versetzt und vollständig durchmischt.

Den Soxhlet-Extrakten (siehe 3.6.1.2) wurden jeweils 5 ml entnommen, dreimal mit 5 ml 2N-NaOH ausgeschüttelt, und sowohl das gereinigte Extrakt als auch 5 ml der NaOH-Phase mit je 10 ml Cocktail (Carbosorb) im Gefäß vermischt.

Die Ausgangslösung des  $^{14}\text{C}$ -PCP wurde aufgrund des geringen Volumens und der hohen Aktivität nur in Mengen von 100  $\mu\text{l}$  mit 15 ml Szintillationslösung versetzt.

Zur Überprüfung des Verbleibs der Radioaktivität während der Clean-ups wurde nach den einzelnen Schritten jeweils 1 ml der Probe entnommen und in 15 ml Carbosorb gelöst.

Anschließend wurden die radioaktiven Zerfälle im Szintillationszähler bestimmt. Mit jeder Messung wurde ein Blindwert, ein Standard und eine Leerprobe vermessen. Dem Quentsch und der unterschiedlichen Zählausbeute durch

die unterschiedlichen Proben- und Cocktailvolumina wurde durch Anwendung verschiedener Zählprogramme Rechnung getragen.

**Tab. 3.5-1 Parameter der Zählprogramme**

<i>Programm</i>	<i>Zyklen</i>	<i>Zählungen</i>	<i>Zähldauer</i>	<i>ES</i>	<i>Std.</i>	<i>BG</i>
Schnellmessung	1	1	1 min	count	1	0
15ml UXR	1	2	10 min	count	1	0
1ml Probe/15ml UXR	1	2	10 min	count	1	1
5ml Probe/15ml UXR	1	3	10 min	count	1	5
Carbosorb/Permafluor	1	2	10 min	10 sec	1	0

*ES = Einstrahlung, Std. = Standard, BG = Background.*

### **3.6 Analytik der PCDD/F**

Die Analytik der PCDD/F, erfolgte in einem kombinierten Clean-up. Zur Bestimmung der chlororganischen Verbindungen wurde die Isotopenverdünnungsmethode in Verbindung mit der GC-MS-Technik angewandt. Die eindeutige Identifizierung und Quantifizierung der PCDD/F erfolgte mit der hochauflösenden Massenspektroskopie (HRMS) in Kombination mit hochauflösender Gaschromatographie (HRGC).

#### **3.6.1 Polychlorierte Dibenzo-p-dioxine und Dibenzofurane**

Die Bestimmung von PCDD/F-Gehalten in einer komplexen Matrix wie organischem Gewebe erfordert eine aufwendige Analytik. Dies gilt insbesondere, wenn verschiedene Gewebearten auf zum Teil geringfügige Veränderungen der PCDD/F-Konzentrationen und PCDD/F-Pattern zu untersuchen sind. Es wurden deshalb erhöhte Anforderungen an die Probenvorbereitung, den flüssigkeitschromatographischen Clean-up und die isomerenspezifische Identifizierung und Quantifizierung der PCDD/F gestellt.

##### **3.6.1.1 Vorbereitung der Proben**

Alle Proben wurden bis zur Weiterverwendung in Gefrierbeuteln bei  $-40^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Lagerzeit bis zur Aufarbeitung betrug mehrere Wochen.

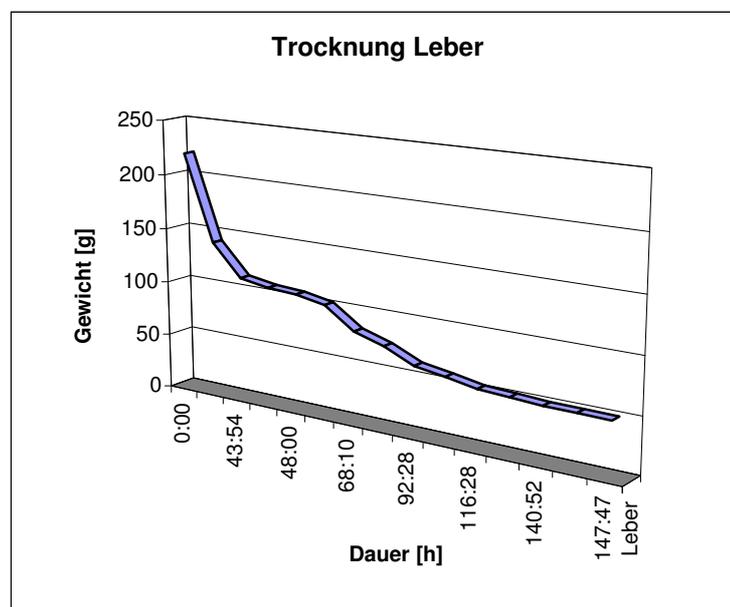
Alle Organproben wurden erst mechanisch vorzerkleinert. Dazu mussten sie für einen kurzen Zeitraum (über Nacht im Kühlschrank bei  $+4^{\circ}\text{C}$ ) aufgetaut, und anschließend wieder eingefroren werden, um später gefriergetrocknet zu werden. Die Proben wurden dazu direkt gefroren in Petrischalen in den

Eiskondensatorraum der Gefriertrocknung gebracht. Die Haupt- und Nach-trocknung erfolgte auf beheizten Stellflächen. Das verwendete Trocknungsprogramm ist in Tab. 3.6-1 dargestellt.

**Tab. 3.6-1: Trocknungsprogramm für die Gefriertrocknung**

Abschnitt	01	02	03	04	05	06	07	08
Phase	Vorbereitung		Haupttrocknung				Nachtrocknung	
Temp. (°C)	- 20	- 20	- 20	- 20	-20	20	20	30
Vakuum (mbar)	-	-	1.030	1.030	1.030	1.030	0.035	0.035
Dauer (h.min)	-	0.15	0.01	2.00	Var.	2.00	0.01	1.30

Aufgrund des hohen Wassergehalts und der großen Probenmengen dauerte der Vorgang bis zu einer Woche. Währenddessen wurden alle 6-8h die Trocknung unterbrochen, und zur Bestimmung des Trocknungsgrades der Gewichtsverlust der Probe an einer externen Waage gemessen. Schematisch ist hier der Verlauf des Vorganges für eine Leberprobe dargestellt, die auch wegen ihres hohen Gewichtes am längsten zur Trocknung benötigte:



**Abb. 3.6-1: Schematische Verlauf der Trocknung von Leber**

Trotz der langen Dauer konnte aber keine 100% Wasserfreiheit erreicht werden. Dazu war die Oberfläche trotz Vorzerkleinerung zu gering und die

Schichtdicke in der Petrischale aufgrund der Probenmenge mit bis zu 1 cm zu hoch. Die Gewichtsreduktion bewegte sich aber im zufriedenstellenden Bereich von ca.75-90% des zu erwartenden Wassergehalts.

**Tab. 3.6-2 Trocknungsergebnisse**

Organe	Minipig A			Minipig B		
	(g)	Trocken- Masse (g)	Reduktion (%)	(g)	Trocken- Masse (g)	Reduktion (%)
Großhirn	52,8	12,6	76,2	50,5	15,3	69,7
Kleinhirn	16,5	4,2	74,3	16,3	4,1	75,1
Leber	220	50,2	77,2	235	57,3	75,6
Niere	93,8	19,8	78,9	92,5	24,6	73,4
Galle	44,5	6,7	85	45,4	8,4	81,4
Bauchspeicheldrüse	39	12,4	68,1	35,9	11,4	68,2
Herz	83,5	20,5	75,5	94,7	26,6	71,9
Lunge (Teil)	54,3	21,3	60,7	30,5	9,1	70,3
Dickdarm (Teil)	75	13,7	81,8	49,5	11,3	77,1
Milz	35,5	10,9	69,4	41,8	12,0	71,3
Hoden	41,1	11,8	71,2	39,3	11,1	71,8
Fettgewebe	11,7	8,7	25,5	24,7	19,9	19,5
Muskelgewebe	94,5	24,6	74	87	22,4	74,3
Dünndarm	26,2	6,6	75	32,8	9,5	71

Auffallend hierbei ist nur das Resultat des Fettgewebes, dessen niedrigeres Ergebnis auf den von Natur aus geringeren Wassergehalt von höchstens 30% zurückzuführen ist und somit auch eine Reduktion von 65-85% darstellt.

Alle im folgenden angegebenen Analysenwerte beziehen sich auf diese durch die Gefriertrocknung erhaltenen Trockenmassen.

Zur Homogenisierung wurden die gefriergetrockneten Organproben in einem Dewarbehälter mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend in einer mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Schreddermühle (Firma Retsch) gemahlen. Die Mühle wurde dazu mit flüssigem Stickstoff befüllt und bis zur

vollständigen Verdampfung des Stickstoffs gewartet. Sonst hätte der erhöhte Gasdruck beim Betrieb der Mühle zu einem Verlust des im gemahlene Zustand staubfeinen Probenmaterials geführt. Die Aufbewahrung der getrockneten und homogenisierten Proben bis zur Extraktion erfolgte in 250 ml Braunglasbehältern in der Kühltruhe bei  $-40^{\circ}\text{C}$ .

### **3.6.1.2 Soxhlet-Extraktion**

Zur Extraktion wurden je nach erwartetem Belastungsgrad ca. 5 g der getrockneten und homogenisierten Probe in eine Filterhülse 33 x 120 mm (Fa. Schleicher & Schuell) eingewogen, die Hülse mit Watte (50% Baumwolle, 50 % Zellwolle, Fa. Amicus) verschlossen und für 24 h mit 300 ml Toluol (zur Rückstandsanalyse, Promochem) als Lösungsmittel soxhletiert. Zur Verbesserung der Wärmeführung wurde der Soxhletextraktor mit Aluminiumfolie umwickelt. Um Siedeverzüge zu vermeiden, wurden Teflon-Siedesteinchen (Chemware®, Fa. Norton) zugegeben. Die Zykluszeit betrug 9 bis 10 Minuten.

Der Gehalt und die Ausbeute der Extraktion wurde nach Abkühlen der Kolben mittels Szintillationszählung überprüft. Dazu wurden jeweils 5ml des Extrakts direkt und weitere 5 ml nach dreimaligen Ausschütteln mit 5ml einer 2N-NaOH-Lösung zu 10ml des Szintillationscocktails gegeben und anschließend vermessen. Zur Kontrolle wurde die NaOH-Phase ebenfalls analysiert.

### 3.6.1.3 Clean-up

Der Rohextrakt enthält eine Vielzahl von Verunreinigungen, die eine

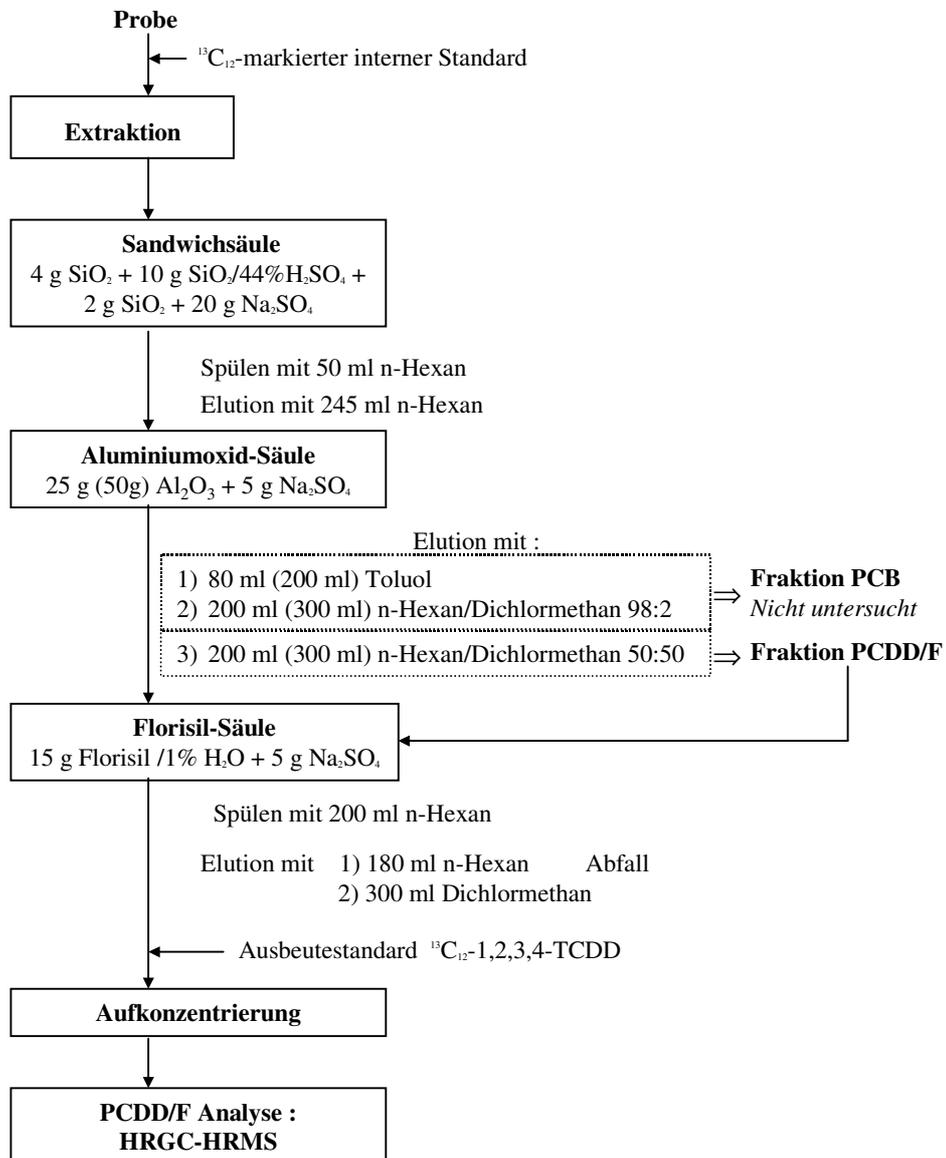


Abb. 3.6-2: Schematische Darstellung der Probenaufbereitung für die PCDD/F-Analytik

Identifizierung und Quantifizierung der PCDD/F stören. Zur Abtrennung dieser, häufig in wesentlich höheren Konzentrationen als die PCDD/F auftretenden Störkomponenten, wurden mehrere flüssigkeitschromatographische Reinigungsschritte durchgeführt (Abb. 3.6-2). Die verwendeten Aufarbeitungsschritte sind erprobten und anerkannten Clean-up-Verfahren der Literatur entnommen (Hagenmaier et al., 1987), (VDI-Richtlinie 3499, 1992), (Munder et al., 1987) und (Thielen & Olson, 1988) sowie laborintern validiert.

#### Chromatographie an sauerem Kieselgel (Sandwich-Säule)

Der nächste chromatographische Reinigungsschritt erfolgte über eine Sandwichsäule (20 x 250 mm). Sie wurde in n-Hexan von unten nach oben mit 4 g aktivem Kieselgel, 10 g Kieselgel mit 44% Schwefelsäure (95-97%, z.A., Fa. Merck) imprägniert, 2 g aktivem Kieselgel und 5 g Natriumsulfat gefüllt und mit 50 ml n-Hexan gespült. Der eingeeengte Rohextrakt wurde aufgetragen und mit 250 ml n-Hexan eluiert. Das Eluat wurde bei einer Badtemperatur von 60°C und einem Druck von 550 mbar auf 3 ml eingeeengt. In der Sandwichsäule werden organische Verbindungen wie z.B. PAK durch die Reaktion mit der Schwefelsäure oxidiert bzw. sulfoniert und am Kieselgel adsorbiert.

#### Chromatographie an Aluminiumoxid (Alox-Säule)

Zur Herstellung der Aluminiumoxid-Säule wurden 25 g Aluminiumoxid (basisch, Super 1, für die Dioxin-Analyse, Fa. ICN Biomedicals) mit Hexan in eine Säule (20 x 250 mm) eingeschlämmt und mit 10 g Natriumsulfat überschichtet. Die Säule wurde mit 100 ml n-Hexan gespült. Nach dem Aufbringen des vorgereinigten Extrakts wurde mit A) 80 ml Toluol und B) 200 ml n-Hexan/Dichlormethan (98/2 v/v) eluiert. Diese Eluate wurden gemeinsam aufgefangen und für eine eventuelle PCB-Analytik aufbewahrt. Sie enthalten u.a. chlorierte monocyclische Aromaten und die PCB. Schließlich wurde mit C) 200 ml n-Hexan/Dichlormethan (50/50 v/v) eluiert. Die letzte Fraktion enthält die PCDD/F und wird bei einer Badtemperatur von 60°C und einem Druck von 1000 - 550 mbar auf 3 ml eingeeengt. Alle verwendeten

Lösungsmittel der Qualität „zur Rückstandsanalyse“ wurden von der Fa. Promochem bezogen.

#### Chromatographie an Florisil® (Florisil-Säule)

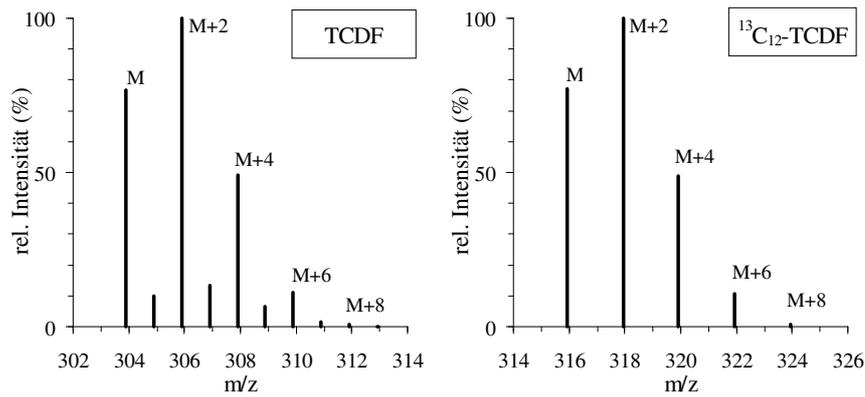
Zur abschließenden Reinigung wurden 15 g Florisil® (PR, 60-100 mesh, Fa. Promochem), desaktiviert mit 1% H<sub>2</sub>O, mit n-Hexan in eine Säule (20 x 250 mm) eingeschlämmt und mit 5 g Natriumsulfat überschichtet. Die Florisilsäule wurde zunächst mit 200 ml n-Hexan vorgereinigt. Nach dem Auftragen des eingeeengten Eluats der Aloxssäule wurde nacheinander mit A) 180 ml n-Hexan und B) 300 ml Dichlormethan eluiert. Die erste Fraktion wurde verworfen. Die zweite Fraktion, die die PCDD/F enthält, wurde bei einer Badtemperatur von 60°C und einem Druck von 980 mbar auf ca. 2 ml abrotiert.

#### Überführen der Probe in Meßvial

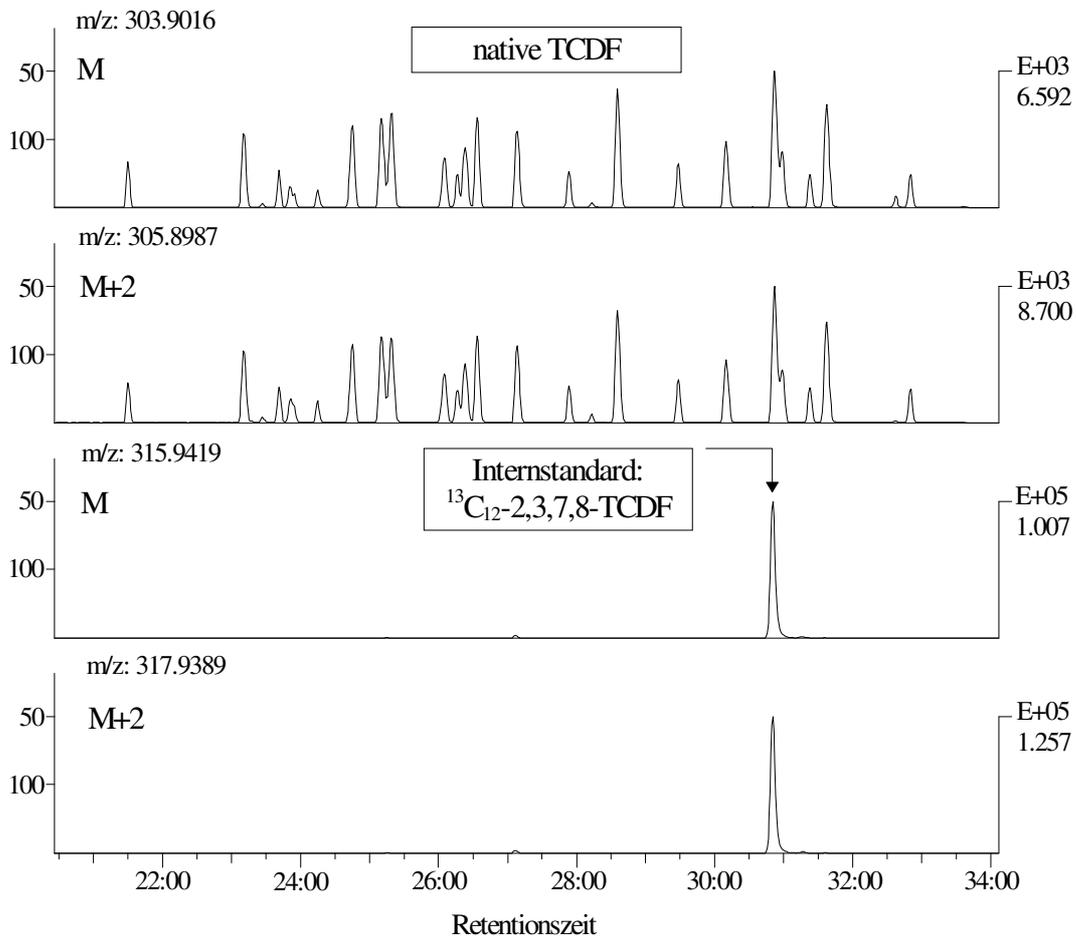
Die eingeeengte Dichlormethan-Fraktion der Florisil-Säule wurde schließlich in ein Braunglasprobenfläschchen mit Mikro-Insert, in dem 10 µl Ausbeutestandard vorgelegt waren, überführt. An einer Stickstoffabblasapparatur (Fa. Labortechnik Barkey) wurde bei einer Temperatur von 45°C auf ca. 10 µl Endvolumen eingeeengt und das Probenfläschchen mit einer Septumkappe verschlossen.

### **3.6.1.4 Nachweis und Quantifizierung der PCDD/F mit GC/MS**

Die Identifizierung und Quantifizierung der PCDD/F erfolgte durch hochauflösende Gaschromatographie und hochauflösende Massenspektrometrie (HRGC-HRMS). Zur Empfindlichkeitssteigerung wurden nur einzelne Massenspuren detektiert (MID-Modus), d.h. für jede Isomerengruppe der nativen und der markierten PCDD/F wurden jeweils die einzelnen Massen des Molekülion-Isotopenclusters vermessen (Abb. 3.6-3 und Abb. 3.6-4).

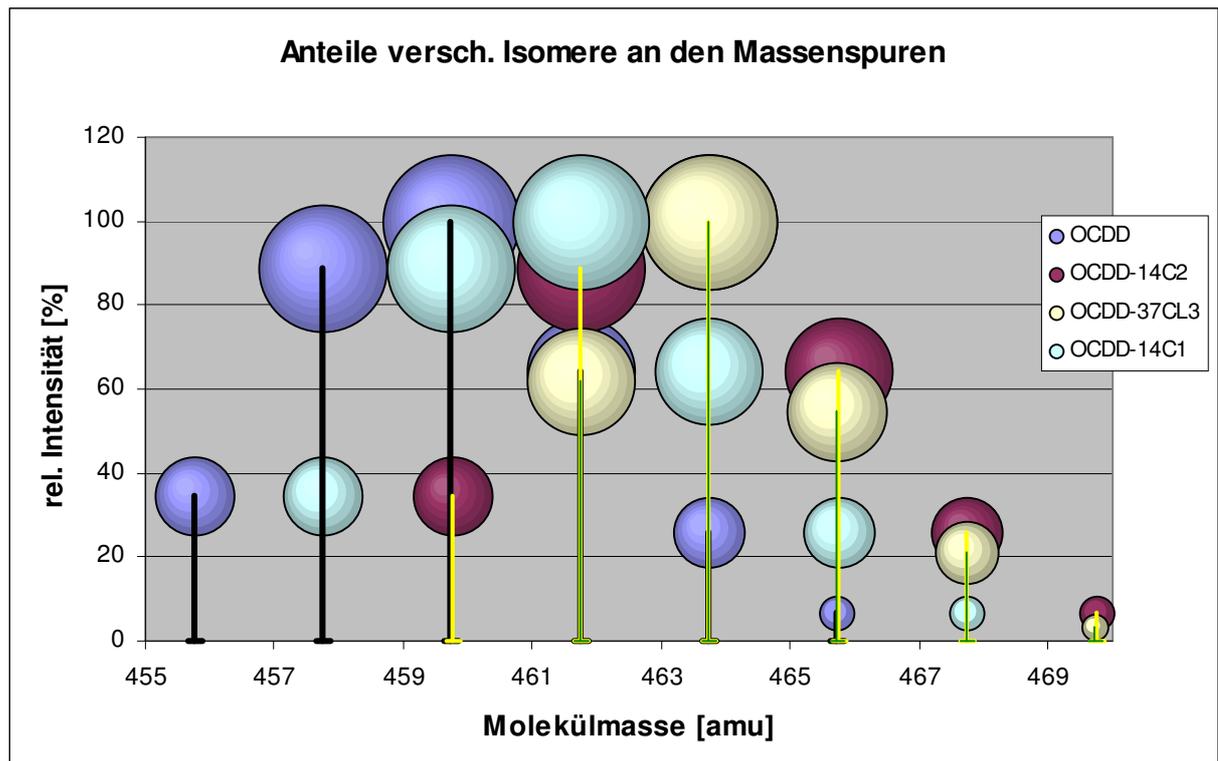


**Abb. 3.6-3: Isotopencluster der Molekülonen  $M^{+\bullet}$  von TCDF und  $^{13}C_{12}$ -TCDF. Bei TCDF sind neben den Chlor-Isotopenpeaks zusätzlich  $^{13}C$ -Isotopenpeaks zu erkennen.**



**Abb. 3.6-4: Identifizierung und Quantifizierung nach der Isotopenverdünnungsmethode am Beispiel der TCDF. M- und M+2-Massenspuren der nativen PCDF und des  $^{13}C_{12}$ -Standards.**

Zur Quantifizierung wurden jedoch nur die beiden Massenspuren mit der schwächsten Intensität herangezogen. Der Grund dafür ist in Abb. 3.6-5 zu erkennen. Dort sind die Isotopenmuster einiger unter den Versuchsbedingungen möglichen Verbindungen dargestellt.



**Abb. 3.6-5 Überlagerung der verschiedenen Isotopenmuster**

Weil der Massenunterschieds zwischen  $^{12}\text{C}$  und  $^{14}\text{C}$  und zwischen  $^{35}\text{Cl}$  und  $^{37}\text{Cl}$  jeweils zwei beträgt, also identisch ist, überlagern sich die Isotopencluster der verschiedenen Isomere und erschweren die Quantifizierung. Zwar ist das Signal bei M+2 und M+4 am stärksten und damit am besten zu detektieren, aber andererseits sind die Überlagerungen dort auch am größten. Darum wurden die Molekülionen M+6 und M+8 gewählt, deren Intensität nur 64 und 26 Prozent beträgt. Dafür ist der Anteil z.B. an nativen OCDD mit 7% noch geringer. (Siehe auch 3.2)

Geräteparameter

Zur isomerenspezifischen Detektion der PCDD/F wurde eine polare Kapillarsäule RT<sub>x</sub>-2330 verwendet (Tab. 3.6-3). Die Eigenschaften dieser Säule, deren stationäre Phase aus Nitril-Gruppen besteht, verändern sich erfahrungsgemäß mit der Zeit. So werden bei einer neuen Kapillarsäule höherchlorierte PCDD/F diskriminiert, wobei besonders OCDF und 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF, weniger die übrigen HpCDF und OCDD betroffen sind. Mit zunehmendem Alter der Säule verschwindet dieser Effekt. Da in dieser Arbeit der Hauptaugenmerk auf OCDD liegt, kann dieser Effekt toleriert werden.

**Tab. 3.6-3 Geräteparameter**

<i>PCDD/F-Analytik</i>			
Geräte	HRGC Hewlett Packard 6890 (jetzt: Agilent)	HRMS Finnigan MAT 95S	
Kapillarsäule	Restek Rtx-2330 Länge: 60 m Innendurchmesser: 0,25 mm Filmdicke: 0,1 µm	Ionisationsmode	EI
Trägergas	Helium, 1,2ml/min constant flow	Ionisationsenergie	70 eV
Injektion	Gerstel KAS 4 splitlos 120°C, 12°C/sec 280 °C	Quellentemperatur	260 °C
Temperaturprogramm	90 °C; 1,5 min, 30 °C/min 200 °C, 2 °C/min 248 °C; 20 °C/min 260 °C, 25 min	Interfacetemperatur	260 °C
		Auflösung	10000

Die polare Säule RT<sub>x</sub>-2330 reagiert außerdem empfindlich auf Überladen. Bei Proben mit hoher OCDD-Belastung muss deshalb achtgegeben und die Probe gegebenenfalls verdünnt werden.

Auswertung

Ein PCDD/F-Kongener galt als nachgewiesen und bestimmbar, wenn

1. das Signal/Rauschverhältnis der intensivsten Massenspur mindestens 3 betrug,
2. das Intensitätsverhältnis der beiden detektierten Molekülionenmassen weniger als  $\pm 10\%$  vom theoretischen Isotopenverhältnis abwich, und
3. die Retentionszeit mit der des internen Standards übereinstimmte.

Zur Quantifizierung wurde für jede Isomerengruppe die jeweils am wenigsten überlagerte Masse des Molekülion-Isotopenclusters verwendet ( Abb. 3.6-5). Die Bestimmung der einzelnen PCDD/F-Gehalte  $c_i$  erfolgte mit den korrespondierenden Massenspuren von nativen und  $^{13}\text{C}$ -markierten PCDD/F (Abb. 3.6-4) über folgende Gleichung:

$$c_i = \frac{(F_i - F_k) \cdot c_{js} \cdot V_{js}}{F_{js} \cdot EW} \quad \text{Gleichung 1}$$

- wobei
- $F_i$ : Peakhöhe oder Peakfläche des  $i$ ten PCDD/F
  - $F_k$ : Peakhöhe oder Peakfläche des  $k$ ten überlagernden PCDD/F
  - $c_{js}$ : Konzentration des  $j$ ten, vor der Analyse zugegebenen, PCDD/F-Standards
  - $V_{js}$ : Menge des  $j$ ten, vor der Analyse zugegebenen, PCDD/F-Standards
  - $F_{js}$ : Peakhöhe oder Peakfläche des  $j$ ten vor der Analyse zugegebenen PCDD/F-Standards
  - $EW$ : Einwaage der Probe

Für PCDD/F-Kongeneren ohne Internstandard wird ein  $^{13}\text{C}$ -markiertes Homologes zur Quantifizierung verwendet, wobei vereinfacht ein identischer Response angenommen wird.

### 3.7 Qualitätssicherung bei der GC-MS-Analyse

Um die Zuverlässigkeit der entwickelten analytischen Methoden zu überprüfen, wurden detaillierte Untersuchungen zur Qualitätssicherung durchgeführt. Neben der kontinuierlichen Bestimmung von Wiederfindungsraten und Nachweisgrenzen wurden die Blindwerte regelmäßig kontrolliert. Aussagen über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden durch Mehrfachbestimmung in gleichen Probenserien erhalten. Durch wiederholte Extraktion einer Probe wurde zusätzlich die Effektivität der Extraktionsmethode bestimmt.

#### 3.7.1 Wiederfindung

Unter der Wiederfindungsrate wird der prozentuale Anteil der zu einer Probe dotierten Substanzmenge verstanden, der nach Extraktion und Probenaufarbeitung gefunden wird. Sie gibt Auskunft über Verluste bei der Probenaufarbeitung und die Effektivität der Probenextraktion (siehe auch 3.4.5).

**Tab. 3.7-1: Wiederfindungsraten der internen Standards bei der PCDD/F-Analyse**

<i>Probe</i>	<i>Wiederfindung (%)</i>	<i>Stdabw. (%)</i>
315-0703	92	8
315-1804	83	13
315-0106	83	13
690-0703	89	13
690-1804	91	9
690-0106	89	11
Leber A	88	11
Lunge A	84	15
Bauchspeicheldrüse A	86	14
Milz B	84	13
Leber B	83	16

In Tab. 3.7-1 sind beispielhaft die Wiederfindungsraten der eingesetzten internen  $^{13}\text{C}$ -markierten PCDD/F-Standards im Vergleich zum Ausbeutestandard bei 11 Proben dargestellt. Insgesamt lagen alle Wiederfindungsraten über 80%.

### 3.7.2 Nachweisgrenzen

Für die Bestimmung der GC/MS-Nachweisgrenzen wurde ein Signal/Rauschverhältnis von mindestens 3/1 zugrundegelegt (3.6.1.4). Die absoluten Nachweisgrenzen für PCDD/F lagen beim verwendeten GC/MS-System zwischen 30 fg für 1,2,3,4-TCDD und 1,8 pg für OCDF. Tab. 3.7-2 zeigt die mittleren Nachweisgrenzen bei einer Probeneinwaage von ca. 5 g. Die Nachweisgrenzen variierten zwischen 30 und 650 pg/kg TM. Ausnahmen stellten OCDD und OCDF mit 1,3 bzw. 3,42 ng/kg TM dar. Bezogen auf die Toxizitätsäquivalente ergibt sich somit eine mittlere Nachweisgrenze von 0,36 ng I-TEQ/kg TM.

**Tab. 3.7-2: Nachweisgrenzen bei der PCDD/F-Analyse (Mittelwerte, Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte aus 10 Bestimmungen). Probeneinwaage ca. 5 g.**

PCDD/F-Kongener	Mittelwert (ng/kg TM)	Stdabw. (ng/kg TM)	Min. (ng/kg TM)	Max. (ng/kg TM)
2,3,7,8-TCDD	0,03	0,01	0,01	0,05
1,2,3,7,8-PCDD	0,12	0,03	0,06	0,15
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,35	0,18	0,17	0,73
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,32	0,16	0,17	0,66
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,32	0,22	0,14	0,86
OCDD	1,31	1,76	0,59	5,30
2,3,7,8-TCDF	0,08	0,04	0,02	0,15
1,2,3,7,8-PCDF	0,10	0,04	0,03	0,16
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,24	0,09	0,11	0,37
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,23	0,08	0,11	0,34
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,27	0,08	0,14	0,40
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,19	0,06	0,10	0,27
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,25	0,08	0,13	0,39
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,65	0,28	0,25	1,24
OCDF	3,42	4,78	0,37	9,55
I-TEQ	0,36	0,14	0,17	0,62

### 3.7.3 Blindwerte

Unter einem Blindwert versteht man diejenige Menge eines zu bestimmenden Stoffes, die im Laufe des gesamten Aufarbeitungsganges in die Probe eingeschleppt wird. Um solche Kontaminationen zu vermeiden, wurden für die Extraktion und den Clean-up nur Lösungsmittel der Qualität „zur Rückstandsanalyse“ verwendet. Alle Glasgeräte, die mit der Probe in Berührung kamen, wurden mit 1) Hexan (techn.), 2) Lösungsmittelgemisch aus Toluol, Aceton, Hexan (techn.) und 3) Aceton (p.A.) gespült. Anschließend wurden die Glasgeräte in einer Laborspülmaschine gereinigt und für 5 Stunden in einem Trockenschrank (Baureihe 6100, Heraeus) bei 400°C ausgeheizt. Die Extraktionshülsen, Watte, Teflon-Siedesteinchen und alle Adsorbentien wurden ohne Vorbehandlung verwendet. Zur quantitativen Erfassung der trotz aller Vorsichtsmaßnahmen eingeschleppten Kontaminationen wurde bei jeder Probenserie eine Blindprobe aus 300ml Toluol analysiert.

Die Analyse einer PCDD/F-Blindwertbestimmung in einer Probenserie lieferte jedoch keine verwertbaren Ergebnisse, da nie das geforderte Signal/Rauschverhältnis von 3:1 erreicht wurde. Insgesamt lagen somit alle Blindwerte unterhalb der Nachweisgrenzen und wurden deshalb bei der Berechnung der PCDD/F-Gehalte nicht berücksichtigt.

### 3.7.4 Mehrfachbestimmung

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Bestimmungsmethode wurden Mehrfachbestimmungen durchgeführt. Dazu wurden die Bodenproben homogenisiert, in drei Aliquote geteilt und unabhängig voneinander innerhalb einer Probenserie extrahiert. Die Untersuchung ergab eine mäßige Übereinstimmung der Aktivitäts-Gehalte bis auf eine Ausnahme (Probe 315-0106, siehe Tab. 3.7-3), die stark herausfiel. Die mittlere relative

Standardabweichung lag bei 13,6%. Ein Grund dafür ist durch den Versuchsaufbau bestimmt (siehe 3.4.2), der keine vollständig identischen Aktivitätsgehalte pro Ansatz garantiert. Demnach könnte es bei Probe 315-0106 zu einer unbemerkten Klumpenbildung durch zu hohe Feuchtigkeit gekommen sein, wodurch eine unverhältnismäßig hohe Menge an markiertem PCP in einer der drei Proben angereichert worden wäre.

**Tab. 3.7-3: Streuung der Radioaktivitätsgehalte bei Dreifachbestimmung**

<i>Probe</i>	<i>Durchschnittliche Aktivität (Bq/g TM)</i>	<i>Rel. Abweichung (%)</i>
315-0703	31517	10,5
315-2103	30843	8,7
315-1804	32965	16,4
315-0205	28363	15,8
315-0106	30459	27,3
690-0703	44157	5,5
690-2103	50273	9,1
690-1804	45381	12,5
690-0205	43222	14,5
690-0106	40420	15,7

### 3.7.5 Vollständigkeit der Extraktion

Um die Vollständigkeit der Extraktion der PCDD/F zu überprüfen, wurde eine Probe für 24h mit Toluol Soxhletiert und nach Entnahme der Probe erneut 24 h mit Toluol nachextrahiert. Die beiden Extrakte wurden zur Kontrolle im Szintillationszähler vermessen. Dabei konnte eine annähernd vollständige Extraktion der Radioaktivität bereits nach 24 h beobachtet werden (Tab. 3.7-4). Damit konnte ausgeschlossen werden, dass Unterschiede im PCDD/F-Gehalt auf eine unvollständige Extraktion von nativen oder markierten PCDD/F zurückzuführen waren.

**Tab. 3.7-4: Verbliebene Radioaktivität nach Soxhletextraktion**

<i>Probe</i>	<i>Erste Extraktion (%)</i>	<i>Zweite Extraktion (%)</i>
315-0703	99,0	1,0
315-2103	100,0	0,0
315-1804	95,7	4,3
315-0205	99,9	0,1
315-0106	97,4	2,6
690-0703	98,5	1,5
690-2103	98,4	1,6
690-1804	94,9	5,1
690-0205	96,9	3,1
690-0106	99,2	0,8
Leber A	98,8	1,2
Lunge A	100,0	0,0
Bauchspeicheldrüse A	100,0	0,0
Herz A	94,5	5,5
Milz A	99,8	0,2
Niere A	100,0	0,0
Leber B	99,9	0,1

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Minipigversuch

#### 4.1.1 Radioaktivität

Zur Untersuchung der Radioaktivität wurden alle Ausscheidungen der Minipigs gesammelt, um einen Überblick über den Verbleib der markierten Substanz zu erhalten. Außerdem zeigt die Menge an Aktivität im Kot und Urin an, wie viel von der Substanz resorbiert oder wieder ausgeschieden wurde.

##### 4.1.1.1 Urin

Von den gesammelten Urinproben wurden je 5 ml im Szintillationszähler vermessen. Dabei ergaben sich folgende Werte:

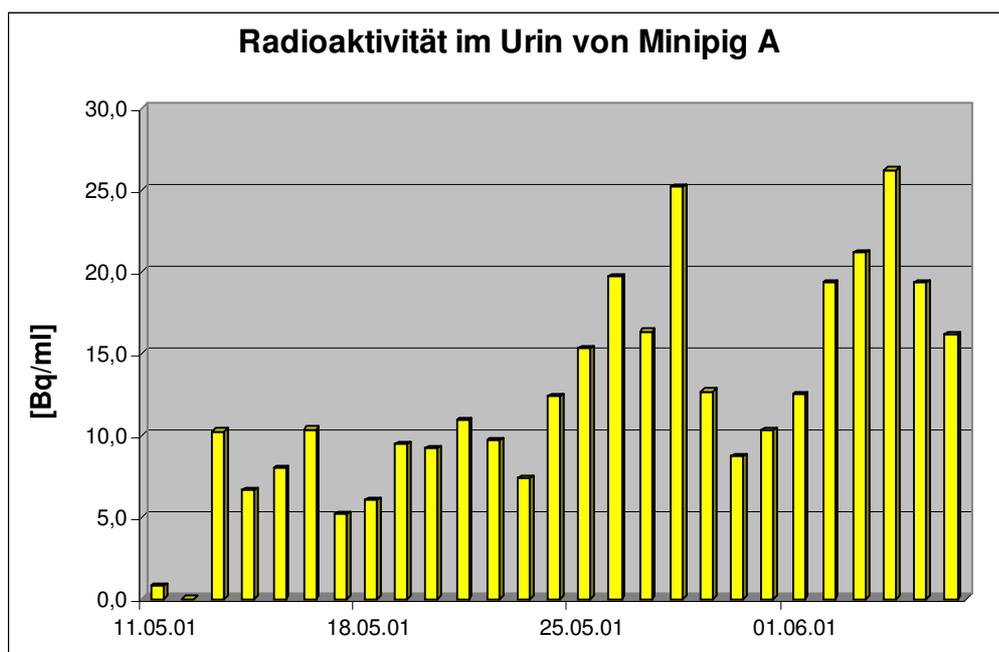
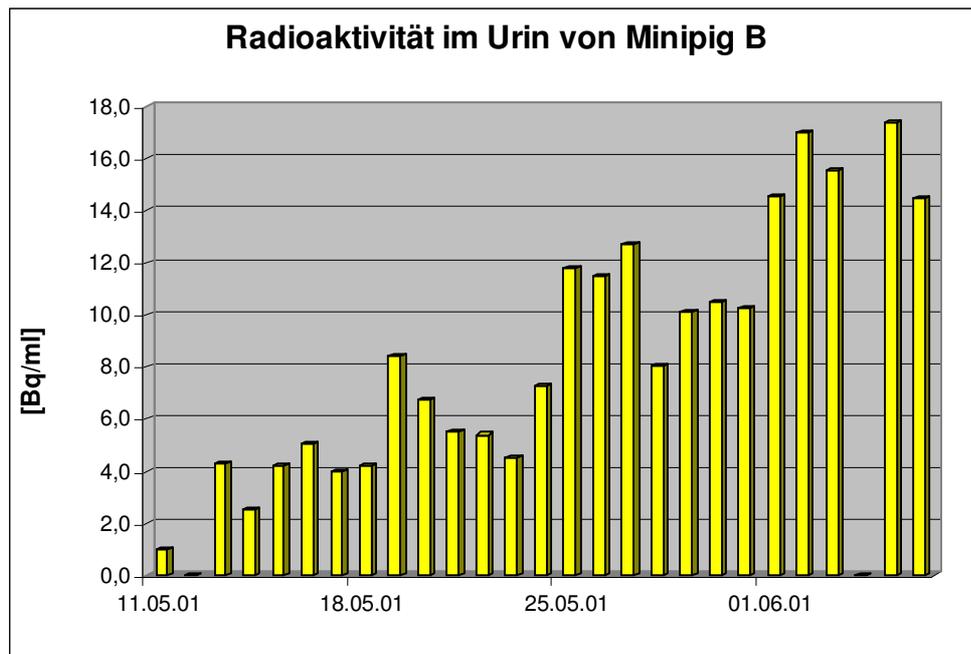


Abb. 4.1-1 Aktivität im Urin von Minipig A pro Milliliter Urin

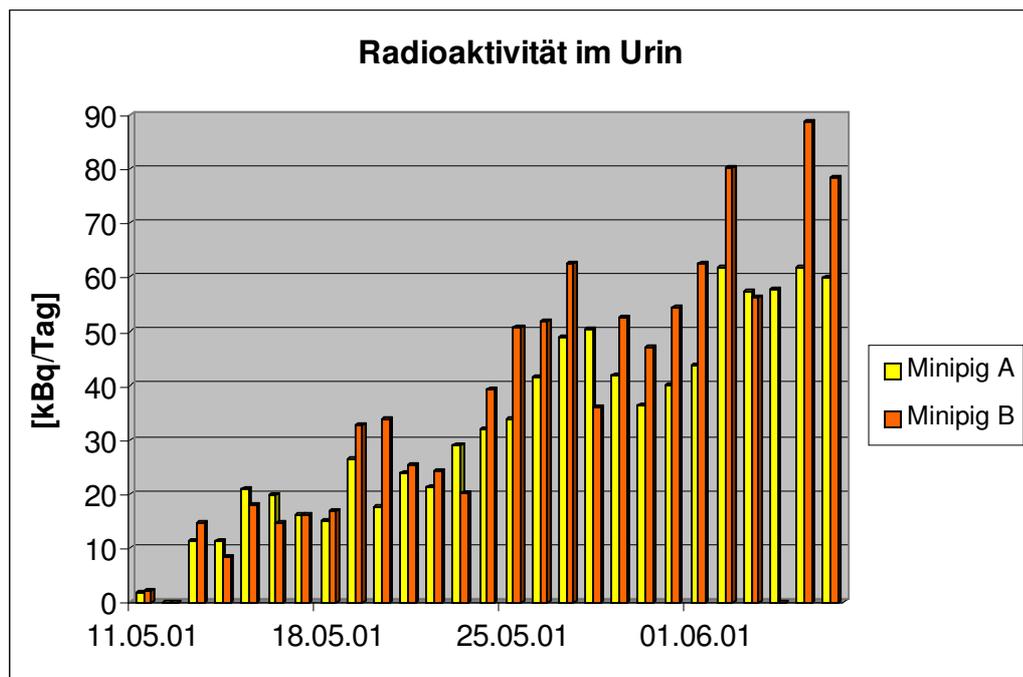


**Abb. 4.1-2 Aktivität im Urin von Minipig B pro Milliliter Urin**

Die Werte für den 12.05. fehlen, da an diesem Tag durch das Spielen der Tiere mit dem Wasserspender die Urinmenge das Fassungsvermögen des Auffangbehälters (10 l) überschritt. Weil sowohl ein Teil der Probe unbrauchbar war und der Urin übermäßig verdünnt war, wurde der Messwert als unbrauchbar eingestuft. Danach wurde wieder auf die Wasserversorgung mit Trögen umgestellt. Ferner fehlt der Wert für Minipig B am 04.06., an dem der Urin durch Teile des Kots kontaminiert und der Messwert dadurch mit einem unbekanntem Fehler verfälscht wurde.

Man erkennt außerdem, dass der Bezug auf Aktivität pro Milliliter mit großen Schwankungen verbunden ist, da die Menge an Urin naturgemäß größeren Schwankungen unterlag. So lässt sich auch der erstaunlich niedrige Messwert am 30.05. bei Minipig A erklären, da hier mit 4,2 l das größte Volumen an Urin gesammelt wurde und demzufolge die Probe am meisten „verdünnt“ war. Auch hier ist sicher eine nicht unerhebliche Menge an Trinkwasser durch Herumplätschern im Trog direkt in den Auffangbehälter gelangt, wodurch sich die erstaunliche Menge an Urin erklären lässt.

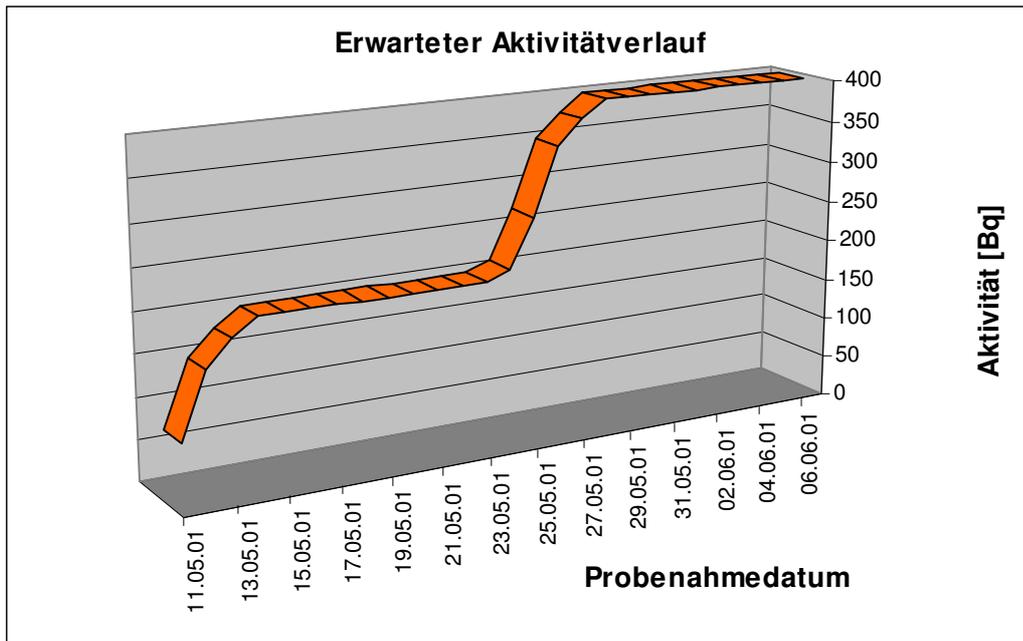
Mehr Aussagekraft besitzt deshalb der Bezug auf die über einen ganzen Tag gesammelte Menge, da hier die Schwankungen besser ausgeglichen werden. Hier ist deutlich der Anstieg der aufgenommenen Menge an Aktivität und ihre Akkumulation zu erkennen. Durch die Verdopplung der Dosis nach zwei Wochen kommt es zu einem weiteren Anstieg ab dem 25.05.



**Abb. 4.1-3 Gesamtaktivität im Urin beider Schweine pro Probenahmetag**

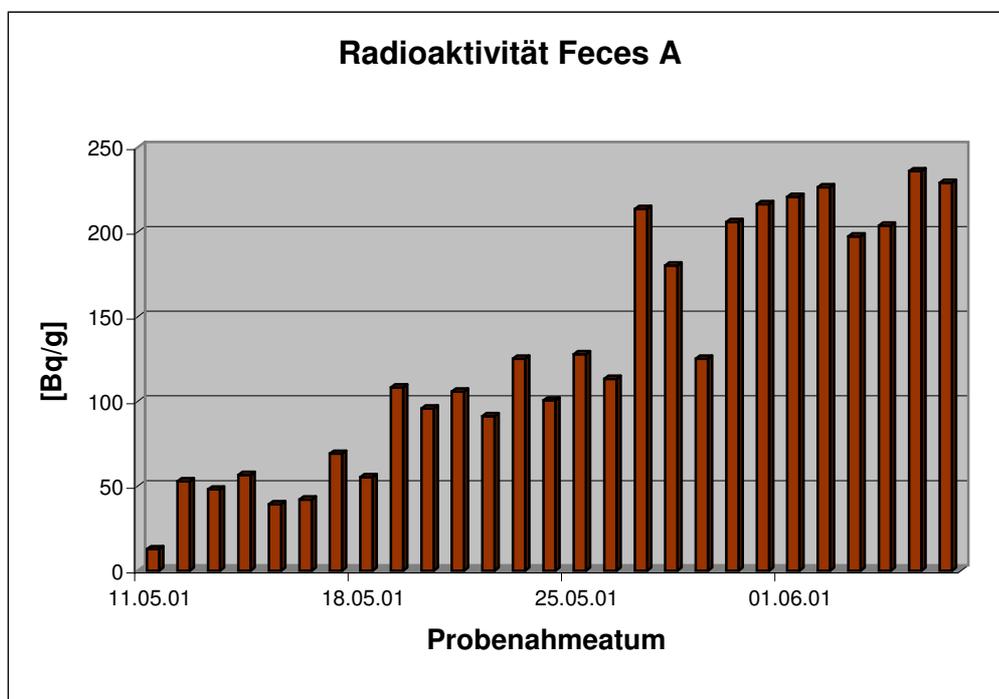
#### 4.1.1.2 Feces

Bei der Vermessung des Kots wurde eine deutlichere Ausbildung zweier Plateaus durch die Verdopplung der Konzentration erwartet (Abb. 4.1-4), da hier der Eintrag direkt proportional der verfütterten Menge an  $^{14}\text{C}$ -PCP ist. Deshalb sollte sich nach einigen Tagen ein „steady state“ einstellen, mit gleicher Aufnahme und gleicher Ausscheidung und/oder Resorption.

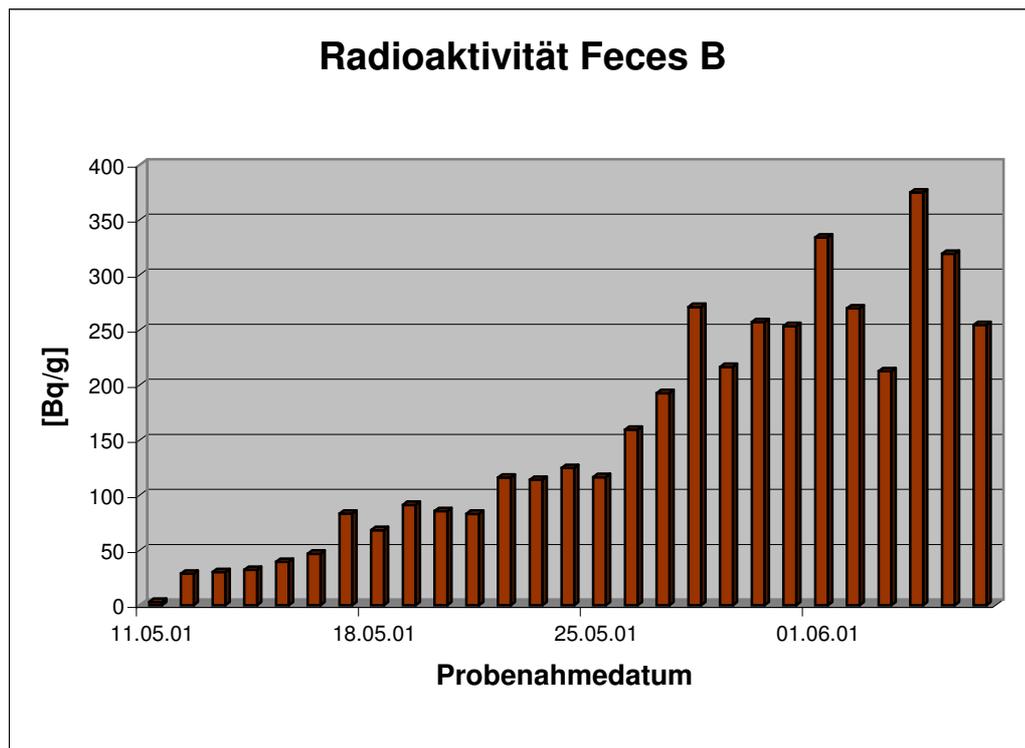


**Abb. 4.1-4 Simulation der Aktivität im Kot eines Minipigs**

Dies lässt sich auch beobachten, auch wenn es hier natürlich durch unterschiedliche Kotmengen zu Schwankungen kommt.



**Abb. 4.1-5 Gemessene Aktivität im Kot von Minipig A**

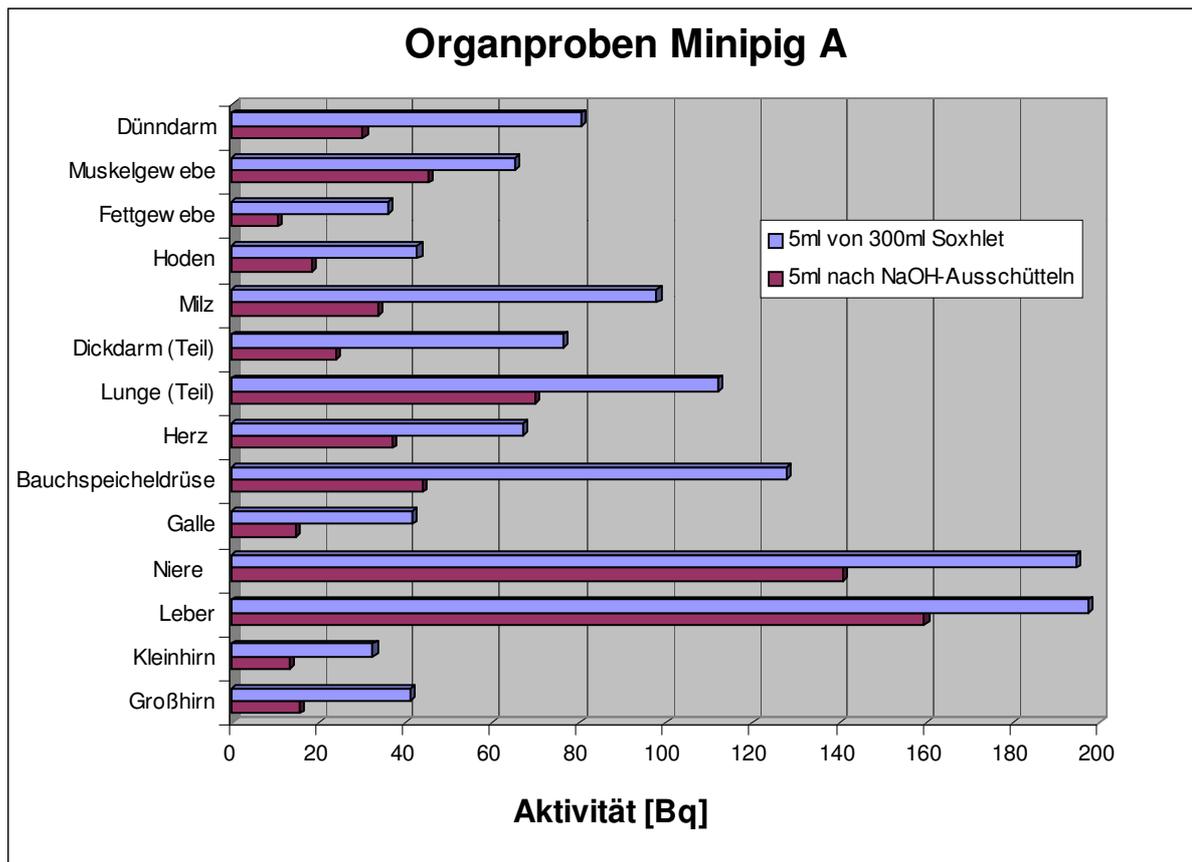


**Abb. 4.1-6 Gemessene Aktivität im Kot von Minipig B**

#### 4.1.1.3 Organe

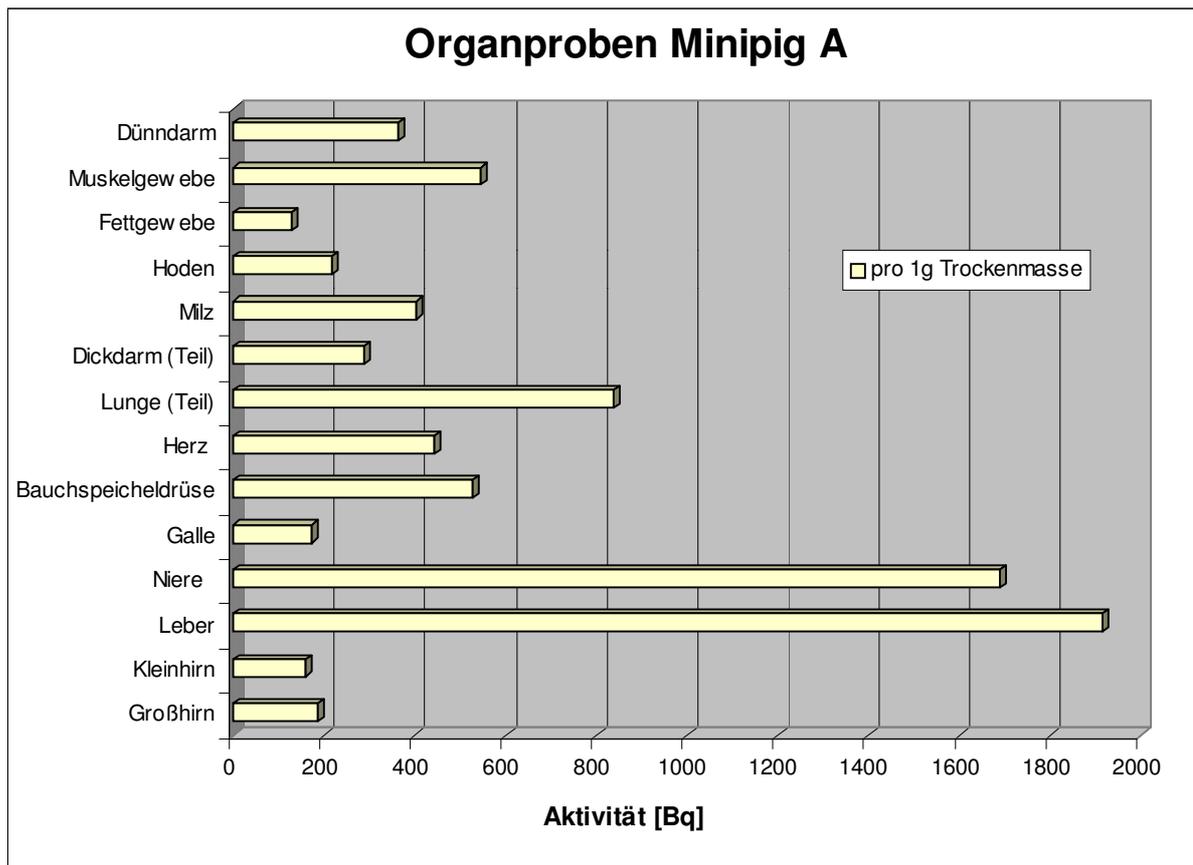
Wesentlich größere Bedeutung kommt aufgrund der Zielsetzung der Arbeit der Aufnahme und Verteilung des PCP und etwaiger Metaboliten auf die einzelnen Organe zu. Wegen der aufwendigen Aufreinigungsschritte vor der eigentlichen PCDD/F-Analytik wurden zuerst die interessanteren Organproben herausgesucht. Diese sollten eine hohe, deutlich messbare Aktivität besitzen, und zudem noch einen hohen Anteil an Radioaktivität in der lipophilen Fraktion. Dies würde eine Metabolisierung der PCP bedeuten, welches besser in der basischen NaOH-Lösung löslich ist. Dadurch wäre eine Kondensation zu OCDD/F, das auch lipophil ist, wahrscheinlicher.

Dies traf vor allem auf Leber und Niere zu, die als Stoffwechselorgane dafür prädestiniert sind, erstaunlicherweise aber an dritter Stelle auch für das Lungengewebe (siehe Abb. 4.1-7).



**Abb. 4.1-7 Vergleich der Aktivität vor und nach Entfernung hydrophiler Komponenten**

Auch nach der Umrechnung der Messwerte bezogen auf die Trockenmasse der Organe blieb es bei dieser Reihenfolge (Abb. 4.1-8). Am stärksten kontaminiert sind Leber und Niere, gefolgt von der Lunge. Allerdings ist anzumerken, dass von Lunge und Darm nur ein Teil des Gewebes untersucht wurde. Außerdem war der Dünndarm und Dickdarm noch mit Futterresten/Kot gefüllt, die auch nicht entfernt werden konnten. Demzufolge liegt die Aktivität mit 250 – 400 Bq/g auch in dem Bereich, der für den ausgeschiedenen Kot kurz vor Ende der Versuchsreihe gemessen wurde. Mit einem größeren Fehler ist der Wert für das Fettgewebe behaftet, da hier die Menge nicht für die normale Einwaage von 5 g im Soxhlet ausreichte. Es wurde bei der Sezierung nur wenig reines Fettgewebe wie das sogenannte Netz gefunden, so dass nur ca. 1 g Probe zur Verfügung stand.

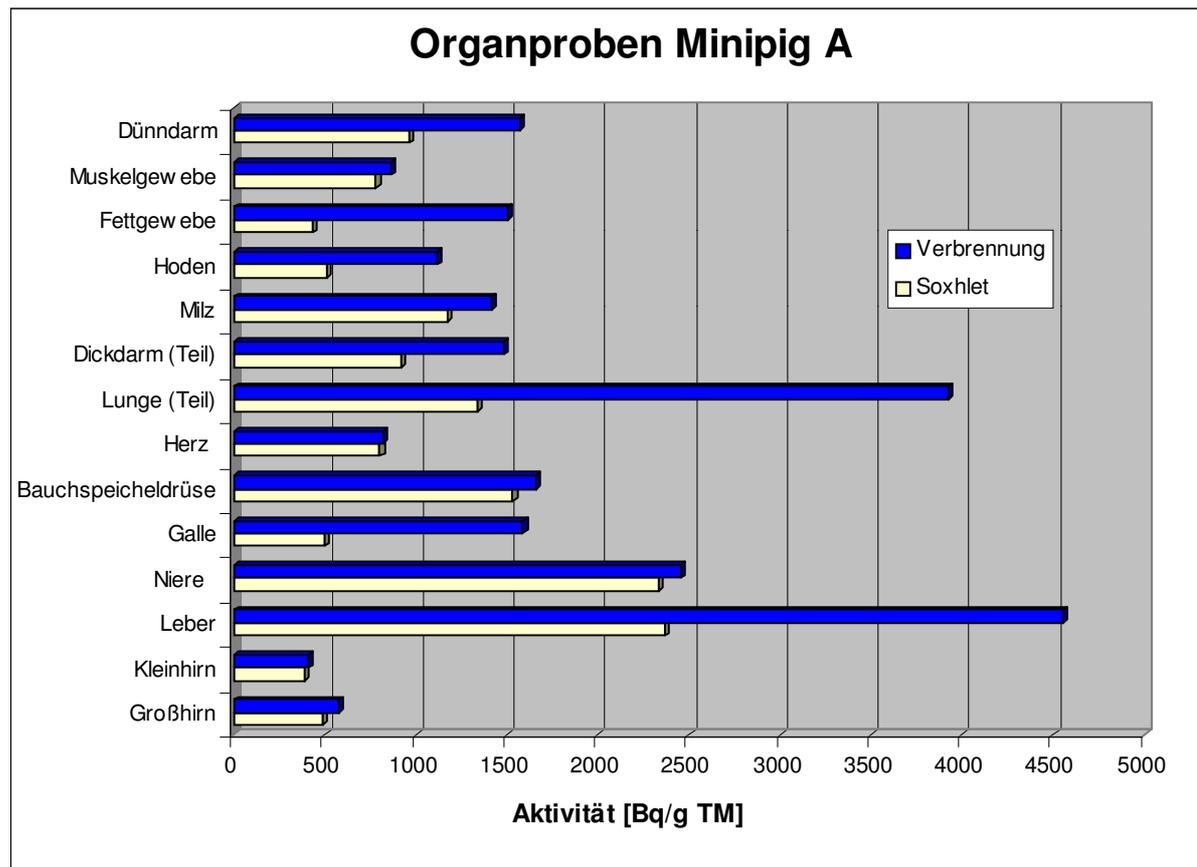


**Abb. 4.1-8 Aktivität der einzelnen Organe von Minipig A**

Erwartungsgemäß waren die Werte für die beiden Hirnproben sehr niedrig. Der Wert für die Gallenblase erscheint dagegen verhältnismäßig niedrig, da dieses Organ einen besonders hohen Flüssigkeitsanteil besitzt, der nach der Trocknung zu einer entsprechend Aufkonzentrierung der Aktivität, die ja auf die Trockenmasse bezogen ist, führen sollte.

Ansonsten stimmen die Werte weitgehend mit den unmodifizierten Ergebnissen aus Abb. 4.1-7 überein.

Interessant ist außerdem ein Vergleich der Ausbeute an Radioaktivität nach Soxhletierung oder direkter Verbrennung der Probe (siehe Abb. 4.1-9). Da mit dem Soxhletverfahren nur mit Toluol extrahierbare Substanzen erfasst werden können, während mit der Verbrennung sämtliche oxidierbaren Verbindungen ermittelt werden, sollten die Werte für die Verbrennung immer über denen des Soxhletverfahrens liegen.



**Abb. 4.1-9 Vergleich der Aktivität nach Soxhletierung oder Verbrennung der Probe**

Dies trifft hier auch uneingeschränkt zu. Allerdings ist die Schwankungsbreite extrem hoch. So wurden für Klein- und Großhirn, aber erstaunlicherweise auch für Niere und Bauchspeicheldrüse sehr ähnliche Werte gefunden, während die Werte für Leber, Galle, Fettgewebe und besonders Lunge sehr weit auseinander liegen. Das deutet auf einen deutlich größeren hydrophilen Anteil an markiertem PCP und möglichen Metaboliten hin. Bei einer Matrix wie Fettgewebe erscheint das widersprüchlich, aber kann durch die kleine Probenmenge und den daraus resultierenden großen Fehler begründet werden.

#### 4.1.1.4 Bilanz der Radioaktivität

---

Zieht man die Bilanz über den Verbleib der verabreichten Radioaktivitätsmenge, so kommt man zu folgendem Ergebnis:

Eingesetzt wurden pro Schwein  $14 \cdot 100 \mu\text{l} + 14 \cdot 200 \mu\text{l}$ , bei einer Aktivität von  $119 \text{ Bq}/\mu\text{l}$  entspricht das einer Menge von insgesamt  $5 \text{ MBq}$ .

Wiedergefunden wurden insgesamt  $4,414 \text{ MBq}$ . Davon fielen auf den Urin von Minipig A  $880804 \text{ Bq}$  und von Minipig B  $986221 \text{ Bq}$ , zusammen  $1,867 \text{ MBq}$ . In den Feces von Minipig A fanden sich  $699800 \text{ Bq}$  und von Minipig B  $835202 \text{ Bq}$ , in der Summe  $1,535 \text{ MBq}$ .

Sämtliche Organproben von Minipig A zusammen ergaben  $524734 \text{ Bq}$ , von Minipig B  $487145 \text{ Bq}$ . Dies stellt allerdings keinen allumfassenden Wert dar, weil erstens vom Muskelgewebe nur eine Probe entnommen wurde und die genaue Gesamtmuskelmasse nicht bekannt ist. Zweitens fehlen Daten für Knochen, Haut und Blut.

In diesen Geweben ist sicher ein Teil des Fehlbetrages enthalten. Es bestehen aber noch andere Möglichkeiten, z.B. die Veratmung eines Teils des markierten Kohlenstoffs, Restkontaminationen an den Metabolismuskäfigen oder Fehler wie die unvollständige Erfassung der exakten Kot- und Urinmenge.

#### **4.1.2 Verbleib der Aktivität während des Clean-Up**

Während der Aufreinigung der Proben wurden vom gesammelten Eluat jeweils  $1 \text{ ml}$  Probe genommen und im Szintillator vermessen. Dies diente zum einen dazu zu vermeiden, unnötig viel Lösungsmittel als radioaktiv kontaminiert entsorgen zu müssen. Außerdem gibt es Aussage darüber, welche Säule am meisten der Aktivität absorbiert, falls genaueres Interesse besteht und dadurch bessere Erkenntnisse zu den primären Metaboliten des PCP erzielt werden können.

**Tab. 4.1-1 Aktivität (in Bq/ml) der Fraktionen nach den versch. Säulen**

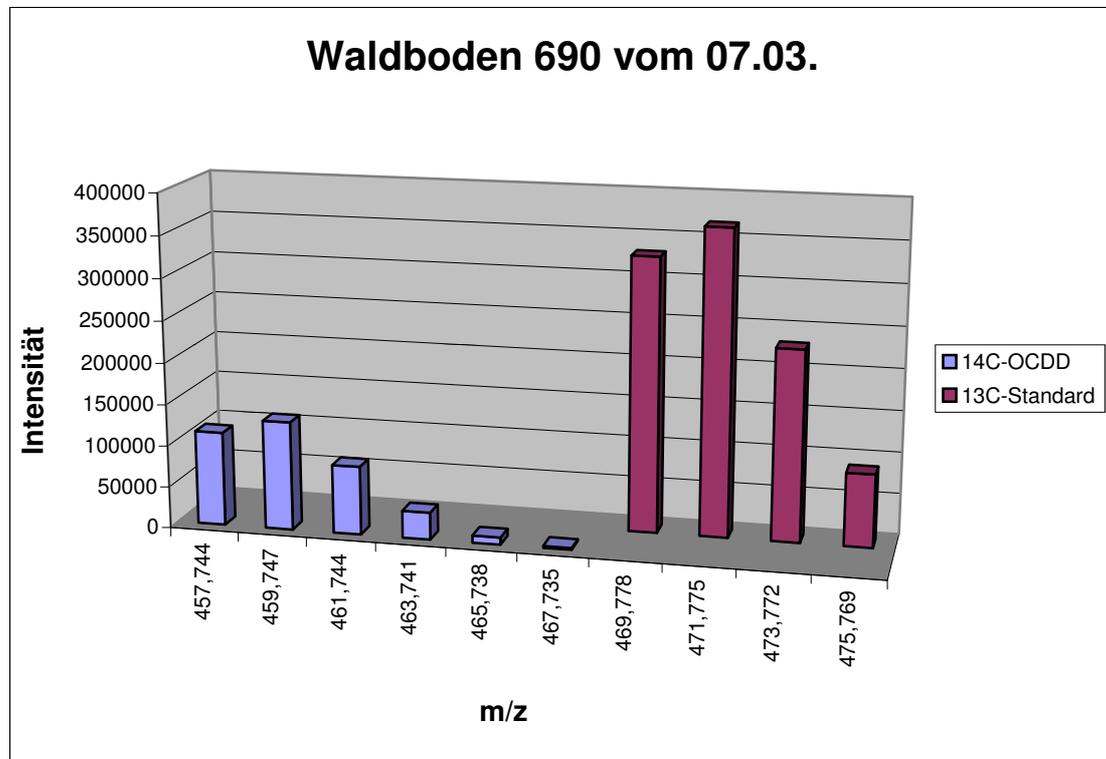
<i>Probe</i>	<i>Sandwichsäule</i>	<i>Aloxssäule</i>	<i>Florisilsäule</i>
Leber A	169	17	3
Niere A	124	12	4
Lunge A	208	8	4
Herz B	155	4	2
Milz B	149	11	3
Leber B	182	9	5

Tab. 4.1-1 zeigt, dass bei allen Organproben bereits der größte Anteil an Radioaktivität auf der Sandwichsäule verbleibt. Nach der Aluminiumoxidsäule bewegen sich die Messwerte bereits nahe der Nachweisgrenze und verändern sich nach der Florisilsäule nicht mehr nennenswert.

#### 4.1.3 PCDD/F-Belastung

Die fertig aufgereinigten und eingeeengten Proben wurden schließlich mittels GC-MS analysiert, um den PCDD/F-Gehalt, insbesondere an OCDD zu bestimmen, da dies das wahrscheinlichste Dioxin-Kondensationsprodukt aus zwei markierten PCP-Molekülen darstellt. Genauso möglich ist natürlich eine Kondensation aus markiertem und unmarkiertem PCP, das ebenso in der Stammlösung enthalten ist. Deshalb werden einfach-markierte OCDD-Moleküle auch erfasst. Genauso treten aber auch native oder etwaige aus unmarkiertem Material neugebildete Dioxinmoleküle auf, deren Anwesenheit leider störend ist (siehe auch 3.5.1.4), da diese mitextrahiert wurden und sich nur um eine oder zwei Massenzahlen unterscheiden.

In Abb. 4.1-10 bis Abb. 4.1-14 sind die Ergebnisse einiger Organproben dargestellt. In allen Analysen waren die detektierten Werte an OCDD deutlich niedriger als die dotierte Menge an  $^{13}\text{C}$ -Standard.



**Abb. 4.1-10 Analyse der Leber von Minipig A**

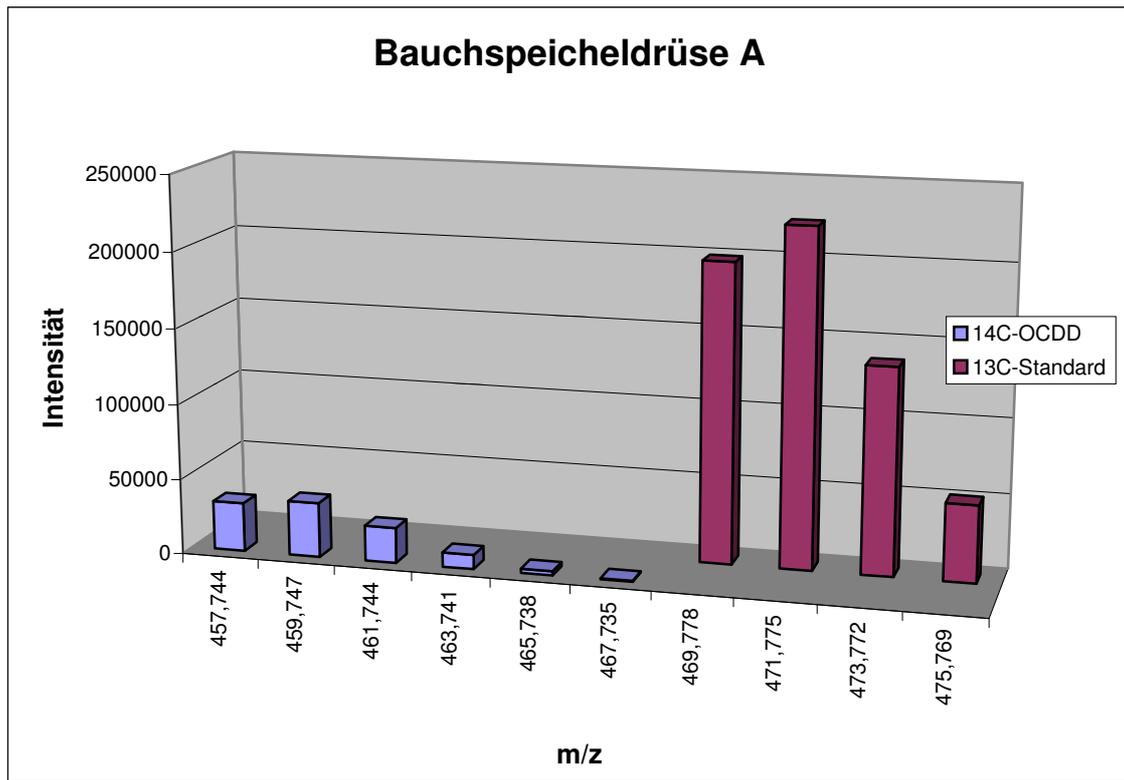


Abb. 4.1-11 Analyse der Bauchspeicheldrüse von Minipig A

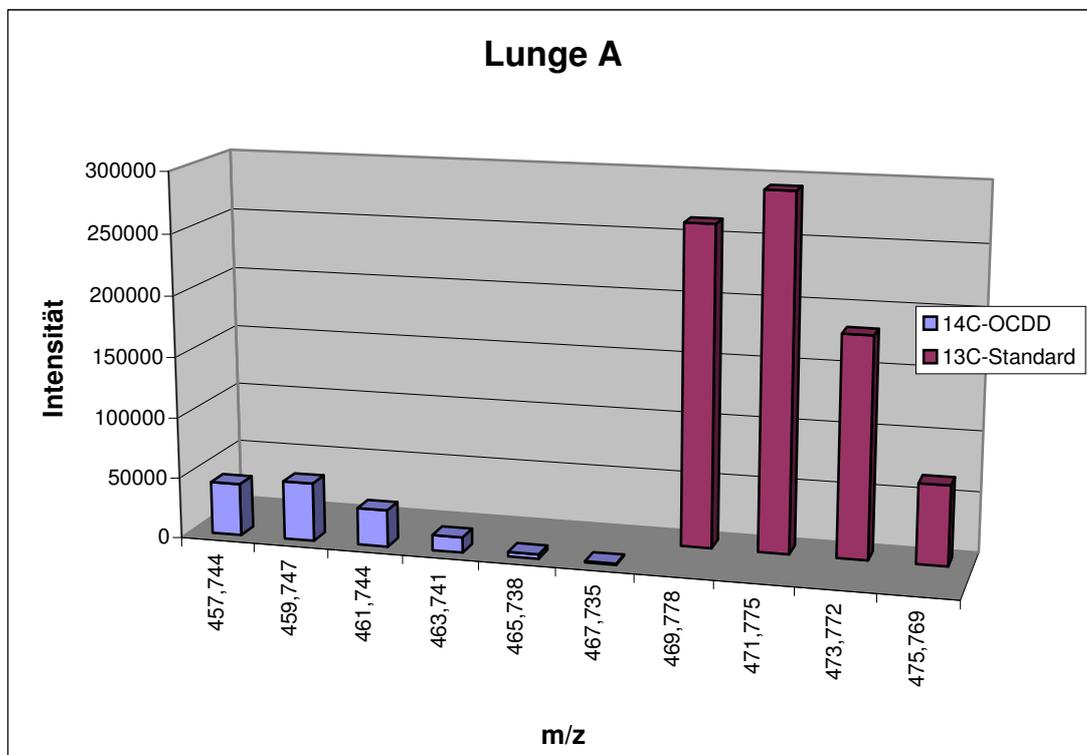


Abb. 4.1-12 Analyse der Lunge von Minipig A

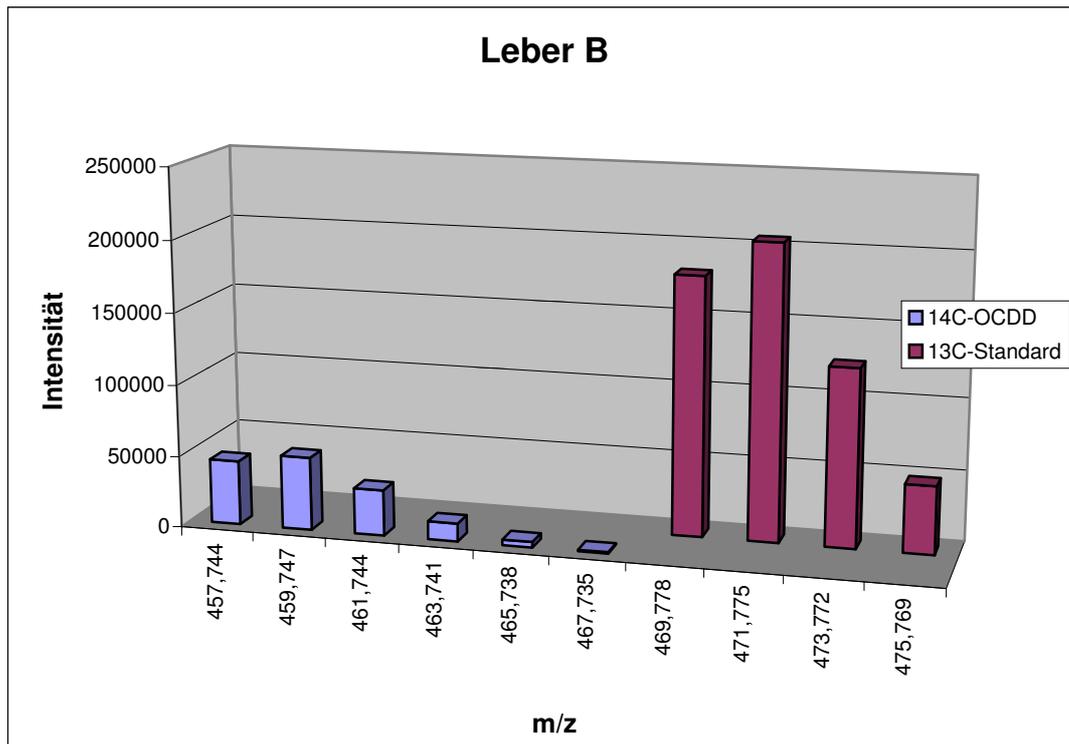


Abb. 4.1-13 Analyse der Leber von Minipig B

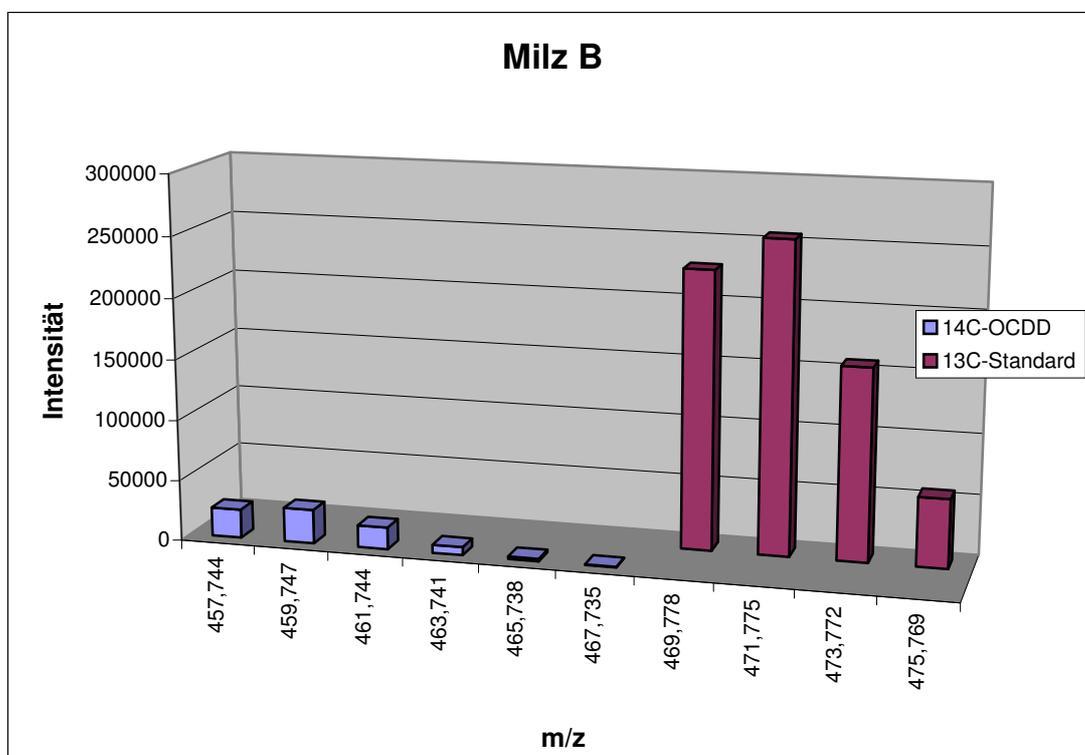


Abb. 4.1-14 Analyse der Milz von Minipig B

Diese Analysen wurden nun mittels der unter 3.5.1.4 festgelegten Parameter ausgewertet, um den Gehalt an  $^{14}\text{C}$ -OCDD (sowohl einfach als auch zweifach markiert) zu bestimmen.

Dabei ergaben sich folgende Werte:

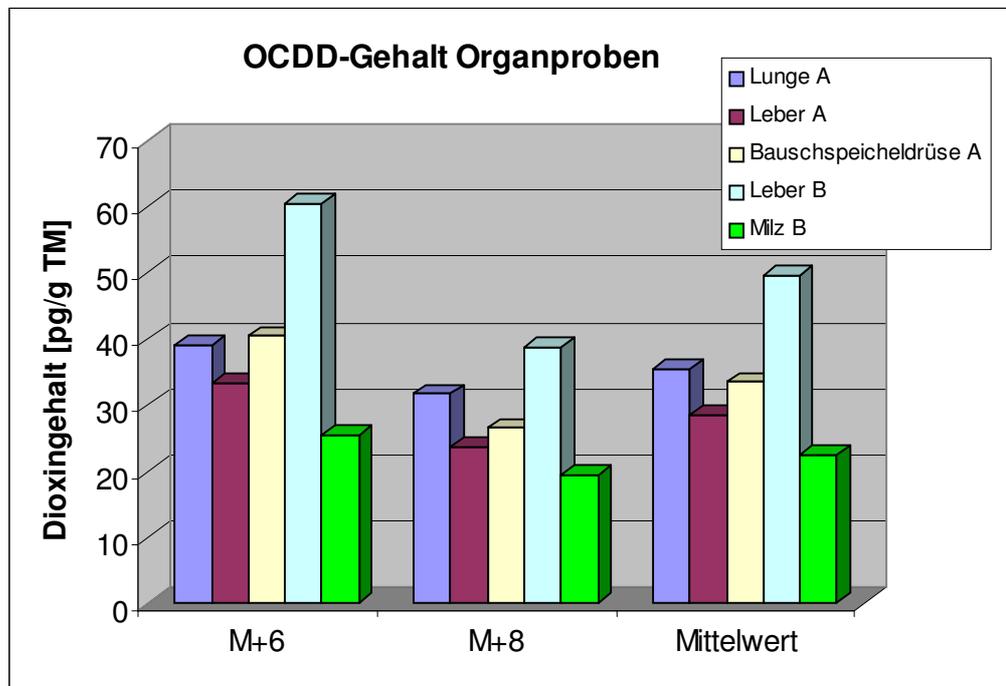


Abb. 4.1-15 Auswertung des Gehalts an markiertem OCDD

## 4.2 Waldbodenversuch

Die Ergebnisse der Voruntersuchung der beiden Bodenproben auf chlorierte Phenole und Methylphenole zeigt Tab. 4.2-1:

**Tab. 4.2-1 Gehalt der Bodenproben an Chlorphenolen**

	<i>Probe 315a (ng/g)</i>	<i>Probe 690a (ng/g)</i>
2-Chlorphenol	x	x
3-Chlorphenol	x	x
4-Chlorphenol	x	<sup>32</sup> x
4-Chlor-2-methylphenol	0,98	1,47
4-Chlor-3-methylphenol	<0,2	0,36
2,3 + 2,4-Dichlorphenol	33,30	6,41
2,5-Dichlorphenol	0,84	0,89
2,6-Dichlorphenol	23,73	10,23
3,4-Dichlorphenol	x	x
3,5-Dichlorphenol	x	x
2,3,4-Trichlorphenol	0,27	0,15
2,3,5-Trichlorphenol	0,26	0,36
2,3,6-Trichlorphenol	0,11	0,13
2,4,5-Trichlorphenol	1,26	0,29
2,4,6-Trichlorphenol	14,45	17,52
3,4,5-Trichlorphenol	x	x
2,3,4,5-Tetrachlorphenol	1,43	0,31
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,56	0,40
2,3,5,6-Tetrachlorphenol	0,41	0,74
Tetrachloro-2-methoxyphenol	117,69	1,65
Pentachlorphenol	3,87	x

Die Messungen ergaben keine Monochlorphenole und auch nur Spuren an Pentachlorphenol in Boden 315, was für die geplanten Versuche vorteilhaft war. Dagegen zeigte sich ein breites Spektrum an Di-, Tri- und Tetrasubstituierten Phenolen. Alle Werte bewegen sich aber nur im

Nanogrammbereich pro Gramm. In den meisten Fällen waren die Ergebnisse beider Bodenproben sehr ähnlich. Nur 2,3-, 2,4-, und 2,6-Dichlorphenole wurden in Boden 315 in zwei- bis dreifachen Mengen wie in Boden 690 nachgewiesen, und Tetrachloro-2-methoxyphenol erreichte bei Boden 315 mit 118 ng/g einen 70fach höheren Messwert.

#### 4.2.1 Radioaktivität

Da für den Bodenversuch genug Probenmaterial zur Verfügung stand, wurde nicht nur mit Soxhlet extrahiert, sondern anschließend auch mit Accelerated Solvent Extraction (ASE). Der Vergleich der erreichten Aktivität im unaufgereinigten Extrakt zeigte eine deutlich höhere Effizienz von ca. 80% bei Boden 315 und ca. 30% bei Boden 690, wie in Abb. 4.2-1 und Abb. 4.2-2 zu erkennen. Deshalb wurden für die anschließende Dioxinanalytik die ASE-Extrakte eingesetzt.

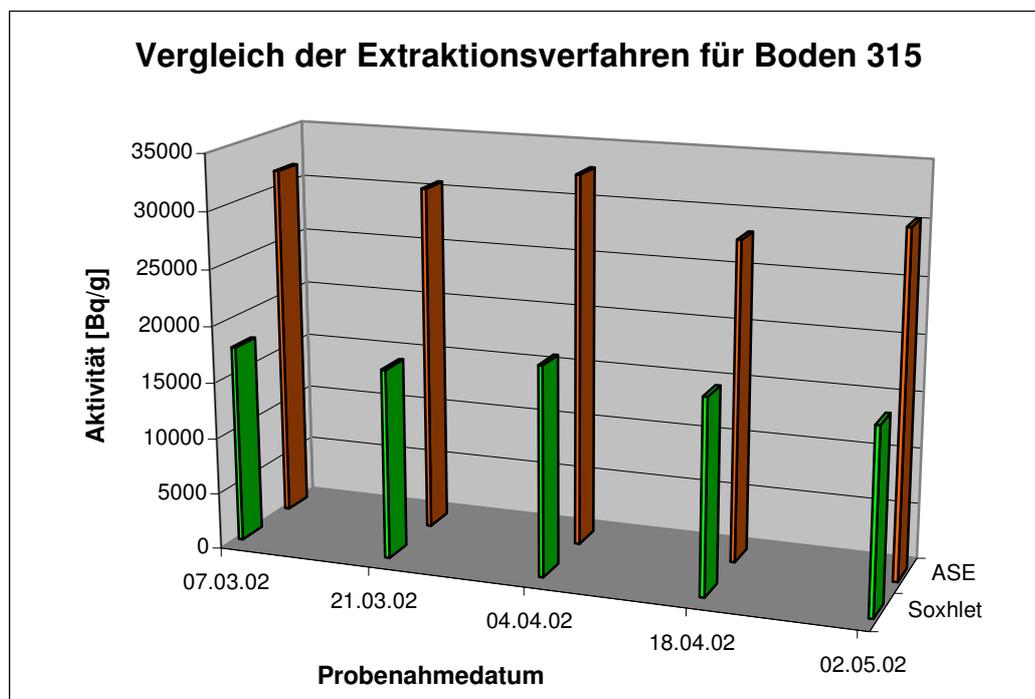
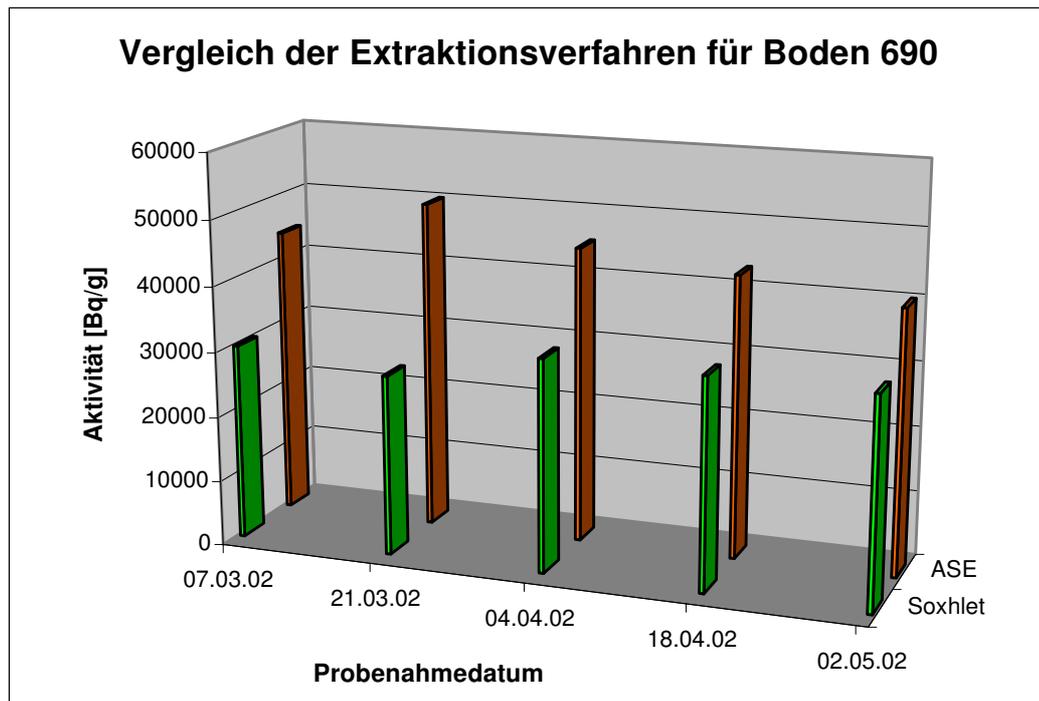
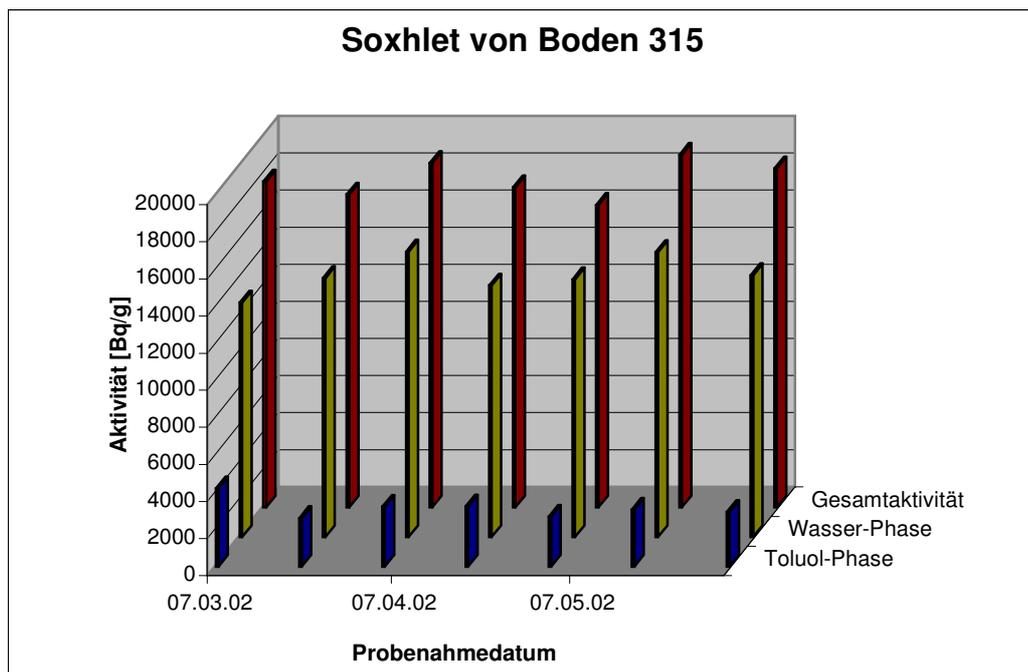


Abb. 4.2-1 Vergleich der Effizienz der Extraktionsmethoden für Boden 315

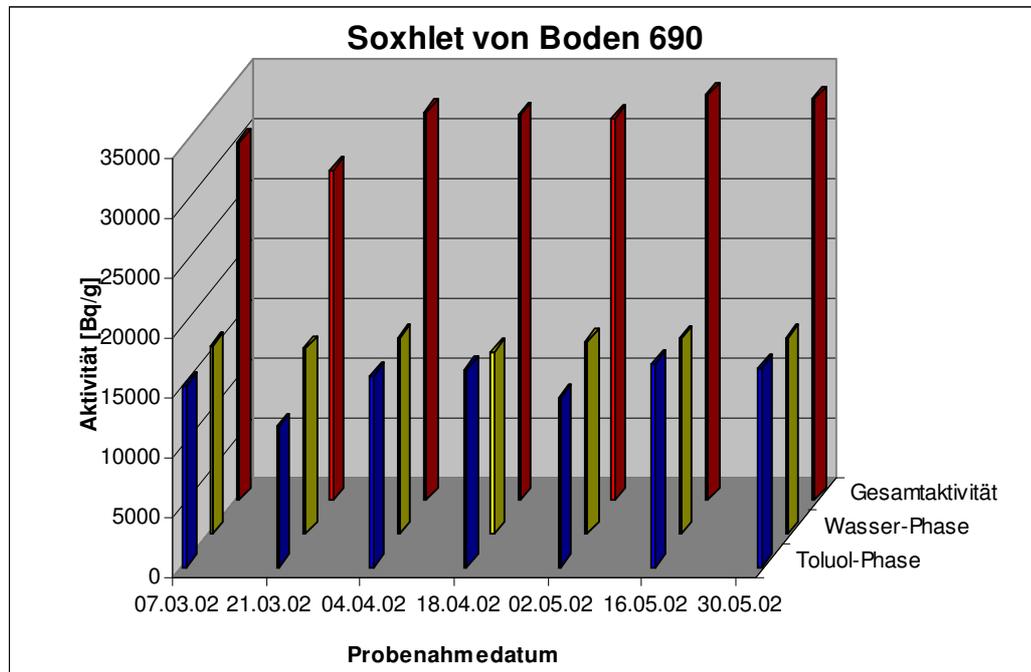


**Abb. 4.2-2 Vergleich der Effizienz der Extraktionsmethoden für Boden 690**

Bereits vorher wurden die Soxhletextrakte zur Überprüfung der lipophilen Anteils wie bei den Organproben mit 2N-NaOH ausgeschüttelt, und die verschiedenen Fraktionen am Szintillationszähler vermessen. Dabei ergab sich ein erstaunliches Ergebnis, wie in Abb. 4.2-3 und Abb. 4.2-4 zu sehen:



**Abb. 4.2-3 Bodenextrakte von 315 vor und nach Behandlung mit 2N-NaOH**



**Abb. 4.2-4 Bodenextrakte von 690 vor und nach Behandlung mit 2N-NaOH**

Von Boden 315 gingen nur 16-24% der extrahierten Aktivität in die Toluolphase über, während von Boden 690 zwischen 42% und 50% der Radioaktivität in der

Toluolphase zu finden waren. Dies war aufgrund der Bodenprofile nicht unbedingt zu erwarten. Außerdem wurden beide Böden mit der gleichen PCP-Lösung versetzt und unter gleichen Bedingungen inkubiert. Da auch mit dem gleichen Verfahren extrahiert wurde, kann der Grund für diesen Unterschied nur in einer verschiedenen Metabolisierung und einer verschiedenen festen Bindung der markierten Substanz an die Matrix liegen.

Denn ebenfalls auffällig ist der unterschiedlich hohe Wert der Gesamtaktivität, der extrahiert wurde. Eingesetzt wurde eine Gesamtaktivität von 70045 Bq pro Gramm Trockenmasse (das stellt allerdings nur einen statistischen Durchschnittswert da, weil nicht einzeln pro Erlenmeyerkolben-Ansatz dosiert wurde, sondern der gesamte Ansatz mit dem  $^{14}\text{C}$ -PCP versetzt und 24 Stunden durchmischt wurde. Daraus resultierten sicher leichte Schwankungen in der Radioaktivitätsmenge pro Erlenmeyerkolben). Extrahiert wurden davon bei Boden 315 nur zwischen 16303 Bq und 19004 Bq mittels Soxhlet und 28363 Bq bis 32965 Bq mittels ASE. Bei Boden 690 waren es zwischen 27603 Bq und 33899 Bq beim Soxhletverfahren und 40420 Bq bis 50273 Bq im Fall von ASE.

#### 4.2.2 Verbleib der Aktivität während des Clean-Up

Auch hier wurden während der Aufreinigung der Proben vom gesammelten Eluat jeweils 1 ml Probe genommen und die Aktivität bestimmt.

**Tab. 4.2-2 Aktivität (in Bq/ml) der Fraktionen nach den versch. Säulen**

<i>Probe</i>	<i>Sandwichsäule</i>	<i>Aloxsäule</i>	<i>Florisilsäule</i>
315-0703	163	2	3
315-1804	49	2	1
315-0106	343	33	7
690-0703	140	4	2
690-1804	147	0	0
690-0106	75	4	2

In Tab. 4.2-2 wird ebenfalls deutlich, dass bei allen Proben bereits der größte Anteil an Radioaktivität auf der Sandwichsäule verbleibt, wie bei den Organproben auch. Nach der Aluminiumoxidsäule bewegen sich die Messwerte bereits nahe der Nachweisgrenze und verändern sich nach der Florisilsäule nicht mehr nennenswert. Nur der Boden 315 vom 1.6. zeigt erhöhte Werte, wie sie auch bei der PCDD/F-Analytik auftraten (siehe 4.2.3).

### **4.2.3 PCDD/F-Belastung**

Nach der selben Methode wie bei den Organproben wurden die Waldbodenproben mittels GC-MS analysiert, um den PCDD/F-Gehalt, insbesondere an OCDD zu bestimmen.

Abb. 4.2-5 bis Abb. 4.2-12 zeigen die Ergebnisse der beiden Bodenproben im Verlauf der Zeit. Auch hier waren in allen Analysen die gemessenen Werte an OCDD deutlich niedriger als die dotierte Menge an  $^{13}\text{C}$ -Standard, mit Ausnahme der ersten Probe, die für Boden 315 am 01.06. genommen wurde (Abb. 4.2-13). Deren Wert ist hier getrennt dargestellt, da er deutlich von den übrigen Werten abweicht und auch durch die beiden parallelen Proben des gleichen Tages nicht bestätigt wurde. Da hier auch bereits eine erhöhte Radioaktivität festgestellt wurde, kann eine mögliche Ursache in einer Klumpenbildung liegen.

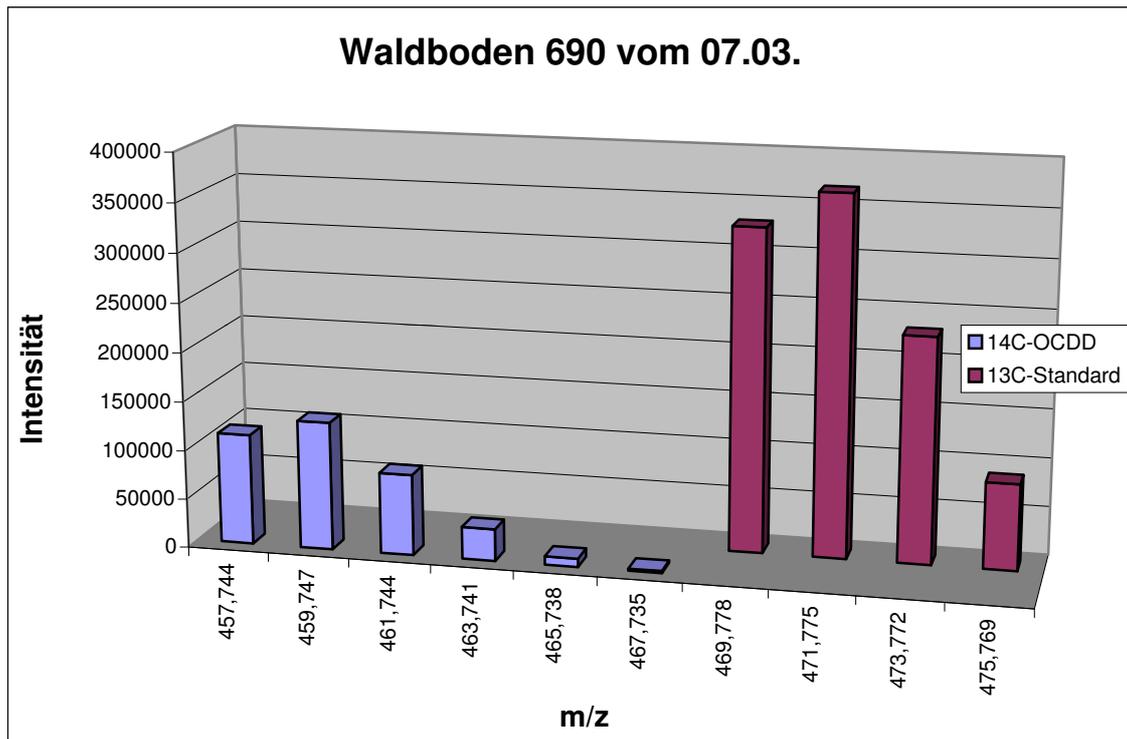


Abb. 4.2-5 Analyse der Bodenprobe 690 vom 07.03.

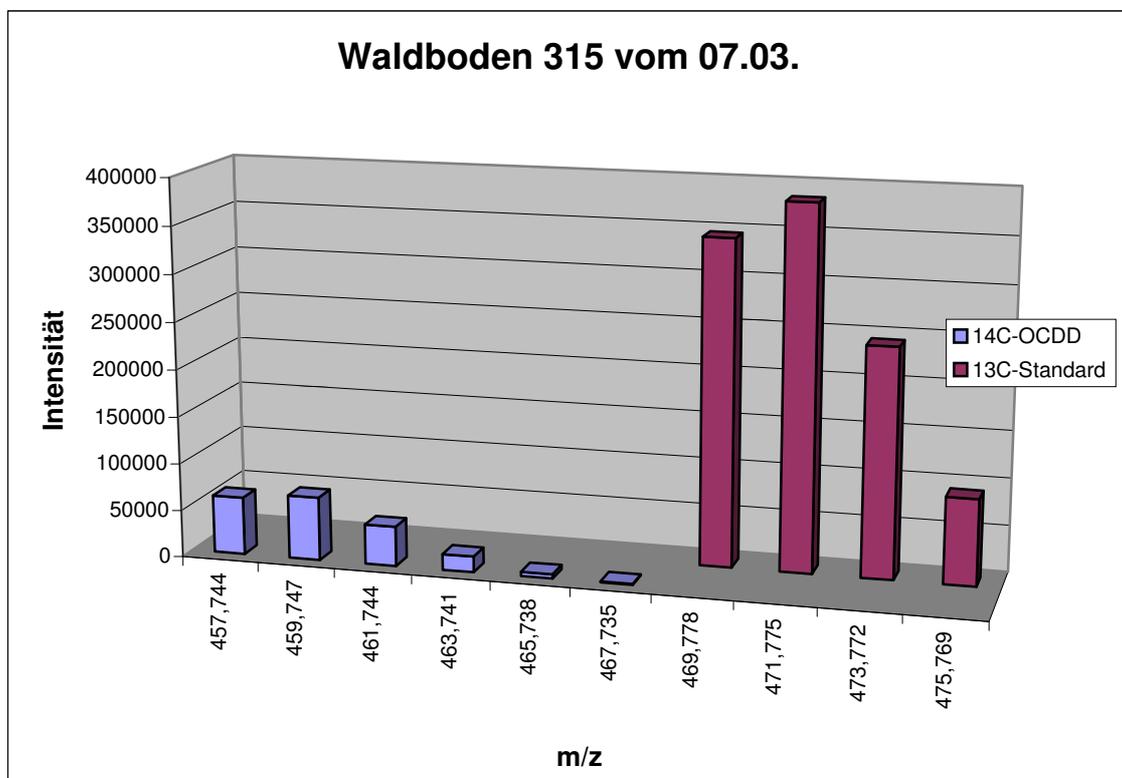


Abb. 4.2-6 Analyse der Bodenprobe 315 vom 07.03.

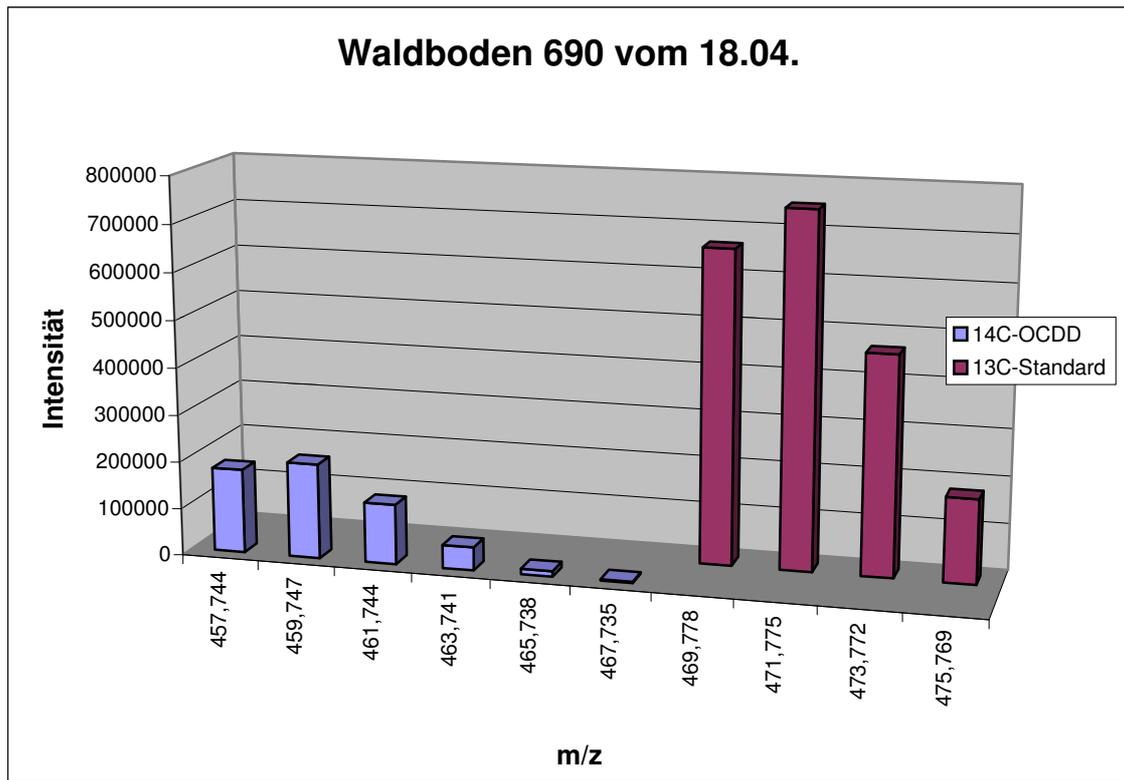


Abb. 4.2-7 Analyse der Bodenprobe 690 vom 18.04.

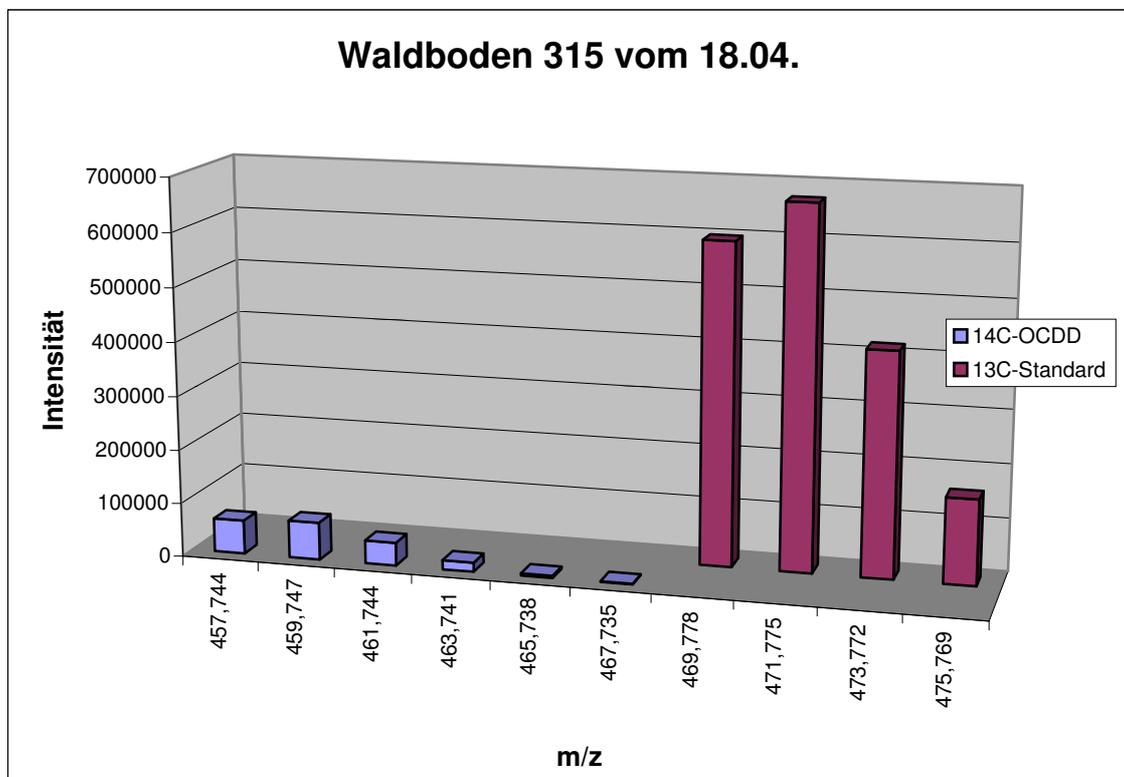


Abb. 4.2-8 Analyse der Bodenprobe 315 vom 18.04.

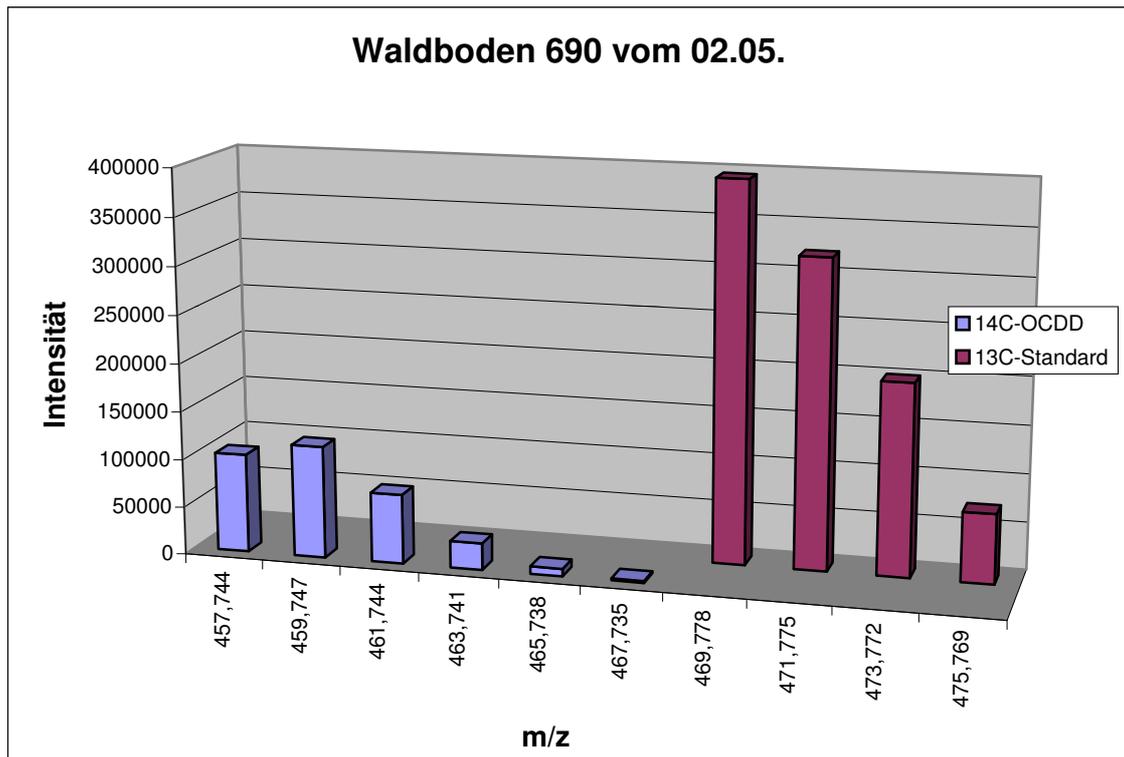


Abb. 4.2-9 Analyse der Bodenprobe 690 vom 02.05.

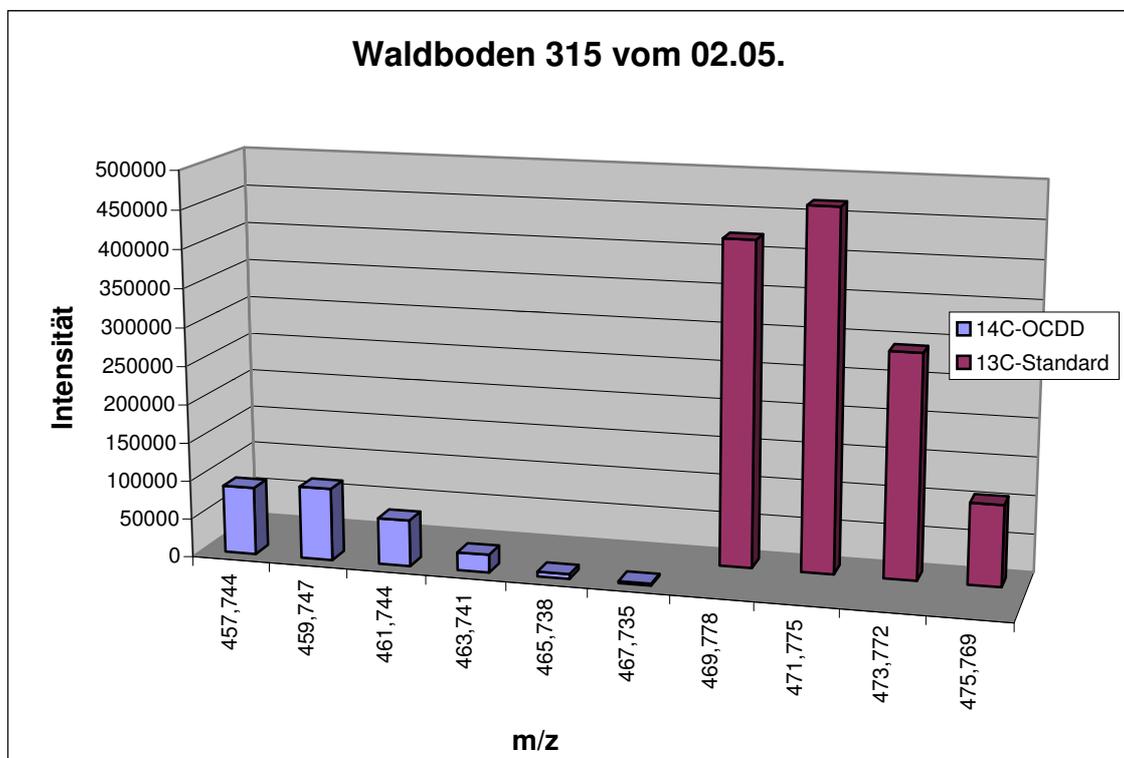


Abb. 4.2-10 Analyse der Bodenprobe 315 vom 02.05.

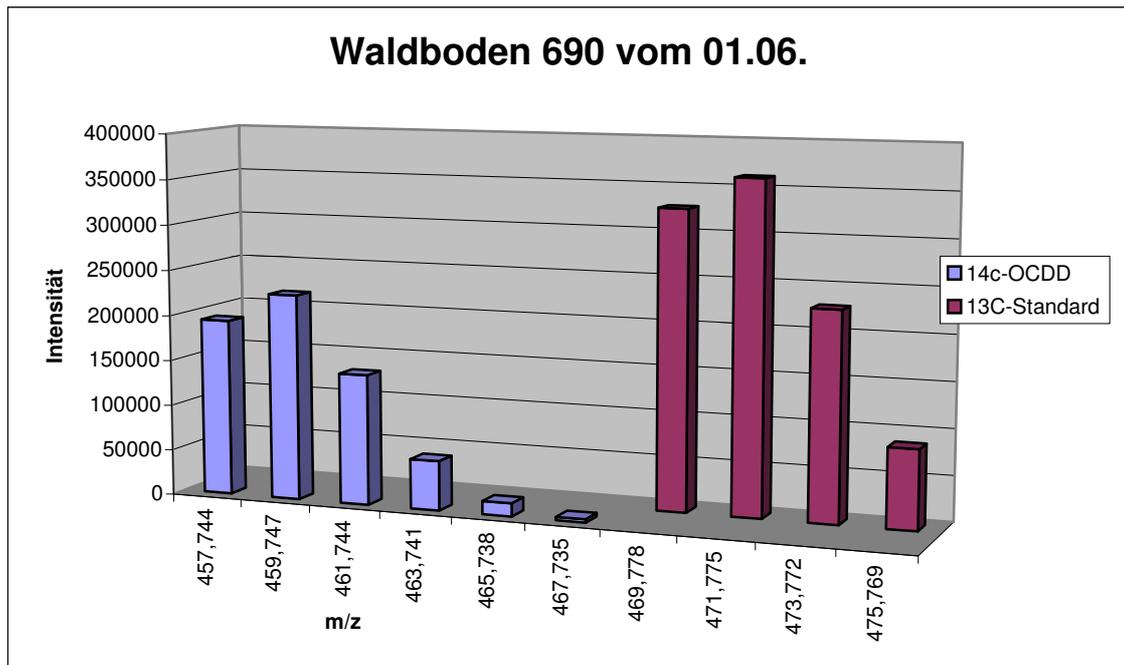


Abb. 4.2-11 Analyse der Bodenprobe 690 vom 01.06.

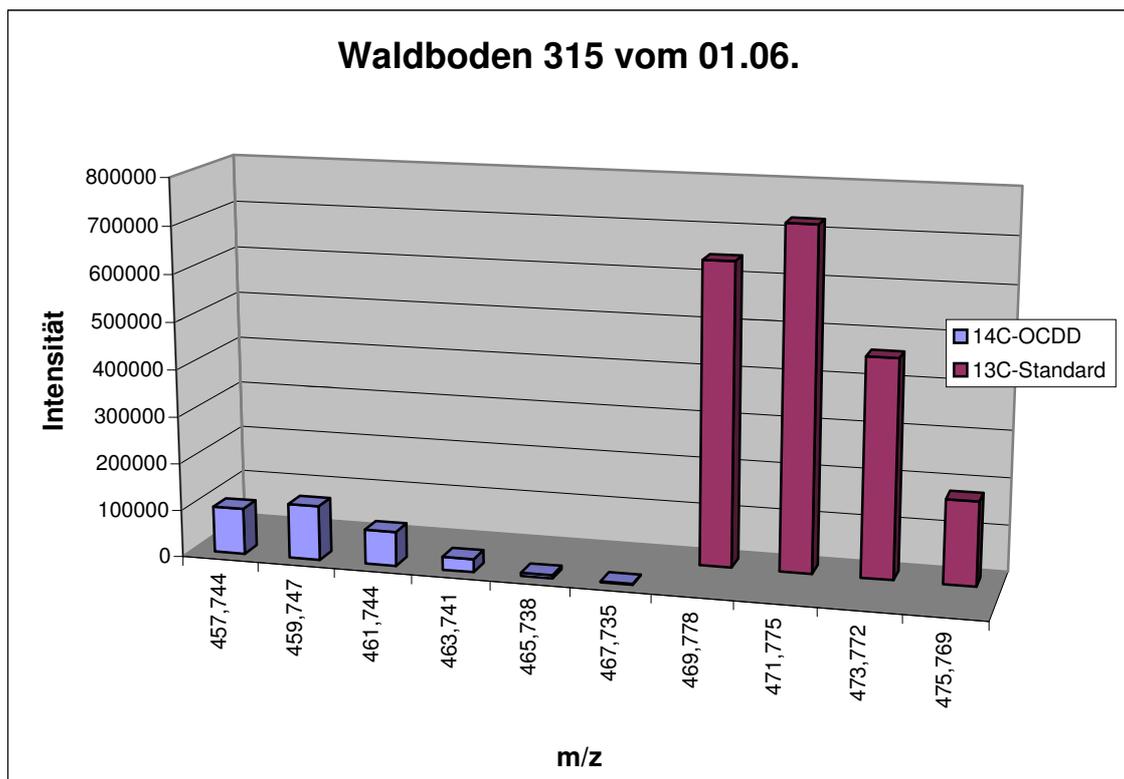
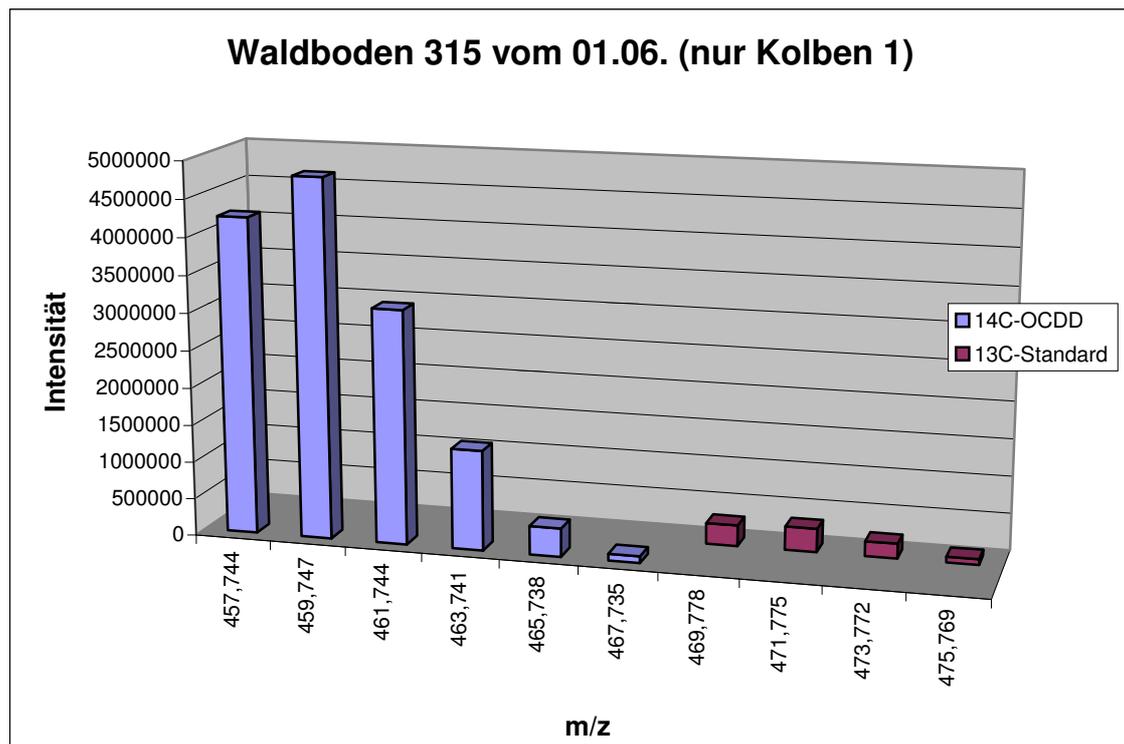


Abb. 4.2-12 Analyse der Bodenprobe 315 vom 01.06.



**Abb. 4.2-13 Auffälliges Ergebnis der ersten Analyse für Boden 315 vom 01.06.**

Da aber auch ein messtechnischer Ausreißer nicht ausgeschlossen werden kann, wurde dieser Wert bei der Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt:

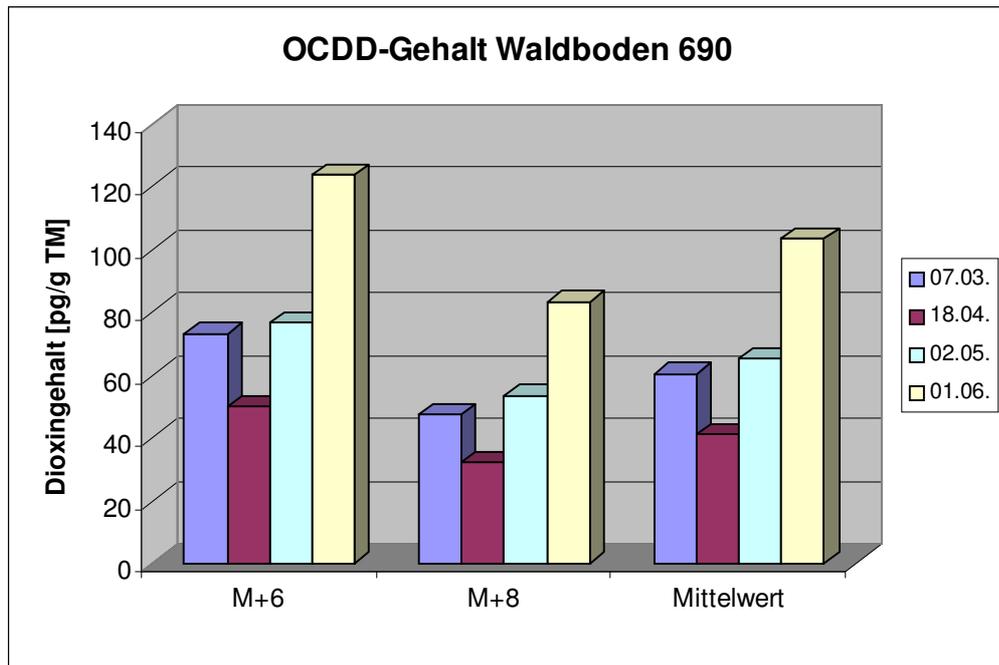


Abb. 4.2-14 Auswertung des Gehalts an markiertem OCDD bei Boden 690

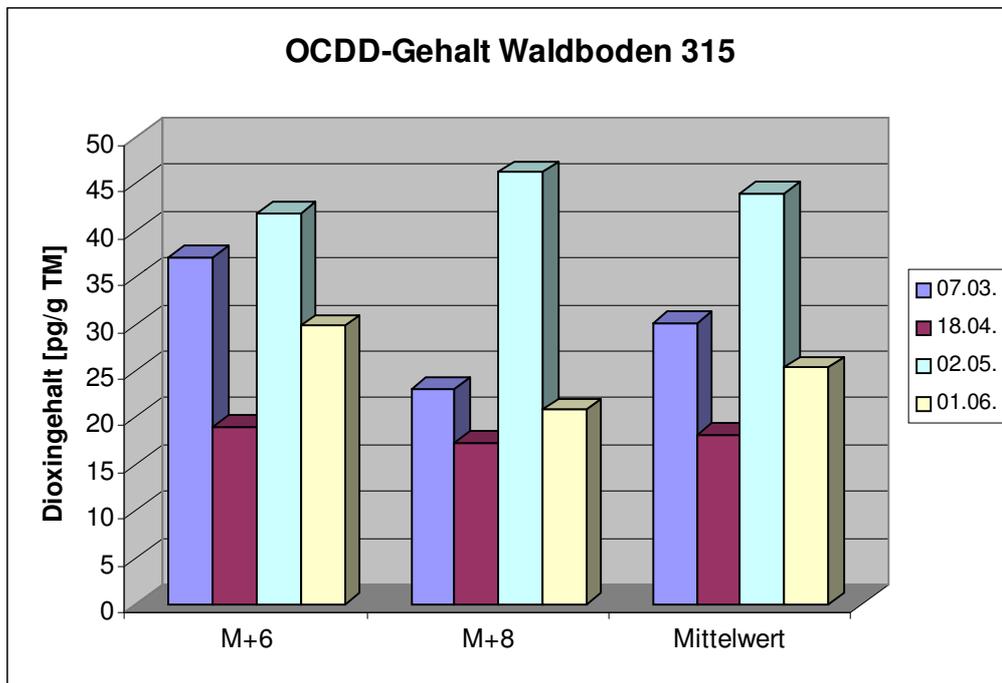
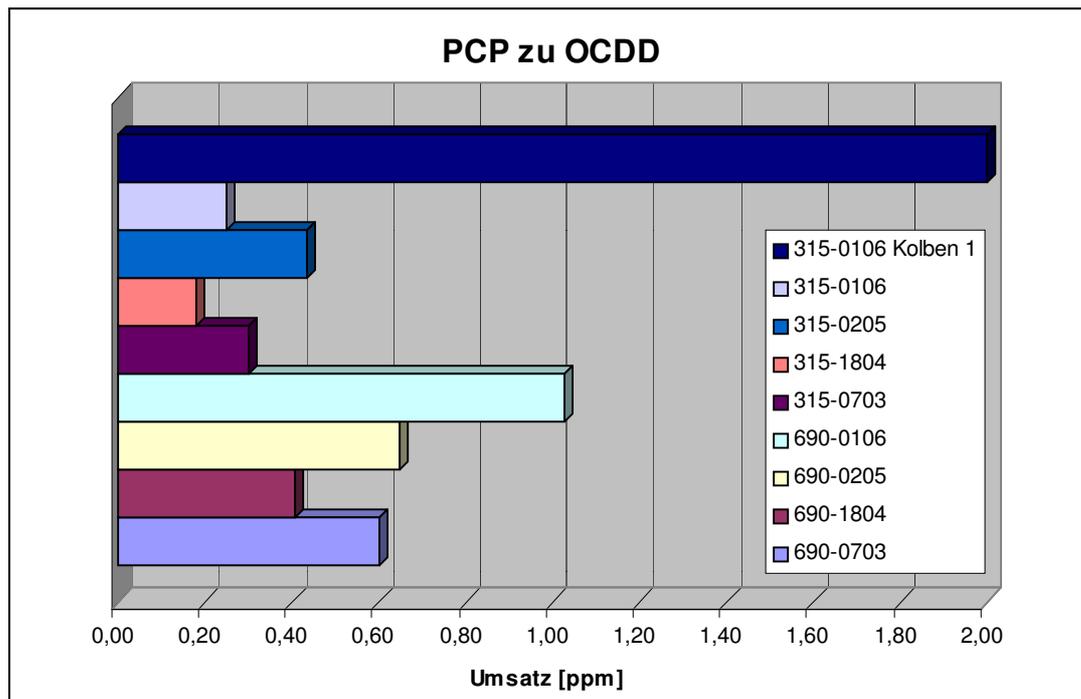


Abb. 4.2-15 Auswertung des Gehalts an markiertem OCDD bei Boden 315



**Abb. 4.2-16 Bildung von OCDD aus PCP (pg/ $\mu$ g)**

Hierbei ist zu beachten, dass die Werteachse bei 2 ppm abgeschnitten wurde, der Wert für Boden 315-0106 in Kolben 1 jedoch 30,2 ppm beträgt, somit die anderen Werte um das mindestens 30-fache übersteigt.

## 5 Diskussion

PCDD/Fs sind wegen ihrer hohen Toxizität für Mensch, Tier und Umwelt und der Persistenz von hoher ökotoxikologischer Bedeutung. Aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften reichern sich diese organischen Verbindungen in Organismen an. Außerdem ist ihre Bildung in Verbrennungsprozessen organischer Materialien in Anwesenheit von Chlor ein viel diskutiertes Problem. In einigen Fällen scheinen jedoch Anreicherungseffekte für die gefundenen hohen PCDD/F-Belastungen nicht die alleinige Ursache zu sein, und die gefundenen Isomerenmuster mit einer hohen Dominanz an OCDD sprechen gegen eine technogene Entstehung. Als Erklärungsansatz werden Bildungsmechanismen von PCDD/F in biologischen Systemen diskutiert. Neben einer biogenen Bildung aus geeigneten Vorläufersubstanzen unter aeroben Bedingungen werden in neueren Publikationen auch Umhalogenierungsreaktionen unter anaeroben Verhältnissen genannt.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Untersuchung der biogenen Bildung aus der radioaktiv markierten Vorläufersubstanz Pentachlorphenol. Der radioaktive Zerfall des  $^{14}\text{C}$  sollte die Wiederfindung, Identifizierung und Quantifizierung erleichtern und andere Quellen der detektierten Dioxine ausschließen. Zur genauen Quantifizierung der gebildeten PCDD/F fand ein  $^{13}\text{C}$ -markierter Internstandard Verwendung. Durch das natürliche Chlorisotopengemisch 35/37 waren aber Überlagerungen unvermeidlich, da dies sehr ähnliche Massendifferenzen ergibt wie zwischen den Kohlenstoffisotopen  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ , und  $^{14}\text{C}$ .

Die Auswahl von PCP als Ausgangsmaterial war durch folgende Faktoren bedingt: Es stellt einen potentiellen Precursor für OCDD dar und war leicht verfügbar, da die Substanz bereits radioaktiv markiert im Institut vorhanden war. Außerdem ist PCP ein primäres Abbauprodukt von HCB im menschlichen

Organismus. HCB wird zwar als Fungizid nicht mehr direkt appliziert, aber immer noch technisch verwendet. Aufgrund seiner Persistenz hat es eine hohe Halbwertszeit in der Umwelt (Rippen, 1994). Durch die vollständige Chlorierung stellen OCDD und OCDF die am direktesten zu erwartenden Produkte einer Aufbaureaktion zu PCDD/Fs dar. Für alle anderen Kongenere müsste zuerst eine weitere Dechlorierung stattfinden. Dies könnte ein möglicher Grund für die gefundenen ungewöhnlichen Verteilungsmuster mit starkem Übergewicht an OCDD sein. Die photochemische oder biochemische Transformation von PCP zu OCDD wurde bereits in verschiedenen Studien berichtet (Öberg, 1992), (Wittsiepe, 1998).

Weiterhin äußerten Prange et al. die Vermutung, dass für die ungewöhnlich hohen OCDD-Konzentrationen in Bodenproben PCP verantwortlich sein könne. Hierbei wurde bei der Untersuchung eines Bodenprofils in Australien Verteilungsmuster gefunden, wie sie typisch für eine PCP-Kontamination sind. In tieferen Schichten jedoch dominierten OCDD und HpCDD. Da PCDD/Fs generell nicht in tiefere Bodenschichten migrieren, wäre ein mögliche Ursache das Wandern von PCP in die tieferen Bodenschichten und eine Konvertierung dort über noch nicht identifizierte Vorgänge zu den gefundenen OCDD und HpCDDs. (Prange, 2002).

Für die Prüfung der Hypothese, dass sich in biologischen Systemen Dioxine bilden können, fanden Minipigs und Waldbodenstreuauflagen als Matrix Verwendung. Ausschlaggebend für diese Auswahl der Matrices war unter anderem die menschenähnliche Darmflora der Schweine und die Anwendung von PCP als Holzschutzmittel. Ferner boten Minipigs im Vergleich zu anderen Tieren wie Affen den Vorteil, dass Ihre artgerechte Haltung wesentlich unkomplizierter ist, und das entsprechende Tierpflege-Know-How sowie Metabolismuskäfige bereits vorhanden waren.

Außerdem bestehen ausgedehnte Voruntersuchungen des Geologischen Landesamtes Bayern zu verschiedenen Bodenparametern, insbesondere zum Chlor- und Dioxingehalt, aufgrund derer die Orte für die Bodenproben ausgewählt wurden.

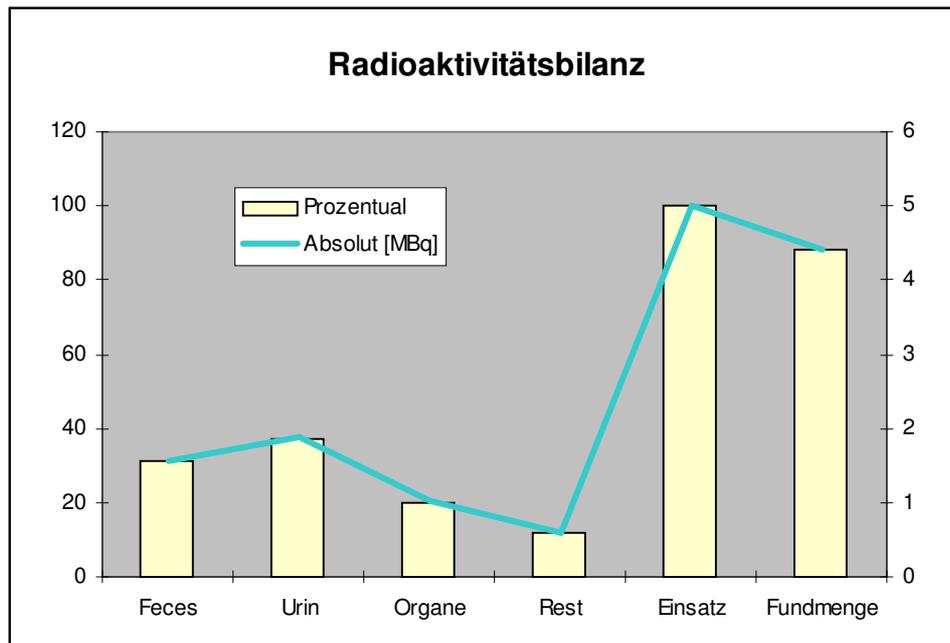
## 5.1 Minipigversuch

Die für diesen Versuch verwendeten Tiere stammen aus einer kontrollierten Aufzucht in Dänemark mit einer sogenannten Schutzbarriere. Dadurch wird sichergestellt, dass die Tiere unter möglichst ähnlichen Bedingungen aufwachsen, und frei von Krankheiten und unerwünschten Keimen sind. Ferner wurden geschlechtsspezifische oder altersbedingte Unterschiede ausgeschlossen, indem zwei gleichaltrige Männchen gewählt wurden. Somit besteht die bestmögliche Vergleichbarkeit.

Eine größere Anzahl an Versuchstieren zur besseren Kontrolle war aus verschiedenen Gründen nicht möglich: Aufgrund von Mangel an erfahrenen Tierpflegern wäre die Einhaltung der Tierschutzauflagen bei einer höheren Zahl nicht gewährleistet. Außerdem hätte der Platzbedarf der Metabolismuskäfige den vorhandenen Raum überstiegen. Deshalb wurde der Versuch auf zwei Tiere beschränkt. Beide Tiere wurden im Fütterungsexperiment eingesetzt. Es gab kein Kontrolltier, das parallel zum Versuch unter gleichen Bedingungen gehalten worden wäre, aber nur unmarkiertes Futter zum Fressen bekommen hätte. Dies wäre in diesem Fall auch nicht sinnvoll gewesen, da ja nicht der Effekt auf das Tier im Vordergrund stand, sondern der Weg, Verbleib, Veränderungen und potentielle Dioxinbildung aus der Tracersubstanz.

Die Applikation des PCP erfolgte oral mit dem Futter. Durch die Dotierung auf einen kleinen Teil der Futtermenge und Vorab-Fütterung wurde eine vollständige Aufnahme sichergestellt. Dies erfolgte über einen Zeitraum von einem Monat, während dem die Ausscheidungen der Tiere gesammelt wurden. Die Dosis wurde zwei Wochen konstant gehalten, danach für den Rest des Versuchs verdoppelt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Tiere getötet und Proben der verschiedenen Organe und Gewebe genommen.

Die Analyse der Exkremente und des Urins auf ihren Radioaktivitätsgehalt ergab einen Überblick über den Verbleib des markierten Materials. Dabei wurden 30,7 % der Aktivität nicht aufgenommen, sondern über den Darm mit den Feces wieder ausgeschieden. Somit wurden 69,3 % resorbiert. Davon wurden 37,3 % im Urin gemessen.



**Abb. 5.1-1 Verteilung der Radioaktivität in den verschiedenen Matrices**

Die verschiedenen Gewebeproben der Minipigs wurden gefriergetrocknet, homogenisiert und auf ihren Aktivitätsgehalt untersucht. Hier fanden sich 20,2 % der gesamten Radioaktivitätsdosis.

Insgesamt (nach Addition des Gehalts der Organe) wurden 88,3 % der eingesetzten Menge wiedergefunden. Damit beträgt die fehlende Differenz 11,7 %. Gründe dafür sind die Schwankungen in der Ausscheidungsmenge, Verbleib von Restmengen Kot in den Käfigen, usw. Außerdem wurde vom Muskelgewebe nur eine Probe entnommen und die genaue Gesamtmuskelmasse ist nicht bekannt. Der Wert für das Muskelgewebe, der zum Gesamtergebnis addiert wurde, ist nur der Gehalt in der gesamten genommenen Probe, nicht der der gesamten Muskelmasse des Tieres.

Selbiges trifft auch auf das Lungengewebe zu. Hier ist der Fehlbetrag aber wesentlich geringer. Und es fehlen ferner Daten für Knochen, Haut, Blut und sonstiges Gewebe.

In diesen Geweben ist sicher ein Teil des Fehlbetrages enthalten. Es bestehen aber noch andere Möglichkeiten, z.B. die Veratmung eines Teils des markierten Kohlenstoffs, Restkontaminationen an den Metabolismuskäfigen oder Fehler wie die unvollständige Erfassung der exakten Kot- und Urinmenge. (siehe auch 3.3.2 und 4.1.1.4).

Für das weitere Vorgehen wurden diejenigen Organe zuerst ausgewählt und untersucht, die den größten Gehalt an Radioaktivität und somit an markiertem PCP und etwaigen Metaboliten enthielten. Dies waren an erster Stelle Leber und Lunge. Die Werte sind in Tab. 5.1-1 aufgeführt:

Tab. 5.1-1 Ergebnisse der Organuntersuchungen auf Radioaktivität

Bezeichnung	Details	Gewicht	Aktivität	Soxhlett	Aktivität Soxhlett nach NaOH	
		[g]	[Bq/g TM]	300ml Toluol	[Bq/g TM]	[Bq/g TM]
A1	Großhirn	52,8	578,3	5g	492	186
A2	Kleinhirn	16,5	411,3	5g	391	161
A3	Leber	220	4555,2	5g	2369	1915
A4	Niere	93,8	2453,9	3g	2336	1688
A5	Galle	44,5	1588,7	5g	501	175
A6	BSD	39	1661,6	5g	1534	529
A7	Herz	83,5	823,6	5g	804	444
A8	Lunge (Teil)	54,3	3923,1	5g	1343	837
A9	Dickdarm (Teil)	75	1482,3	5g	917	287
A10	Milz	35,5	1412,8	5g	1175	403
A11	Hoden	41,1	1121,6	5g	513	220
A12	Fettgewebe	10,7	1509,5	1g	434	127
A13	Muskelgewebe	94,5	865,5	5g	783	546
A14	Dünndarm	26,2	1570,9	5g	968	363
B1	Großhirn	50,5	594,4			
B2	Kleinhirn	16,3	389,5			
B3	Leber	235	4794,3	5g	2694	2095
B4	Niere	92,5	2610,8			
B5	Galle	45,4	1883,8			
B6	BSD	35,9	1481,0			
B7	Herz	94,7	1659,9	5g	1415	672
B8	Lunge (Teil)	30,5	2783,9			
B9	Dickdarm (Teil)	49,5	1680,0			
B10	Milz	41,8	1835,0	5g	1353	993
B11	Hoden	39,3	1330,3			
B12	Fettgewebe	24,7	616,8			
B13	Muskelgewebe	87	725,9			
B14	Dünndarm	32,8	1285,9			

Dabei stellt der Wert unter „Aktivität“ in Spalte 4 den Messwert nach Verbrennung der Organprobe dar, während der Wert unter „Aktivität Soxhlett“ in Spalte 6 das Ergebnis nach der Extraktion mit Toluol ist (siehe auch 4.1.1.3). Die fehlenden Werte konnten innerhalb des Zeitrahmens dieser Arbeit

---

nicht mehr ermittelt werden, das Probenmaterial wurde zur weiteren Untersuchung bei  $-40^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Besonders hohe Konzentrationen an Radioaktivität fanden sich in Leber und Niere, die als Stoffwechselorgane dafür prädestiniert sind, erstaunlicherweise aber auch für das Lungengewebe. Selbiges wies vor allem nach der Verbrennung einen sehr hohen Wert auf, während der Gehalt an extrahierbaren radioaktiven Substanzen geringer war. Allerdings ist anzumerken, dass von der Lunge nur ein Teil des Gewebes untersucht wurde. Ferner sei der Wert für das Fettgewebe hervorgehoben, da hier die Menge nicht für die normale Einwaage von 5 g im Soxhlet ausreichte. Es wurde bei der Sezierung nur wenig reines Fettgewebe wie das sogenannte Netz gefunden, so dass nur ca. 1 g getrocknete Probe zur Verfügung stand. Am niedrigsten waren erwartungsgemäß die Werte für die Hirnproben.

Insgesamt liegen die Werte für die Verbrennung immer über denen des Soxhletverfahrens. Da mit dem Soxhletverfahren nur mit Toluol extrahierbare Substanzen erfasst werden können, während mit der Verbrennung sämtliche oxidierbaren Verbindungen ermittelt werden, wäre ein umgekehrtes Ergebnis auch zwingend fehlerhaft. Allerdings sind die Schwankungen sehr hoch. So wurden für Klein- und Großhirn, aber auch für Niere und Bauchspeicheldrüse (BSD) sehr ähnliche Werte gefunden, während die Werte für Leber, Galle, Fettgewebe und besonders Lunge sehr weit auseinander liegen. Das deutet auf einen deutlich größeren hydrophilen Anteil an markiertem PCDD und möglichen Metaboliten hin. Bei einer Matrix wie Fettgewebe erscheint das widersprüchlich, aber kann durch die kleine Probenmenge und den daraus resultierenden großen Fehler begründet werden.

Wegen der aufwendigen Aufreinigung vor der eigentlichen PCDD/F-Analytik wurden zuerst einige verschiedene Organproben ausgewählt. Diese sollten eine hohe, deutlich messbare Aktivität besitzen, und zudem noch einen

hohen Anteil an Radioaktivität in der lipophilen Fraktion. Dies würde auf eine Metabolisierung der PCP hindeuten, welches besser in der basischen NaOH-Lösung löslich ist. Ein weiteres Kriterium war die Konsistenz der Probe, die Einfluss auf die Trocknungsergebnisse und die Homogenisierung hatte.

Die untersuchten Organproben stammten von Leber A & B, Lunge A, Bauchspeicheldrüse A und Milz B. Während des Clean-Up wurden von jeder Fraktion Proben genommen, um den Verbleib der Radioaktivität zu kontrollieren (siehe 4.1.2). Der größte Teil der Aktivität lag demnach in oxidierbaren Verbindungen vor, da nach der Sandwichsäule der Messwert bereits drastisch reduziert war. Nach den verbleibenden zwei Säulen wurden Werte von 2 bis 5 Bq/ml gemessen, entsprechend einem Gesamtgehalt in den 300 ml Eluat von 0,86 µg bis 2,16 µg, würde es sich dabei um unverändertes <sup>14</sup>C-PCP handeln. Diese Aktivität im Eluat war nahe an der Nachweisgrenze des Szintillationszählers, so dass der Umsatz zu OCDD und ähnlichen Verbindungen nur sehr gering sein konnte. Allerdings wurde die Probe vor der Aufkonzentration des Eluats genommen, und die Empfindlichkeit des GC-MS ist wesentlich höher. Auf jeden Fall darf das Ergebnis der GC-MS-Messung keinesfalls den Wert des Szintillationszählers übertreffen. In diesem Fall hätte man unmarkiertes OCDD in den Messwert miteinberechnet.

Die Auswertung der aufgereinigten Extrakte zeigten Werte zwischen 22 und 50 pg/g TM Gehalt an O<sup>14</sup>CDD. Die Schwankungsbreite der Messwerte betrug zwischen 19 und 60 pg/g TM absolut, bzw. zwischen ±3 pg/g TM und ±11 pg/g TM relativ. Der höchste Wert von 50 pg/g TM wurde in der Leber von Minipig B gefunden.

**Tab. 5.1-2 Markiertes OCDD in den Organproben in (pg/g TM)**

<i>Probe</i>	<i>M+6</i>	<i>M+8</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Abweichung</i>	<i>Prozentual</i>
Lunge A	39	32	35	±3	8,5
Leber A	33	24	28	±5	17,9
Bauchspeicheldrüse A	40	27	33	±7	21,2
Leber B	60	39	50	±11	22
Milz B	25	19	22	±3	13,6

Allerdings lässt sich aufgrund der Tatsache, dass nur die insgesamt eingesetzte Menge und die tägliche Dosis an  $^{14}\text{C}$ -PCP bekannt ist, keine genaue Aussage über den Umsatz treffen. Bezogen auf die gesamte verfütterte Menge an PCP ergäben sich Werte im ppb-Bereich, aber diese besäßen nur geringe Aussagekraft.

Für eine Abschätzung des biogenen Bildungspotentials von PCDD/F, insbesondere von OCDD, in lebenden Organismen muss außerdem berücksichtigt werden, dass in den durchgeführten Versuchen untypisch hohe Precursorkonzentrationen verwendet wurden. So wurden in den Versuchen PCP-Konzentrationen von ca. 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht eingesetzt bzw. täglich 0,17 – 0,34 mg PCP verfüttert. Diese Mengen sollten im normalen Schweinefutter nicht vorkommen.

Den größten Unsicherheitsfaktor bisheriger Untersuchungen, nämlich die Bildung und/oder Konkurrenzreaktion durch andere unbekanntes, möglicherweise effektivere Vorläufersubstanzen als Chlorphenole, ist in dieser Arbeit jedoch nicht gegeben, da eine eindeutige Identifizierung über die radioaktive Markierung möglich ist. Weitere Versuche zur biogenen Bildung von PCDD/F mit anderen ausgewählten Vorläufersubstanzen wären sinnvoll, um den maximal möglichen PCDD/F-Bildungsumfang abschätzen zu können. Hier konnte bisher nur der Beweis erbracht werden, dass eine Bildung aus der

Vorläufersubstanz PCP im lebenden Organismus, wenn auch nur im Pikogrammbereich, möglich ist.

Die Problematik der ungewöhnlichen Verteilungsmuster ist damit ebenfalls noch nicht schlüssig beantwortet. Derartige Bildungsreaktionen können demnach in der Natur auftreten, wenn geeignete hochchlorierte Verbindungen vorliegen, und könnten zu einer Verschiebung im Kongenerenmuster beitragen. Ob die Menge wie sie im Minipigexperiment nachgewiesen wurde allerdings ausreicht, ist jedoch fraglich.

## 5.2 Waldbodenversuch

Die Bodenproben für diesen Versuch wurden vom Geologischen Landesamt Bayern gesammelt und zur Verfügung gestellt. Die Auswahl der Beprobungsstandorte erfolgte nach vom GLA ermittelten Daten zur Bodenbeschaffenheit (siehe 3.4) und zum Gehalt an HCB und OCDD.

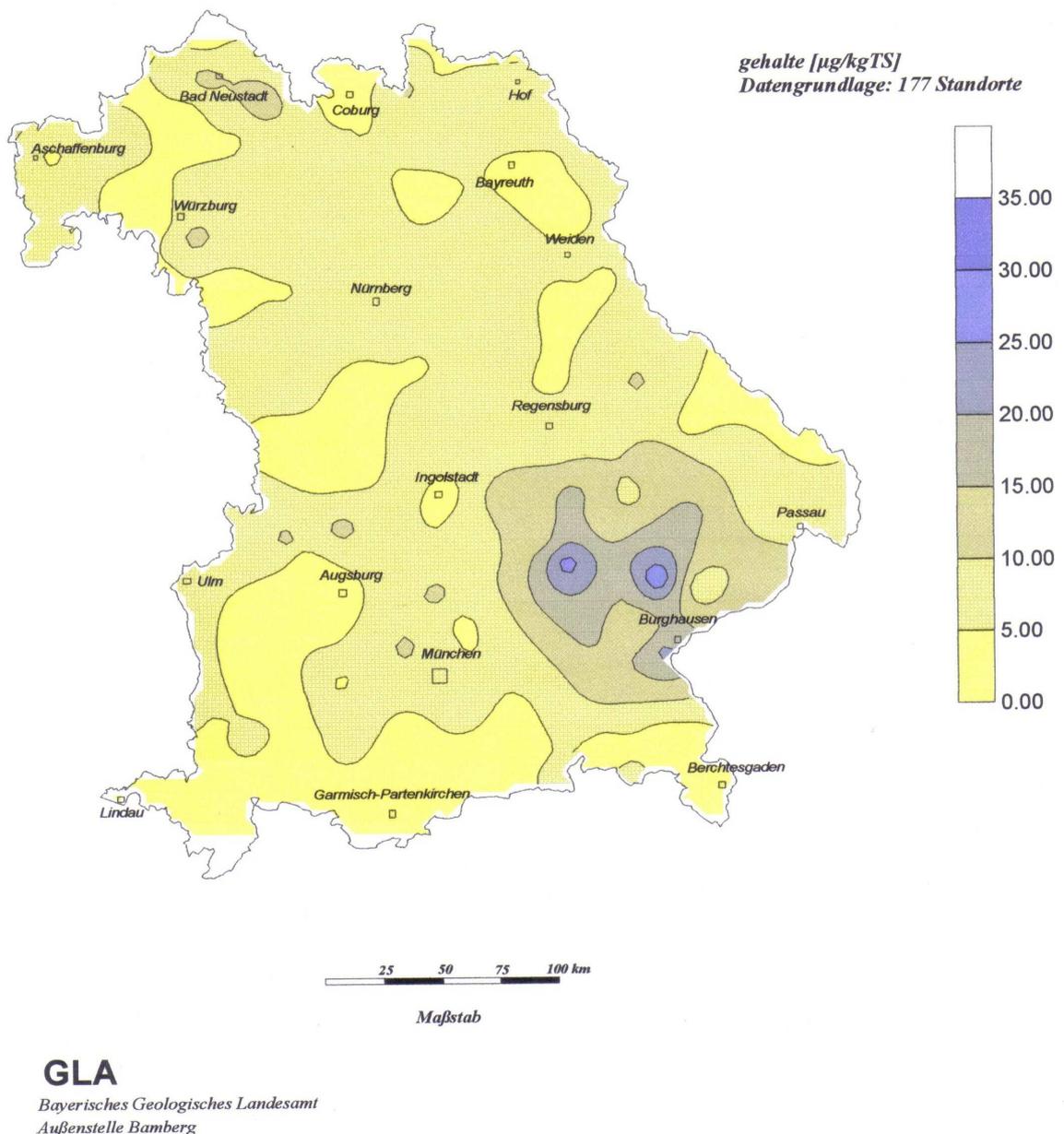
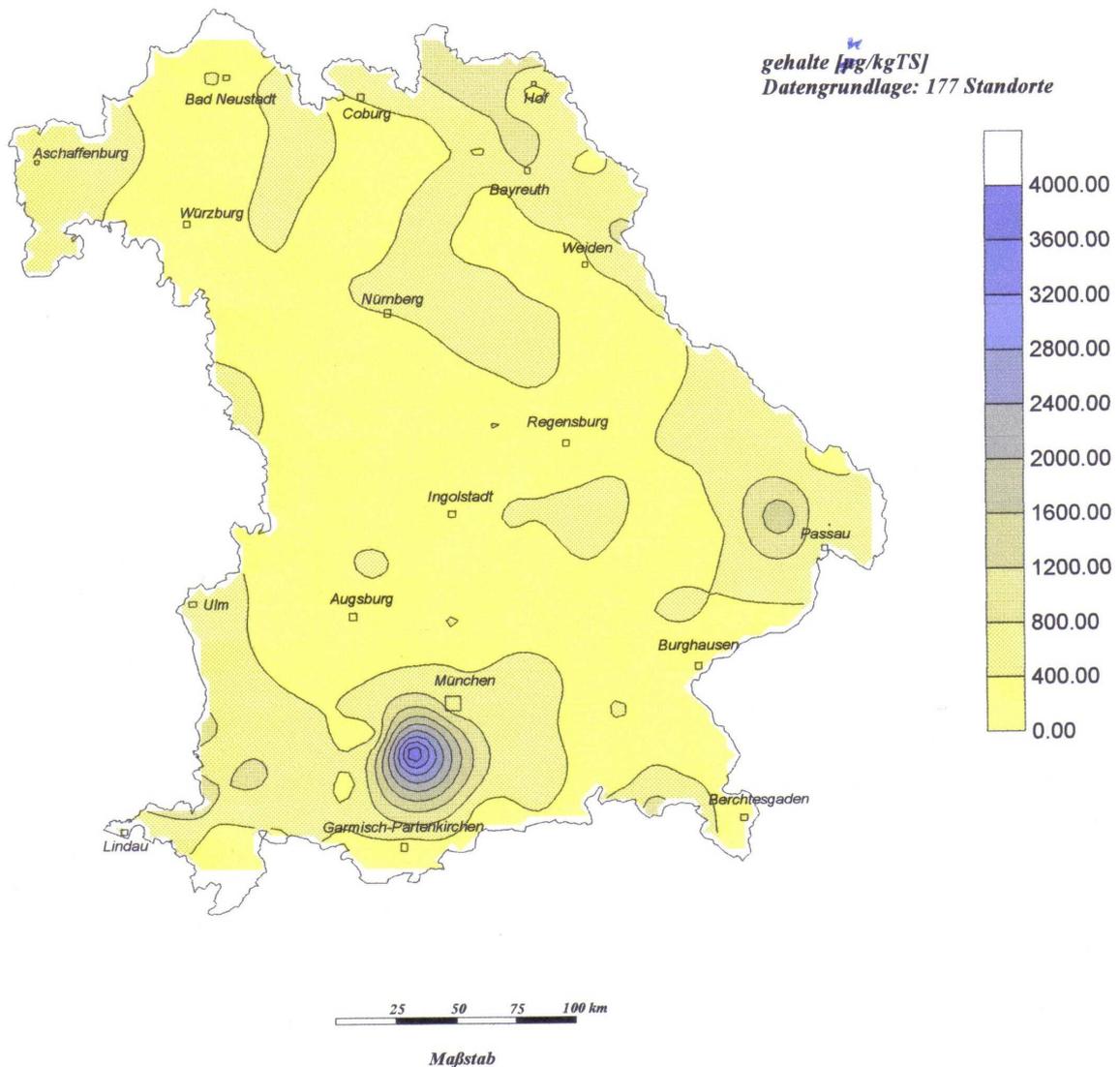


Abb. 5.2-1 HCB-Gehalte in Auflagen bayerischer Fichtenstandorte

**GLA**

Bayerisches Geologisches Landesamt  
Außenstelle Bamberg

**Abb. 5.2-2 OCDD-Gehalte in Auflagen bayerischer Fichtenstandorte**

Im Vorfeld wurden die Bodenproben auf Ihren Gehalt an chlorierten Phenolen untersucht (siehe 4.2). Die ermittelten Werte zeigten nur einen sehr geringen (Boden 315) bzw. einen nicht nachweisbaren (Boden 690) Gehalt an nativem PCP an. Dies war eine positive Vorbedingung für die geplanten Versuche, da dadurch nur sehr geringe Konkurrenz durch unmarkiertes PCP gegenüber den applizierten markierten PCP-Molekülen bestand. Allerdings

wurden auch diverse Di- und Triphenole detektiert. Diese könnten sehr wohl als alternativer Partner bei Aufbaureaktionen agieren. Aber die Mengen bewegten sich alle im ng/g-Bereich, und daraus konnte ferner kein OCDD resultieren, auf dem das Hauptaugenmerk lag, sondern nur niedriger chlorierte PCDD/Fs.

Für die Durchführung des Versuchs wurden die Böden „entsteint“ und homogenisiert, als komplette Charge mit der  $^{14}\text{C}$ -PCP-Lösung versetzt, 24 Stunden durchgemischt und auf einzelne Erlenmeyerkolben eingewogen. Zu festgesetzten Zeitpunkten wurden jeweils drei Kolben entnommen und die Proben zur Abstopfung aller Umsätze eingefroren. Dabei fiel bei einigen Proben auf, dass es trotz gründlicher Durchmischung zu einer Bildung von kleinen Klümpchen gekommen war. Insbesondere Boden 315-0106 I war davon betroffen. Ob dies vorher oder erst während der Versuchsdauer geschehen war, war nicht zu erkennen. Bei der Extraktion zeigten sich aber keine Abnormalitäten im Gesamtgehalt an Radioaktivität.

Aufgrund der großen zur Verfügung stehenden Menge an Probematerial wurde neben der Soxhletextraktion auch ein Accelerated Solvent Extractor benützt. Der Vergleich der Ergebnisse zeigte eine bessere Extraktion durch ASE, darum wurden für die weitere Aufbereitung die ASE-Extrakte benutzt (siehe 4.2.1).

Die ermittelten Daten zum Gehalt an extrahierbaren radioaktiven Substanzen ließen keinen klaren Trend über den Zeitraum erkennen. Weder eine Zunahme noch eine Abnahme lässt sich daraus begründet ableiten. Vielmehr schwanken die Werte um Mittelwerte von 30829 Bq/g (ASE Boden 315), 17314 Bq/g (Soxhlet Boden 315), 30879 Bq/g (Soxhlet Boden 690) und 44691 Bq/g (ASE Boden 690). Diese ergeben sich aus den Werten der einzelnen Probenahmetage. Die Werte der Probenahmetage wurden aus den drei Kolben pro Boden und pro Datum gemittelt. Die Abweichungen betragen dabei zwischen 5 und 16%. Nur bei Probe 316-0106 war eine größere Schwankungsbreite von 27% beobachtet worden. Dies belegt eine etwas

---

größere Ansammlung der markierten Substanz in Kolben 1, der dabei den größten Wert erzielte.

Auch hier wurde während des auf die Extraktion folgenden Clean-Ups Proben der verschiedenen Fraktionen genommen und vermessen. Die Werte zeigten ein ähnliches Verhalten wie bei den Organproben. Der Großanteil der Aktivität wurde bereits auf der Sandwichsäule zurückgehalten. Im weiteren Verlauf der Aufreinigung war die Aktivität nach der Aloxsäule sogar noch geringer als im Vergleich dazu bei den Organen. Einzig bei Boden 315 vom 1.6. war ein erhöhter Wert festzustellen. Dieser ist mit 33 Bq/ml zwar um das fast Zehnfache höher als die anderen Werte, ist aber absolut gesehen ebenfalls sehr niedrig. Multipliziert mit dem Gesamtvolumen von 200 ml ergibt sich ein Gesamtgehalt von 6600 Bq, was umgerechnet über die Ursprungsaktivität des PCP von 185 MBq/mmol einem Gehalt von 9,5 µg PCP entspräche.

Nach dem letzten Schritt, der Florisilsäule, wurde als höchster Wert nur noch ein Gehalt an 7 Bq/ml gemessen. Dies würde noch einen Gehalt an 3,02 µg PCP bedeuten.

Die aufgereinigten und auf wenige Mikroliter eingeeengten Proben wurden anschließend am GC-MS analysiert. Dabei fiel eine der Proben, der erste Kolben von 315-0106, deutlich aus dem bis dahin festgestellten Rahmen. Die weiteren zwei Referenzwerte vom gleichen Boden und Datum bestätigten diesen „Ausreißer“ nicht. Darauf wird im Anschluss eingegangen. Die Ergebnisse in folgender Tabelle berücksichtigen diesen Messwert nicht:

**Tab. 5.2-1 Markiertes OCDD in den Bodenproben in (pg/g TM)**

<i>Probe</i>	<i>M+6</i>	<i>M+8</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Abweichung</i>	<i>Prozentual</i>
315-0703	37	23	30	±7	23,3
315-1804	19	17	18	±1	5,5
315-0205	42	46	44	±2	4,5
315-0106	30	21	25	±4	16
690-0703	73	48	60	±12	20
690-1804	50	32	41	±9	21,9
690-0205	77	54	65	±11	16,9
690-0106	124	83	103	±20	19,4

In Bezug auf die vorgegebene Einsatzmenge an  $^{14}\text{C}$ -PCP und die statistische Verteilung auf die einzelnen Kolben von  $100,8 \mu\text{g/g TM}$  kann man Rückschlüsse auf den Umsatz ziehen. Es ergeben sich Werte zwischen  $0,18$  und  $1,03 \text{ ppm}$ .

Wie verhält es sich aber bei dem erhöhten Wert von 315-0106?

Rechnet man das Ergebnis um, kommt man auf  $3,04 \text{ ng/g TM}$  und entsprechend dazu zu einem Umsatz von  $30,2 \text{ ppm}$ . Hier wurde also ein mindestens dreißigfach höherer Wert gemessen als bei allen anderen Proben. Zum einen ist festzustellen, dass es sich um einen einzelnen Wert handelt, die parallel dazu eingefrorenen Proben vom 01.06. zeigen ein anderes Ergebnis. Andererseits spricht die Dokumentation der Aufarbeitung, die parallele Radioaktivitätsanalytik und die GC-MS-Messung gegen einen Fehler in der Durchführung oder der Messung. Im Gaschromatogramm war der  $^{13}\text{C}$ -Standard mit der zu erwartenden Signalstärke detektiert worden, auch das Signal-Rauschverhältnis spielt hier keine Rolle.

Außerdem war in diesem Fall eine stärker ausgeprägte Klümpchenbildung als bei den Parallelproben beobachtet worden. Dies könnte ein möglicher Erklärungsgrund sein. Im Inneren dieser Kügelchen kann es durch den erschwerten Zutritt von Sauerstoff zu speziellen aeroben/anaeroben Bedingungen gekommen sein, die eine Bildung an OCDD begünstigt haben. Ähnliche Ergebnisse wurden schon von (Klimm, 1996) berichtet. Dort lieferte ein Versuch mit Klärschlamm unter gemischt anaerob/aeroben Bedingungen ein von den Experimenten unter anaeroben oder aeroben Verhältnissen stark abweichende Ergebnisse. So konnte über einen Zeitraum von 192 Tagen eine deutliche Zunahme der OCDD-Gehalte von 72% beobachtet werden

Allerdings besteht auch die Möglichkeit einer ungleichen Verteilung auf die einzelnen Kolbenansätze. Dies kann trotz einer Durchmischungszeit von 24 Stunden nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dies könnte wegen der größeren Feuchtigkeit ein Grund für die Klümpchenbildung sein. Dagegen sprechen aber zum einen die relativ ausgewogenen Ergebnisse der Radioaktivitätsanalytik nach den Extraktionsverfahren. Hier würde man ein deutliches Ungleichgewicht im Verhältnis von 30:1 normalerweise beobachten können. Es wurde zwar bei Probe 315-0106 die größte Abweichung untereinander festgestellt, aber die Schwankungsbreite von 27% reicht nicht aus, einen um den Faktor 30 größeren OCDD-Gehalt zu erklären. Zum anderen liegt die Wahrscheinlichkeit für einen derartigen Ausreißer, legt man eine Normalverteilung der Aktivität auf die Kolben zugrunde, unter 1 Prozent. In diesem Fall würden sich dann auch die übrigen errechneten Umsatzraten verschieben und somit in Kolben 1 erniedrigen und in allen anderen Proben erhöhen, da sich in Kolben 1 ein größerer Anteil der Tracersubstanz befunden hätte.

Dieses Ergebnis spricht dafür, dass unter nicht strikt anaeroben bzw. aeroben Verhältnissen OCDD vermehrt gebildet werden kann. Möglicherweise existiert eine kritische Konzentration von Luftsauerstoff, über die hinaus

---

Bildungsreaktionen gehemmt werden, während eine höhere Konzentration z.B. eine Peroxidasetätigkeit ermöglicht, die den Bildungsmechanismen entgegen läuft. Bei einem Umsatz von 30 ppm könnte dies durchaus mit ein Grund für die gefundenen ungewöhnlichen Verteilungsmuster mit Dominanz an OCDD sein.

### 5.3 Biogene Bildung von PCDD/F - Ausblick

Aus den Untersuchungen dieser Arbeit an zwei unterschiedlichen biologischen Matrices geht hervor, daß die *de novo* Bildung von PCDD/F in biologischen Systemen möglich ist. Das Ausmaß der Bildung ist jedoch im Allgemeinen als gering zu betrachten, und bewegte sich in den Versuchen dieser Arbeit bis auf eine Ausnahme unter 1 ppm. Außerdem war dazu eine unnatürlich hohe Menge an der Vorläufersubstanz nötig, die zwar noch als untoxisch einzuschätzen ist, allerdings ohne besondere Einwirkung von außen so in der Natur nicht vorkommt.

Weiterhin kristallisierten sich zum Phänomen der Bildung von PCDD/F folgende Erkenntnisse heraus: Unter aeroben Verhältnissen wurde im Laborversuch die biogene Bildung aus der Vorläufersubstanz PCP in der Matrix Waldboden nachgewiesen. Die Ausbeuten erreichten im Laborversuch jedoch nur maximal 1 ppm, mit Ausnahme einer Probe mit 30 ppm, die als echtes Bildungsphänomen interpretiert werden könnte. Nicht vollständig aerobe Verhältnisse in den Bodenproben können eine entscheidende Voraussetzung für diese Bildung darstellen. Welche Bildungsreaktionen dabei von Bedeutung sind, bleibt zu klären.

Unter den Verhältnissen des Minipigversuchs konnte ebenfalls eine Bildung in kleinsten Spuren nachgewiesen werden. Allerdings war ein Rückbezug zur Bestimmung eines Umsatzes nicht möglich. Eine Gefährdung für den

---

Menschen lässt sich daraus nicht ableiten. Weitere Untersuchungen in Hinsicht auf das human-biologische System und mögliche Bildungsreaktionen im menschlichen Organismus wären zwar wünschenswert, jedoch nach den Ergebnissen dieser Arbeit nicht besonders dringlich. Da aber das Verdauungssystem der Minipigs nur eine Annäherung an die menschliche Verdauung darstellt, wäre ein eindeutiger Beweis nur im Humanversuch möglich.

Hieraus ergeben sich weitere Fragestellungen für zukünftige Forschungen. Zur biogenen Bildung erscheinen zunächst Versuche mit anderen Vorläufersubstanzen und weiteren Matrices sinnvoll, um diejenigen mit hohem PCDD/F-Bildungspotential zu selektieren und maximale Bildungsausmaße quantifizieren zu können. Erst danach sollten detaillierte Untersuchungen zu Bildungsmechanismen im Labormaßstab folgen.

Entscheidend für die PCDD/F-Bildung könnten Milieuübergänge von aerob zu anaerob sein. Denn wie die abweichenden Ergebnisse im speziellen Fall von 315-0106 vermuten lassen, könnte ein spezifischer Sauerstoffanteil förderlich für die Bildung von PCDD/F sein.

Milieuübergänge von aerob zu anaerob kommen unter natürlichen Bedingungen in Sedimenten vor und bilden dort ideale Voraussetzungen für komplexe, metabolisch voneinander abhängige mikrobielle Mikroorganismengemeinschaften (synthrophe Kooperationen, (Schink, 1992)). Im Bereich der Abwassertechnik spielen derartige Grenzflächensysteme in Kanalisationssystemen und unkontrollierten Klärprozessen eine wichtige Rolle.

Aerob/anaerobe Bedingungen in Grenzflächen sind auch unter dem Aspekt der Dominanz der höherchlorierten PCDD in Homologenmustern von Klärschlämmen (Klimm, 1996) und Sedimenten (Götz, 1989) von besonderem Interesse. Weitere Untersuchungen könnten den Aufklärungsbedarf hierzu decken und das Verständnis der noch unbekanntem Vorgänge fördern.

## 6 Zusammenfassung

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von potentieller PCDD/F-Neubildung in biologischen Systemen. Vermehrt wurde in verschiedenen Studien bei Untersuchungen über PCDD/F auf ungeklärte PCDD/F-Verteilungsmuster mit erhöhten Anteilen an OCDD hingewiesen. Aufgrund dieser Tatsache und der nahen chemischen Verwandtheit zu HCB wurde PCP als potentielle Vorläufersubstanz ausgewählt.

Zur besseren Verfolgbarkeit, Quantifizierung und Unterscheidung von nativem, bereits vorhandenem OCDD wurde die Tracermethode verwendet. Dazu wurde im Vorfeld das PCP, einfach mit dem Betastrahler Kohlenstoff 14 substituiert, synthetisiert. Im weiteren Verlauf wurden die verschiedenen Proben mit Szintillationszählung und GC-MS-Technik bestimmt.

Als biologische Matrices kamen Göttingen Minipigs und Waldbodenstreuauflagen aus Bayern zum Einsatz. Diese wurden aufgrund der eingangs erwähnten Gründe ausgewählt und über einen Zeitraum von 1 bzw. 3 Monaten der Einwirkung des markierten PCP ausgesetzt.

Die Radioaktivität konnte in den verschiedenen Phasen des Versuch verfolgt werden und lieferte eine Bilanz über den Verbleib der Tracersubstanz. Die genaue Auswertung auf den Gehalt an OCDD erfolgte mit GC-MS.

In den Minipigversuchen wurde die biogene Bildung von OCDD aus der Vorläufersubstanz PCP bestätigt und der Bildungsumfang quantifiziert. Dieser bewegt sich im ppb-Bereich und kann als für den Menschen und als mögliche Ursache für die Dominanz von OCDD in Verteilungsmustern anderer Studien nur von geringfügiger Bedeutung eingestuft werden.

Bei der Behandlung von Waldbodenstreuauflagen mit PCP nahm die Konzentration der extrahierbaren lipophilen chlororganischen Verbindungen in allen Fällen über den Zeitraum von drei Monaten einen gleichbleibenden Verlauf. Eine Zunahme oder Abnahme konnte nicht beobachtet werden.

Auch hier konnte eine Bildung von OCDD beobachtet werden. Die Umsatzmenge erreichte im Maximum einen Wert von 1,03 ppm, bezogen auf die eingesetzte Menge an PCP pro Gramm Bodenprobe.

Einer der Messwerte zeigte eine starke Zunahme an OCDD gegenüber den anderen Proben. Diese Zunahme lässt auf echte Bildungsprozesse schließen. Als mögliche Ursache wurden durch Klümpchenbildung hervorgerufene aerobe/anaerobe Bedingungen, wie sie in den anderen Proben nicht vorkamen, genannt. Die Aussagekraft eines einzelnen Wertes ist allerdings zu diskutieren.

Die vorliegende Arbeit demonstriert in ihren Untersuchungen die Möglichkeit für die biogene PCDD/F-Bildung. Weitere (bio)chemische Untersuchungen sollten in diesem Zusammenhang insbesondere im Hinblick auf die Vorgänge in Waldböden und Sedimenten folgen. Ein eindeutiger Beweis für die Ursache der mehrfach erwähnten ungewöhnlichen Dominanz von OCDD in verschiedenen Proben konnte allerdings nicht erbracht werden.

## 7 Summary

Main objective of this study was the examination of the potential formation of PCDD/F in biological systems. There has been an increasing number of studies about dioxins which reported anomalous distribution patterns of PCDD/Fs with increased portions of OCDD. Because of these facts and the close chemical relationship to HCB the choice for the potential precursor substance fell on PCP.

The tracer method was used to increase traceability and for better quantification and differentiation from native OCDD. The PCP was synthesized with the beta radiator Carbon 14 as a single substitutor in advance. The different samples were analyzed using scintillation and GC-MS method.

The biological matrices were Göttingen Minipigs and forest soil and litter samples from Bavaria. These samples were chosen for different reasons, mentioned before, and incubated with the tracer substance PCP for a period of one and three months.

The radioactivity could be monitored in the different phases of the experiment and delivered data about the whereabouts of the tracer substance. The exact OCDD contents were determined with GC-MS.

The biogene formation of OCDD from the precursor PCP could be confirmed in the minipig experiments and the amount was quantified. The results yielded transformation rates in the lower part per billion ranges. This is of next to no impact on humans and can only be a minor reason for the distribution patterns with domination of OCDD reported in other studies.

The concentration of the extractable lipophile chloroorganic substances took a stable course during the treatment of the soil samples with PCP in all cases

over a period of three months. Neither an increase nor a decrease could be observed.

Likewise to the minipig experiment a formation of OCDD could be proven. The transformation rate reached a maximum of 1,03 parts per million, in relation to the applied amount of PCP per gram soil sample.

One of the measurement values showed a strong increase in OCDD compared to the other samples. This could point to a real formation process. Possible reasons could be special aerobic/anaerobic conditions through agglutination, which did not appear in other samples. The validity of a single measure is to be discussed at any rate.

This study demonstrates in its experiments the possibility for the biogene formation of PCDD/Fs. Further (bio)chemical examinations should be done in this connection with special emphasis on the processes in soil and sediments.

A definite and clear evidence for the reason behind the unusual dominance of OCDD in different PCDD/F-distribution samples mentioned in several places could not be proven in this work.

## 8 Literatur

- (1) (BUA), Beratergremium für Umweltrelevante Altstoffe: *Pentachlorphenol. BUA-Stoffbericht*; VCH: Weinheim, **1985**.
- (2) (HBM), Kommission "Human-Biomonitoring" des Umweltbundesamtes: *Stoffmonographie Pentachlorphenol – Referenz- und Human-Biomonitoring-Werte*, In *Bundesgesundheitsblatt*, **1997**; Vol. 40.
- (3) (UBA), Umweltbundesamt: *Schwerpunkte der Umweltprobenbank – Ausgewählte Ergebnisse; 2.ChemikalienVerbotsverordnung; Pentachlorphenol im Blutplasma; 1985-1988*.
- (4) (UBA), Umweltbundesamt: *Zusammenfassende Darstellung des Standes des Wissens und der einschlägigen Regelungen*, In *Umweltchemikalie Pentachlorphenol, Umweltforschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Forschungsbericht 106 04 007, UBA-FB 83-009*; Umweltbundesamt, Ed.; Erich Schmidt Verlag: Berlin, **1987**, 185-228.
- (5) (WHO), World Health Organisation: *“Environmental health criteria 71: pentachlorophenol”* , **1987**.
- (6) (WHO), World Health Organisation: *WHO experts re-evaluate health risks from Dioxins*, press release WHO/45, **1998**.
- (7) VDI-Richtlinie 3499: *Messen von polychlorierten Dibenzo(p)dioxinen (PCDD) und Dibenzofuranen (PCDF) in Abgasen industrieller Anlagen und Feuerungsanlagen...*, In: *VDI-Handbuch Reinhaltung der Luft* ; VDI-Kommission Reinhaltung der Luft, Ed., **1992**; Vol. Band 5.

- 
- (8) Addink, R., Olie, K.: *Mechanisms of Formation and Destruction of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans in Heterogeneous Systems*; Environ. Sci. Technol.; **1995**, 29, 1425-1435.
- (9) Ahlborg, G. U., Thunberg, T.M.: *Chlorinated phenols: occurrence, toxicity, metabolism, and environmental impact*; CRC Crit. Rev. Toxicol.; **1980**, 7, 1-35.
- (10) Ahlborg, U. G., Becking, G.C., Birnbaum, L.S., Brouwer, A., Derks, H.J.G.M., Feeley, M., Golor, G., Hanberg, A., Larsen, J.C., Liem, A.K.D., Safe, S.H., Schlatter, C., Wærn, F., Younes, M., Yrjänheikki, E.: *Toxic Equivalency Factors for Dioxin-like PCBs*; Chemosphere; **1994**, 28, 1049-1067.
- (11) Barkovskii, A. L., Adriaens, P.: *Reductive Dechlorination of Tetrachloro-Dibenzo-p-Dioxin Partitioned from Passaic River Sediments in an Autochthonous Microbial Community*; Dioxin, Edmonton, **1995**; 24, 17-21.
- (12) Braun, W. H., Blau, G.E., Chenoweth, M.B.: *The metabolism/pharmacokinetics of pentachlorophenol in man, and a comparison with the rat and monkey*, In *Toxicology and occupational medicine*; Deichmann, W. B., Ed.; Elsevier: New York, **1979**, 289-296.
- (13) Bumpus, J. A., Tien, M., Wright, D., Aust., S.D.: *Oxidation of Persistent Environmental Pollutants by a White Rot Fungus*; Science; **1985**, 228, 1434-1436.
- (14) Cikryt, P.: *Die Gefährdung des Menschen durch Dioxin und verwandte Verbindungen*; Nachr. Chem. Tech. Lab.; **1991**, 39, 648-656.

- 
- (15) Crosby, D. G.: *IUPAC reports on pesticides (14): Environmental chemistry of pentachlorophenol*; Pure Appl. Chem.; **1981**, 53, 1051-1080.
- (16) Drotleff, J., Flutwedel, A., Pohle, H., Spilok, K.: *Handbuch Chlorchemie II - Ausgewählte Produktlinien*; Texte Umweltbundesamt, **1992**, 42/92.
- (17) ECDIN , *Datenbankabfrage Pentachlorphenol*, **1989**.
- (18) Engelhardt, G., Wallnöfer P.R., Mücke W., Renner G.: *Transformations of pentachlorophenol, Part II: Transformations under environmental conditions*; Toxicol. Environ. Chem.; **1986**, 11, 233-252.
- (19) Fathepure, B. Z., Tiedje, J.M., Boyd, S.A.: *Reductive Dechlorination of Hexachlorbenzene to Tri- and Dichlorbenzenes in Anaerobic Sewage Sludge*; Appl. Environ. Microbiol.; **1988**, 54, 327-330.
- (20) Fränzle, O. et al.: "Modellversuche über die Passage von Umweltchemikalien und ihrer Metabolite durch die ungesättigte Zone natürlicher Bodenprofile sowie durch Bodenschlämme in Laborlysometern und im Freiland" Umweltforschungsplan des Bundesministers des Innern, **1982**.
- (21) Fränzle, O.: *Die Bestimmung von Bodenparametern zur Vorhersage der potentiellen Schadwirkung von Umweltchemikalien*; Angew. Botanik; **1984**, 58, 207-216.
- (22) Fries, G. F.: *Assessment of Potential Residues in Foods Derived from Animals Exposed to TCDD-Contaminated Soils*; Chemosphere; **1987**, 16, 2123-2128.

- (23) Fries, G., Paustenbach, D., Luksemburg, W., Lorber, M., Ferrario, J.: *The Formation of Hepta- and Octa-Dioxins in Feces of Cows fed Pentachlorophenol treated Wood*; Dioxin, Monterey, **2000**, 46.
- (24) Gadomski, D., Golden, E., Irvine, R.L., Talley, J.W., Hundal, L.S.: *Natural Formation of Dioxins: A review of trends among four sites*; Dioxin, Barcelona, **2002**; 59, 263-266.
- (25) Gallati, H.: *Peroxidase aus Meerrettich: Kinetik und Optimierung der Aktivitätsbestimmung mit ABTS*; J. Clin. Chem. Clin. Biochem.; **1979**, 17, 1-7.
- (26) Gaus, C., Pöpke, O., Brunskill, G.J., Müller, J.F.: *Historical PCDD/F Records in Dated Marine Sediment Cores from Queensland, Australia*; Dioxin, Monterey, **2000**; 46, 15-18.
- (27) Gaus, C., Prange, J.A., Connell, D.W., Brunskill, G.J., Pöpke, O., Müller, J.F., Weber, R.: *Transformation of dioxins in environmental sinks - formation of the distinctive "natural PCDD signature"*; Dioxin, Barcelona, **2002**; 57, 463-466.
- (28) Gaus, C., Prange, J.A., Pöpke, O., Müller, J.W., Weber, R.: *An alternative hypothesis to natural PCDD formation*; Dioxin, Barcelona, **2002**; 59, 243-246.
- (29) Gebefügi, I., Parlar, H.: *"Zur Risikoabschätzung von Pentachlorphenol in der Umwelt"* Gesellsch. für Strahlen- und Umweltforschung mbH, **1978**.
- (30) Gühr, R., Klöpffer, W., Rippen, G., Partsch, H., Stoll, U., Müller, J.: *Die Herkunft von polychlorierten Dibenzop-dioxinen (PCDD) und Dibenzofuranen (PCDF) bei der Grundbelastung von kommunalen Klärschlämmen*; Korrespondenz Abwasser; **1991**, 38, 802-805.

- (31) Götz, R.: *Mögliche Ursachen der Belastung von Gewässersedimenten mit polychlorierten Dibenzodioxinen (PCDDs) und polychlorierten Dibenzofuranen (PCDFs)*; Vom Wasser; **1989**, 73, 457-481.
- (32) Green, N. J., Alock, R.E., Johnston, A.E., Jones, K.C.: *Are There Natural Dioxins? Evidence from deep soil samples*; Dioxin, Monterey, **2000**; 46, 12-14.
- (33) Grimm, H.-G.: *Pentachlorphenol-Konzentrationen in menschlichen Geweben und Körperflüssigkeiten*, In *Umweltchemikalie Pentachlorphenol, Umweltforschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Forschungsbericht 106 04 007, UBA-FB 83-009*; Umweltbundesamt, Ed.; Erich Schmidt Verlag; Berlin, **1987**.
- (34) Hagenmaier, H., Brunner, H., Haag, R., Kunzendorf, H.-J., Kraft, M., Tichaczek, K., Weberruß, U.: *VDI-Berichte 634*; VDI-Verlag; Düsseldorf, **1987**, 61-90.
- (35) Hagenmaier, H., Brunner, H., Knapp, W., Weberruß, U.: *„Untersuchungen der Gehalte an polychlorierten Dibenzodioxinen, polychlorierten Dibenzofuranen und ausgewählten Chlorkohlenwasserstoffen in Klärschlämmen“* UBA FB 103 03 305, **1988**.
- (36) Hayward, D. G., Nortrup, D., Gardner, A., Clower Jr., M.: *Elevated TCDD in Chicken Eggs and Farm-Raised Catfish Fed a Diet with BallClay from a Southern United States Mine*; Environmental Research; **1999**, 81, 248-256.
- (37) Heinisch, E., Schieferdecker, H.: *Zur ökotoxikologischen Einschätzung des Eintrages von Fremdstoffen in die Ökosphäre*; Nachrichten Mensch Umwelt; **1983**, 11.

- 
- (38) Henkelmann, B., Schramm, K.-W., Klimm, C., Kettrup, A.: *Quality Criteria for the Isotope Dilution Method with HRGC/MS*; Fresenius J. Anal. Chem.; **1996**, 354, 818-822.
- (39) Hoekstra, E. J., de Weerd, H., de Leer, E.W.B., Brinkman, U.A.Th.: *Natural Formation of Chlorinated Phenols, Dibenzo-P-Dioxins and Dibenzofurans in Soil of a Douglas Fir Forest*; Dioxin, Monterey, **2000**; 46, 5-8.
- (40) Horstmann, M.: *Untersuchungen zu nicht-industriellen PCDD/F-Quellen in einem kommunalen Entwässerungssystem*; Universität Bayreuth, **1994**.
- (41) Hulpke, H., Koch, H.A., Wagner, R.: *Römpp Lexikon Umwelt*; Thieme Verlag, **1993**.
- (42) Hutzinger, O., Fiedler, H.: *From Source to Exposure: Some Open Questions*; Dioxin, Helsinki, **1992**; 9, 1-4.
- (43) Kaune, A., Fiedler, H., Hutzinger, O.: *Dioxine und Furane - Quellen, Einträge in die Umwelt und Aufnahme durch den Menschen (Literaturstudie)*; Umweltbehörde Hamburg, Ed., **1990**.
- (44) Klein, W., Scheunert, I.: *Biotransformation Processes, In Appraisal of Tests to Predict the Environmental Behaviour of Chemicals*; Sheehan, P., Korte, F., Klein, W., Bourdeau, P., Ed.; Wiley:, **1985**.
- (45) Klimm, C.: *Polychlorierte Dibenzo-p-dioxine, Dibenzofurane, Biphenyle und Hexachlorbenzol im Belebungs- und Faulungsprozeß kommunaler Kläranlagen*, Technische Universität München, **1996**.

- (46) Klimm, C., Schramm, K.-W., Henkelmann, B., Martens, D., Kettrup, A.: *Formation of Octa- and Heptachlorodibenzo-p-dioxins during semi anaerobic digestion of sewage sludge*; Chemosphere; **1998**, 37, 2003-2011.
- (47) Kocan A., P. J., Chovancová J., Drobná B.: *Method for the Group Separation of Non-ortho-, Mono-ortho- and Multi-ortho-Substituted Polychlorinated Biphenyls and Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins/Polychlorinated Dibenzofurans Using Activated Carbon Chromatography*; J. Chromatogr. A.; **1994**, 665, 139-153.
- (48) Landers, J. P., Bunce, N.J.: *The Ah Receptor and the Mechanism of Dioxin Toxicity. Review Article*; Biochem. J.; **1991**, 276, 273-287.
- (49) Lenoir, D., Fiedler, H.: *Bildungswege für chlorierte Dibenzo-p-dioxine und -furane bei der Abfallverbrennung*; UWSF. - Z. Umweltchem. Ökotox.; **1992**, 4, 157-163.
- (50) Letzel, S. et al.: *Pentachlorophenol-Belastung in Deutschland*; Umweltmed. Forsch. Prax.; **1996**, 1, 138-142.
- (51) Libby, D. R., Thomas, J.A., Kaiser, L.W., Hager, L.P.: *Chloroperoxidase Halogenation Reactions*; J. Biol. Chem.; **1981**, 257, 5030-5037.
- (52) Lu, P.-Y., Metcalf R.L., Cole L.K.: *The environmental fate of 14C-pentachlorophenol in laboratory model ecosystems*, In *Pentachlorophenol: chemistry, pharmacology, and environmental toxicology*; Rao, K. R., Ed.; Plenum Press: New York, London, **1978**, 53-63.

- (53) Maloney, S. W., Manem, J., Mallevalle, J., Flessinger, F.: *Transformation of Trace Organic Compounds in Drinking Water by Enzymatic Oxidative Coupling*; Environ. Sci. Technol.; **1986**, 20, 249-253.
- (54) Meharg, A. A., Killham, K.: *A pre-industrial source for dioxins and furans*; Nature; **2003**, 421, 909-910.
- (55) Miller, G. C., Hebert, V.R., Mille, M.J., Mitzel, R., Zepp, R.G.: *Photolysis of Octachlorodibenzo-p-dioxin on Soils: Production of 2,3,7,8-TCDD*; Chemosphere; **1989**, 18, 1265-1274.
- (56) Munder, A., Buchert, H., Niemczyk, R., Swerev, M., Ballschmiter, K.: *Determination of PCDD/PCDF in Motor Oil and Air Particulates. A Modular Approach in Clean-up*; Fresenius Z. Anal. Chem.; **1987**, 328, 639-643.
- (57) NATO/CCMS: *“International Toxicity Equivalency Factor (I-TEF) Method of Risk Assessment for Complex Mixtures of Dioxins and Related Compounds. Pilot Study on International Information Exchange on Dioxins and Related Compounds”* North Atlantic Treaty Organization, Committee on the Challenges of Modern Society, **1988**.
- (58) Neubert, D.: *Möglichkeiten und Methoden der quantitativen Risikoabschätzung*, In *Lehrbuch der Toxikologie*; Marquardt, H., Schäfer, S.G., Ed.; BI-Wiss.-Verl., **1994**, 893-894.
- (59) Nilsson: *Studies of Polychlorinated 2-Phenoxyphenols Precursors of Chlorinated Dibenzo-p-dioxins*, Universität Umea, **1977**.

- 
- (60) Okeke, B. C., Paterson, A., Smith, J. E., Watson-Craik, I. A.: *Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid substrate cultures of Lentinula edodes*; Appl. Microbiol. Biotechnol.; **1997**, 48, 563-569.
- (61) Öberg, T., Bergström, J.T.G.: *Hexachlorbenzene As an Indicator of Dioxin Production from Combustion*; Chemosphere; **1985**, 14, 1081-1086.
- (62) Öberg, L. G., Glas, B., Swanson, S.E., Rappe, C., Paul, K.G.: *Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Chlorophenols to Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans*; Arch. Environ. Contam. Toxicol.; **1990**, 19, 930-938.
- (63) Öberg, L. G., Andersson, R., Rappe, C.: *De novo Formation of Hepta- and Octachlorodibenzo-p-dioxins from Pentachlorophenol in Municipal Sewage Sludge*; Dioxin, Tampere, **1992**; 9, 351-354.
- (64) Öberg, L. G., Rappe, C.: *Biochemical Formation of PCDD/Fs from Chlorophenols*; Chemosphere; **1992**, 25, 49-52.
- (65) Öberg, L. G., Wågman, N., Andersson, R., Rappe, C.: *De novo Formation of PCDD/Fs in Compost and Sewage Sludge - A Status Report*; Dioxin, Wien, **1993**; 11, 297-302.
- (66) Prange, J. A., Gaus, A., Pöpke, O., Weber, R., Müller, J.F.: *Vertical distribution of PCDD/Fs in forest soil from Queensland, Australia*; Dioxin, Barcelona, **2002**; 59, 251-254.
- (67) Prange, J. A., Gaus, C., Weber, R., Pöpke, O., Müller, J.F.: *Are forest fires a source of PCDD/Fs in Queensland, Australia?*; Dioxin, Boston MA, **2003**, 60-65.

- (68) Pütter, J., Becker, R.: *Peroxidases*, In *Methods of Enzymatic Analysis, 3rd Edition*; Bergmeyer, H. U., Ed.; Chemie Verlag: Weinheim, **1983**; Vol. 3, 725-729.
- (69) Rappe, C.: *Sources of Exposure, Environmental Levels and Exposure Assessment of PCDDs and PCDFs.*; Dioxin, Helsinki, **1992**; 9, 5-8.
- (70) Rappe, C., Andersson, R.: *Concentrations of PCDDs in Ball Clay and Kaolin*; Dioxin, Monterey, **2000**; 46, 9-11.
- (71) Rappe, C., Andersson, R., Cooper, K., Bopp, R., Fiedler, H., Howell, F., Bonner, M.: *PCDDs in Naturally-Formed and Man-Made Lake Sediment Cores from Southern Mississippi, USA*; Dioxin, Monterey, **2000**; 46, 19-21.
- (72) Renner, G., Mücke, W.: *Transformation of pentachlorophenol*; Toxicol. Environ. Chem.; **1986**, 11, 9-29.
- (73) Rippen, G.: *Handbuch Umweltchemikalien. Stoffdaten HCB*; Ecomed Verlag: Landsberg, **1994**.
- (74) Rippen, G.: *Handbuch der Umweltchemikalien, Physikalisch-chemische und ökotoxikologische Daten ausgewählter chemischer Stoffe*; Ecomed-Verlagsgesellschaft: Landsberg, München, **1995**.
- (75) Rosner, G.: *Gesundheitsgefährdung durch PCP und PCP-spezifische Dioxine*; Staub - Reinhalt. Luft; **1987**, 47, 198-203.
- (76) Safe, S.: *Polychlorinated Biphenyls (PCBs), Dibenzo-p-dioxins (PCDDs), Dibenzofurans (PCDFs), and Related Compounds: Environmental and Mechanistic Considerations which Support the Development of Toxic Equivalency Factors (TEFs)*; CRC Crit. Rev. Toxicol.; **1990**, 21, 51-88.

- 
- (77) Sagunski, H., Perger, G.: *Biozide*, In *Lehrbuch der Toxikologie*; Marquardt, H., Schäfer, S.G., Ed.; BI-Wiss.-Verl.; **1994**, 439-460.
- (78) Sandrock, K., Attar, A., Bieniek, D., Klein, W., Korte, F.: *Synthese <sup>14</sup>C-markierter Umweltchemikalien*; *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*; **1978**, 14, 197-204.
- (79) Schink, B.: *Syntropism among Prokaryotes*, In *The Prokaryotes*; 2 ed.; Balows, A., et al., Ed.; Springer Verlag; **1992**, 276-299.
- (80) Schlatter, C., Poiger, H.: *Chlorierte Dibenzodioxine und Dibenzofurane (PCDDs/PCDFs) - Belastung und gesundheitliche Beurteilung*; *Z. Umweltchem. Ökotox*; **1989**, 2, 11-18.
- (81) Schramm, K.-W., Klimm, C., Henkelmann, B., Kettrup, A.: *Untersuchungen von polychlorierten Dibenzop-dioxinen und Dibenzofuranen (PCDD/F) in zeitlich vergleichbaren Schlämmen verschiedener Prozeßstufen einer kommunalen Kläranlage*; *Vom Wasser*; **1995**, 84, 131-141.
- (82) Svenson, A., Kjeller, L-O., Rappe, C.: *Enzyme-Mediated Formation of 2,3,7,8-Tetrasubstituted Chlorinated Dibenzodioxins and Dibenzofurans*; *Environ. Sci. Technol.*; **1989**, 23, 900-902.
- (83) Thielen, D. R., Olson, G.: *Optimization of Alumina Selectivity for Tetrachlordibenzo-p-dioxins and the Isomer-Specific Determination of 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin*; *Anal. Chem.*; **1988**, 60, 1332-1336.
- (84) Uhl, S., Schmid, P., Schlatter, C.: *Pentachlorophenol in man*; *Arch. Toxicol.*; **1986**, 58, 182-186.

(85) Wagner, H.-C.: *Bildung von polychlorierten Dibenzo-p-dioxinen und Dibenzofuranen mittels verschiedener Peroxidasesysteme*, Universität Bayreuth, **1990**.

(86) Weber, H., Disse, G., Hamann, R., Haupt, H.-J.: *Influence of the Aerobic and Anaerobic Digestion on the Levels of Chlorinated Dibenzofurans and Dibenzodioxins in Sewage Sludge*; *Dioxin*, Edmonton, **1995**; 24, 81-85.

(87) Wittsiepe, J., Kullmann, Y., Schrey, P., Wilhelm, M., Selenka, F. ; *Dioxin*, **1998**; 36, 351.

(88) Wittsiepe, J., Kullmann, Y., Schrey, P., Selenka, F., Wilhem, M.: *Myeloperoxidase-catalyzed formations of PCDD/F from Chlorophenols*; *Chemosphere*; **2000**, 40, 963-968.

(89) Young, A. L.: *Long Term Studies on the Persistence and Movement of TCDD in a National Ecosystem*, In *Human and Environmental Risks of Chlorinated Dioxins and Related Compounds*; Tucker, A., Ed.; Plenum Press: New York, **1983**.

## 9 Anhang

Verlauf der PCP-Aufreinigung gemessen anhand der Radioaktivität der Wasserphase:

<i>PCP-Aufreinigung</i>			
Schritte	(dpm)	(Bq)	(pg/ $\mu$ l)
0	205154	3419	4920,8
4	3836	64	92
8	4984	83	119,5
12	1158	19	27,8
20	1631	27	39,1
25	710	12	17
30	68	1	1,6

GC-MS-Werte der Dioxinanalysen:

M/z	<i>690-0106</i>		<i>690-0703</i>		
	<sup>14</sup> C	<sup>13</sup> C	M/z	<sup>14</sup> C	<sup>13</sup> C
457,744	193874		457,744	113006	
459,747	225917		459,747	130896	
461,744	142783		461,744	82528	
463,741	54200		463,741	32675	
465,738	14411		465,738	8623	
467,735	3698		467,735	2145	
469,778		327392	469,778		329889
471,775		361947	471,775		367001
473,772		227947	473,772		230271
475,769		86845	475,769		88172

	<i>315-0106 I</i>		<i>315-0703</i>		
M/z	<sup>14</sup> C	<sup>13</sup> C	M/z	<sup>14</sup> C	<sup>13</sup> C
457,744	4247343		457,744	61120	
459,747	4813901		459,747	67297	
461,744	3134960		461,744	42193	
463,741	1341219		463,741	16741	
465,738	380904		465,738	4613	
467,735	92104		467,735	1080	
469,778		281225	469,778		344755
471,775		316513	471,775		384353
473,772		199533	473,772		242703
475,769		76610	475,769		91511

	<i>315-1804</i>		<i>690-1804</i>		
M/z	<sup>14</sup> C	<sup>13</sup> C	M/z	<sup>14</sup> C	<sup>13</sup> C
457,744	62409		457,744	178694	
459,747	69439		459,747	201767	
461,744	42938		461,744	127252	
463,741	17240		463,741	49168	
465,738	4050		465,738	11895	
467,735	1410		467,735	2941	
469,778		597135	469,778		664479
471,775		671709	471,775		751782
473,772		416726	473,772		466067
475,769		158704	475,769		178906

	315-0205		690-0205		
M/z	<sup>14</sup> C	<sup>13</sup> C	M/z	<sup>14</sup> C	<sup>13</sup> C
457,744	43953		457,744	51368	
459,747	47143		459,747	58297	
461,744	30156		461,744	36191	
463,741	11684		463,741	13913	
465,738	3113		465,738	3926	
467,735	623		467,735	496	
469,778		421328	469,778		289663
471,775		467046	471,775		321094
473,772		290821	473,772		199939
475,769		105451	475,769		72498

	315-0106 II		315-0106 III		
M/z	<sup>14</sup> C	<sup>13</sup> C	M/z	<sup>14</sup> C	<sup>13</sup> C
457,744	98350		457,744	65768	
459,747	115508		459,747	75817	
461,744	72895		461,744	46489	
463,741	27711		463,741	19133	
465,738	7040		465,738	5120	
467,735	1898		467,735	1560	
469,778		642403	469,778		563771
471,775		724978	471,775		638205
473,772		462025	473,772		396734
475,769		178217	475,769		155112

	<i>Leber A</i>		<i>BSP A</i>		
M/z	<sup>14</sup> C	<sup>13</sup> C	M/z	<sup>14</sup> C	<sup>13</sup> C
457,744	23462		457,744	32465	
459,747	26002		459,747	36267	
461,744	16608		461,744	23418	
463,741	6677		463,741	9456	
465,738	1896		465,738	2832	
467,735	490		467,735	694	
469,778		165320	469,778		198434
471,775		180877	471,775		223580
473,772		111410	473,772		136968
475,769		40521	475,769		51129

	<i>Lunge A</i>		<i>Milz B</i>		
M/z	<sup>14</sup> C	<sup>13</sup> C	M/z	<sup>14</sup> C	<sup>13</sup> C
457,744	42981		457,744	23617	
459,747	48142		459,747	27968	
461,744	30330		461,744	18092	
463,741	12615		463,741	6671	
465,738	3639		465,738	2057	
467,735	1066		467,735	563	
469,778		263330	469,778		228975
471,775		291904	471,775		256074
473,772		181763	473,772		158087
475,769		65907	475,769		56920

---

<i>Leber B</i>		
M/z	<sup>14</sup> C	<sup>13</sup> C
457,744	44928	
459,747	51171	
461,744	32043	
463,741	12667	
465,738	3843	
467,735	939	
469,778		180725
471,775		205713
473,772		124267
475,769		47453

---

## Aktivitätsgehalt der Urinproben:

	<i>Minipig A</i>			
	(dpm/5ml)	Urin (l)	Bq-gesamt	(Bq/ml)
11.05.01	243,8	2	1625,3	0,8
12.05.01	fehlt	>10	fehlt	Fehlt
13.05.01	3069,9	1,1	11256,3	10,2
14.05.01	1987	1,7	11259,7	6,6
15.05.01	2398,3	2,6	20785,3	8,0
16.05.01	3105,1	1,9	19665,6	10,4
17.05.01	1558,1	3,1	16100,4	5,2
18.05.01	1801,7	2,5	15014,2	6,0
19.05.01	2837,5	2,8	26483,3	9,5
20.05.01	2765	1,9	17511,7	9,2
21.05.01	3267,8	2,2	23963,9	10,9
22.05.01	2908,2	2,2	21326,8	9,7
23.05.01	2220,2	3,9	28862,6	7,4
24.05.01	3703,1	2,6	32093,5	12,3
25.05.01	4586,5	2,2	33634,3	15,3
26.05.01	5917,1	2,1	41419,7	19,7
27.05.01	4901,8	3	49018,0	16,3
28.05.01	7546,1	2	50307,3	25,2
29.05.01	3807,4	3,3	41881,4	12,7
30.05.01	2602,4	4,2	36433,6	8,7
31.05.01	3082,6	3,9	40073,8	10,3
01.06.01	3746,8	3,5	43712,7	12,5
02.06.01	5805,3	3,2	61923,2	19,4
03.06.01	6360,4	2,7	57243,6	21,2
04.06.01	7866,8	2,2	57689,9	26,2
05.06.01	5787,2	3,2	61730,1	19,3
06.06.01	4847,7	3,7	59788,3	16,2
		Summe:	880804,5	

	<i>Minipig B</i>			
	(dpm/5ml)	Urin (l)	Bq-gesamt	(Bq/ml)
11.05.01	293,3	2	1955,3	1,0
12.05.01	fehlt	>10	fehlt	fehlt
13.05.01	1286	3,4	14574,7	4,3
14.05.01	758	3,3	8338,0	2,5
15.05.01	1271,7	4,2	17803,8	4,2
16.05.01	1525	2,9	14741,7	5,1
17.05.01	1184,2	4,1	16184,1	3,9
18.05.01	1266,7	4	16889,3	4,2
19.05.01	2524	3,9	32812,0	8,4
20.05.01	2024,9	5	33748,3	6,7
21.05.01	1647,9	4,6	25267,8	5,5
22.05.01	1618,9	4,5	24283,5	5,4
23.05.01	1345,5	4,5	20182,5	4,5
24.05.01	2176,1	5,4	39169,8	7,3
25.05.01	3536,5	4,3	50689,8	11,8
26.05.01	3448,8	4,5	51732,0	11,5
27.05.01	3817,8	4,9	62357,4	12,7
28.05.01	2405,2	4,5	36078,0	8,0
29.05.01	3027,2	5,2	52471,5	10,1
30.05.01	3139,2	4,5	47088,0	10,5
31.05.01	3070,3	5,3	54242,0	10,2
01.06.01	4364,4	4,3	62556,4	14,5
02.06.01	5113,7	4,7	80114,6	17,0
03.06.01	4674	3,6	56088,0	15,6
04.06.01	fehlt	unbekannt	fehlt	fehlt
05.06.01	5214	5,1	88638,0	17,4
06.06.01	4345,3	5,4	78215,4	14,5
		Summe:	986221,9	

## Aktivitätsgehalt der Fecesproben:

<i>Minipig A</i>	<i>Minipig B</i>				
	(dpm/mg) (Bq/g)		(dpm/mg) (Bq/g)		
11.05.01	0,76	13	11.05.01	0,18	3
12.05.01	3,17	53	12.05.01	1,71	29
13.05.01	2,88	48	13.05.01	1,80	30
14.05.01	3,40	57	14.05.01	1,93	32
15.05.01	2,36	39	15.05.01	2,36	39
16.05.01	2,53	42	16.05.01	2,81	47
17.05.01	4,15	69	17.05.01	4,99	83
18.05.01	3,31	55	18.05.01	4,09	68
19.05.01	6,49	108	19.05.01	5,47	91
20.05.01	5,75	96	20.05.01	5,12	85
21.05.01	6,35	106	21.05.01	4,98	83
22.05.01	5,48	91	22.05.01	6,95	116
23.05.01	7,51	125	23.05.01	6,83	114
24.05.01	6,04	101	24.05.01	7,48	125
25.05.01	7,67	128	25.05.01	6,98	116
26.05.01	6,80	113	26.05.01	9,57	159
27.05.01	12,82	214	27.05.01	11,56	193
28.05.01	10,81	180	28.05.01	16,25	271
29.05.01	7,51	125	29.05.01	12,98	216
30.05.01	12,35	206	30.05.01	15,43	257
31.05.01	12,99	216	31.05.01	15,21	254
01.06.01	13,25	221	01.06.01	20,03	334
02.06.01	13,58	226	02.06.01	16,18	270
03.06.01	11,84	197	03.06.01	12,75	213
04.06.01	12,22	204	04.06.01	22,49	375
05.06.01	14,16	236	05.06.01	19,15	319
06.06.01	13,74	229	06.06.01	15,27	254
Summe:		3499			4176

Bereingte Ergebnisse der Extraktionen der Bodenproben in (Bq/g) und bezogen auf Trockenmasse:

	315			
Datum	Soxhlett	Sox + NaOH	Wasserphase	ASE Toluol
01.06.02	18282	2952	14121	34279
16.05.02	19004	3078	15360	-
02.05.02	16303	2690	13892	30459
18.04.02	17257	3250	13572	28363
04.04.02	18568	3238	15387	32965
21.03.02	16869	2610	13961	30843
07.03.02	17572	4222	12644	31517

	690			
Datum	Soxhlett	Sox + NaOH	Wasserphase	ASE Toluol
01.06.02	33546	16686	16411	43804
16.05.02	33899	16985	16352	-
02.05.02	32033	14201	16078	40420
18.04.02	32245	16598	15280	43222
04.04.02	32521	16057	16442	45381
21.03.02	27603	11776	15502	50273
07.03.02	29991	15210	15773	44157