Estrogene in Küstengewässern – Untersuchungen in der Ostsee mittels chemischer Analytik und einem *in vitro*-Biotest

Kumulative Dissertationsschrift zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Umweltwissenschaften der Universität Lüneburg

Vorgelegt von

Iris-Constanze Beck

geboren am 10.04.1975 in Konstanz

Gutachter:

1. Prof. Dr. W. Ruck

(Institut für Ökologie und Umweltchemie, Universität Lüneburg)

2. Prof. Dr. A. Prange

(Institut für Küstenforschung, GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH)

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Wolfgang Ruck (Vorsitzender)

Prof. Dr. Andreas Prange

Prof. Dr. Anthimos Georgiadis

Prof. Dr. Werner Härdtle

Prof. Dr. Mirjam Steffensky

Tag der Disputation: 28. Juni 2006

Hamburg 2006

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Küstenforschung des GKSS-Forschungszentrums in Zusammenarbeit mit dem Institut für Ökologie und Umweltchemie der Universität Lüneburg.

Ich möchte an dieser Stelle all den Menschen ganz herzlich danken, die mich während der Doktorarbeit unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wolfgang Ruck für die Möglichkeit die sehr interessante Aufgabenstellung zu bearbeiten und für die mir dabei gewährten Freiräume.

Herrn Prof. Dr. Andreas Prange möchte ich für die Unterstützung und Begutachtung der Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Regina Bruhn für die Themenstellung sowie für ihre stetige Diskussionsbereitschaft, die fachliche Hilfestellung und ihr Vertrauen in meine Arbeit.

Bei Herrn Dr. Jürgen Gandraß möchte ich mich für die intensive Zusammenarbeit bedanken. Besonders im letzten Jahr stand er mir mit seinem Wissen, seiner Geduld und seinem Optimismus immer mit Rat und Tat zur Seite.

Herr Armando Caba war bei den zahlreichen Arbeiten im Labor und auf den Probennahmekampagnen unersetzlich. Ich danke ihm für seine unerschöpfliche Hilfs- und Improvisationsbereitschaft, sein Vertrauen und die netten Gespräche in all der Zeit.

Mein großer Dank gilt Annika Jahnke, die mich durch unsere zahlreichen Gespräche in Labor, Büro und Freizeit unterstützt hat. Sowohl für die anregenden fachlichen Diskussionen und Ratschläge als auch für die immer währende persönliche Unterstützung möchte ich ihr an diese Stelle danken.

Ich danke Carsten Frank für die vielen fachlichen und privaten Gespräche, für seine geduldigen Versuche mir die Funktionsweise von Computern verständlicher zu machen und für Tipps und Hilfe bei Problemen mit selbigem. Außerdem bedanke ich mich für seine Hilfsbereitschaft während der Probennahmekampagnen.

Christian Temme möchte ich nicht nur für die ausgleichenden sportlichen Aktivitäten, sondern auch für die schöne, freundschaftliche Zeit danken.

Allen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Küstenforschung sei für die, auch durch gemeinsame Kaffeerunden und Freizeitaktivitäten entstandene freundliche, herzliche Atmosphäre gedankt, die dafür gesorgt hat, dass ich immer gern bei GKSS gearbeitet habe.

Besonders erwähnt sei an dieser Stelle auch Frau Erika Arndt mit ihrer großen Hilfsbereitschaft bei allen Fragen des nicht immer einfach zu durchschauenden Verwaltungsapparates.

Für das abschließende Korrekturlesen der Arbeit geht ein großes Dankeschön an Kathrin Ollendorf.

Schließlich bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mit der Unterstützung meiner Ausbildung die Anfertigung der vorliegenden Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben. Ich danke meinen Geschwistern Sandra, Julia und Christoph und besonders Ute und meinen Freundinnen und Freunden für ihr Verständnis, ihre Geduld und die zahllosen Aufmunterungen auch in den schwierigen Phasen der Arbeit.

Die vorliegende kumulative Dissertationsschrift basiert auf den nachfolgend aufgeführten wissenschaftlichen Publikationen:

I. Beck, I.-C., Bruhn, R., Gandrass, J., Ruck, W., 2005. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. Journal of Chromatography A 1090, 98-106.

II. Beck, I.-C., Bruhn, R., Gandrass, J., 2005. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. Chemosphere, *in press*.

III. Beck, I.-C., Bruhn, R., Gandrass, J., 2006. Bioassay-directed fractionation for analyzing estrogens in surface waters of the German Baltic Sea. Acta hydrochimica hydrobiologica, *submitted*.

Die zitierten Beiträge sind in englischsprachigen „Peer-Review“ Journals bereits erschienen bzw. zur Publikation eingereicht und sind in der vorliegenden Arbeit mit Genehmigung der jeweiligen Herausgeber wiedergegeben.

1. Einleitung 1

2. Zielstellung und Überblick 5

3. Allgemeiner Teil 8

3.1 Substanzen mit estrogener Wirkung - Auswahl der Analyte 8

3.1.1 Bedeutung und Vorkommen natürlicher Estrogene 9

3.1.2 Bedeutung und Vorkommen synthetischer Estrogene 13

3.1.3 Bedeutung und Vorkommen phenolischer Xenoestrogene 15

3.1.4 Bedeutung und Vorkommen von Phytoestrogenen 18

3.2 Bestimmung estrogener Wirksamkeit mit Hilfe biologischer Testsysteme .. 21

3.2.1 *In vivo*-Assays 21

3.2.2 *In vitro*-Assays 22

3.3 Estrogenes Wirkpotenzial in Abhängigkeit von Analyt und Testsystem 26

3.4 Spurenanalytik von Estrogenen in wässrigen Matrices 27

3.4.1 Probenanreicherung 27

3.4.2 Aufreinigung der Extrakte 29

3.4.3 Chromatographie 29

3.4.4 Massenspektrometrie 31

3.5 Kombination von biologischen und chemischen Methoden 37

4. Publikation I: *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea* 38

5. Publikation II: *Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen* 58

6. Publikation III: *Bioassay-directed fractionation for analyzing estrogens in surface waters of the German Baltic Sea* 78

7. Synthese und Ausblick 95

8. Zusammenfassung / Summary 108

Literaturverzeichnis 113

Abbildungen

Abb. 1: Strukturen der ausgewählten Verbindungen. 9

Abb. 2: Grundstruktur der Steroidhormone. 9

Abb. 3: Metabolisierungsreaktionen von Estrogenen in der Leber. 11

Abb. 4: Schematische Darstellung der estrogen-induzierten Farbreaktion im Hefezelltest (YES). (hERα: Estrogenrezeptor, *lac*Z: Reportergen *lac*Z, ERE: estrogen response element, CPRG: Chlorphenol-rot-β-D-galactopyranosid, CPR: Chlorphenolrot). 24

Abb. 5: Prinzip der Elektrospray-Ionisierung (ESI) (Applied Biosystems, 2002)… 32

Abb. 6: Verwendete Messtechnik: Das „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM) (Applied Biosystems, 2002). 34

Tabellen

Tabelle 1: Tägliche Ausscheidungen von Estrogenen beim Menschen. 11

Tabelle 2: Instrumentelle Nachweisgrenzen der Analyte. 97

Tabelle 3: Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen von analytischen Methoden zur Bestimmung von Estrogenen in wässrigen Matrices. 98

Tabelle 4: Konzentrationen von Estrogenen in Kläranlagenausläufen, Flusswasser und Oberflächenwasser der Ostsee im Vergleich. 99

Tabelle 5: Mit Hilfe des Hefetests ermittelte EC_{50}-Werte - ein Literaturvergleich. 101

Abkürzungen

APCI	Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck („atmospheric pressure chemical ionisation“)
APEOs	Alkylphenolethoxylate
API	Ionisierung bei Atmosphärendruck („atmospheric pressure ionisation“)
APPI	Photoionisierung bei Atmosphärendruck („atmospheric pressure photo ionisation“)
BDCA	Biotest-geleitete chemische Analyse („bioassay-directed chemical analysis“)
BPA	Bisphenol A
CPR	Chlorphenolrot
CPRG	Chlorphenol-rot-β-D-galactopyranosid
E1	Estron
E2	17β-Estradiol
E3	Estriol
EC	Effektkonzentration („effect concentration”)
EE2	17α-Ethinylestradiol
EEF	17β-Estradiol-Äquivalenzfaktor („estradiol equivalent factor“)
EEQ	17β-Estradiol-Äquivalentkonzentration („estradiol equivalent“)
EPA	Amerikanische Umweltbehörde („Environmental Protection Agency”)
hER	humaner Estrogenrezeptor („human estrogen receptor“)
ERE	Estrogenrezeptor-bindendes DNA-Element („estrogen response element“)
ESI	Elektrospray-Ionisierung („electrospray ionisation“)
Fa.	Firma
GC	Gaschromatographie („gas chromatography“)
GPC	Gel-Permeations-Chromatography („gel permeations chromatography“)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie („high performance liquid chromatography“)
isp	*in situ*-Probe

K	Kalium
K_{OW}	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LC	Flüssigchromatographie („liquid chromatography“)
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion („liquid liquid extraction“)
LOD	Nachweisgrenze („limit of detection“)
LOQ	Bestimmungsgrenze („limit of quantification“)
YES	Hefezelltest („yeast estrogen screen“)
MS	Massenspektrometrie („mass spectrometry“)
MDL	Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens („method detection limit“)
m-RNA	messenger-Ribonucleinsäure
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie („tandem mass spectrometry“)
Na	Natrium
NP	Nonylphenol
NPEOs	Nonylphenolethoxylate
NP-HPLC	Normalphasen-HPLC („normal phase“-HPLC)
NH_4^+	Ammonium
NH_4Ac	Ammoniumacetat
4-*tert*-OP	4-*tert*-Octylphenol
OPEOs	Octylphenolethoxylate
Q	Quadrupol
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC („reversed phase“-HPLC)
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
SPE	Festphasen-Extraktion („solid phase extraction“)
STP	Kläranlage („sewage treatment plant“)
UV	Ultraviolett
WGK	Wassergefährdungsklasse

1. Einleitung

Bereits vor über siebzig Jahren gewannen Wissenschaftler die Erkenntnis, dass verschiedene Industriechemikalien, wie beispielsweise Bisphenol A, in der Lage sind, wie das körpereigene Sexualhormon 17β-Estradiol zu wirken (Cook et al., 1934; Dodds et al., 1938). Auch wurde zu dieser Zeit bereits ein Zusammenhang zwischen estrogen aktiven Substanzen (Estrogenen) und Kanzerogenität beschrieben (Cook and Dodds, 1933). Die Vermutung, dass hormonell aktive Substanzen die Gesundheit von Mensch und Tier nachhaltig beeinträchtigen könnten, erreichte mit dem Buch `Silent Spring` von Rachel Carson (1962) erstmals eine breite Öffentlichkeit. In den frühen 90er Jahren begannen Theo Colborn und ihre Mitarbeiter, durch Umweltchemikalien ausgelöste Fortpflanzungs- und Verhaltensstörungen bei Mensch und Tier zusammenzutragen (Colborn et al., 1993) und machten diese schließlich mit ihrem Buch `Our stolen future` (1996) für eine große Leserschaft zugänglich. Seitdem steigt die Zahl der jährlichen Veröffentlichungen, Tagungen und Workshops zu dieser Thematik (Matthiessen, 2003).

Die in der englischsprachigen Literatur als „endocrine disruptors“ bezeichnete Substanzgruppe umfasst heute mehrere hundert Verbindungen, von denen bekannt ist, dass sie auf unterschiedliche Weise in hormonelle Regelkreise von Organismen einzugreifen vermögen. Die allgemein anerkannte und als umfassend eingeschätzte Definition der US-Umweltbehörde EPA („Environmental Protection Agency“) aus dem Jahr 1997 beschreibt „endocrine disruptors“ wie folgt:

“An environmental endocrine disruptor is defined as an exogenous agent that interferes with the synthesis, secretion, transport, binding, action or elimination of natural hormones in the body that are responsible for the maintenance of homeostasis, reproduction, development, and/or behaviour."

Die in der Umwelt beobachteten Effekte von Endokrinen Disruptoren betreffen vor allem das Reproduktionssystem von Organismen. Zunehmend gerät allerdings auch das Schilddrüsensystem in den Fokus der Wissenschaft (Kloas et al., 2003). Beeinträchtigungen des Reproduktionssystems zeigen sich in Fruchtbarkeitsstörungen, verringertem Bruterfolg, beispielsweise durch verdünnte Eischalen, Veränderung des Geschlechterverhältnisses bis hin zu Missbildungen von

Reproduktionsorganen mit der Folge von Sterilität (Colborn et al., 1993; Vos et al., 2000; Matthiessen, 2003). Auch negative Auswirkungen auf die menschliche Reproduktionsgesundheit, wie die zu beobachtende Zunahme von Brust- und Hodenkrebs, vermehrte Fehlentwicklungen männlicher Geschlechtsorgane (Kryptorchismus, Hypospadie), und eine verminderte Spermiendichte und -qualität, werden in diesem Zusammenhang kontrovers diskutiert (Toppari et al., 1996; Daston et al., 1997; Juberg, 2000; Safe, 2004).

Im weiblichen und männlichen Reproduktionssystem werden vier rezeptor-vermittelte Mechanismen von endokriner Disruption unterschieden: (a) estrogen, (b) anti-estrogen, (c) androgen und (d) anti-androgen. Innerhalb der Reproduktionsstörungen treten häufig so genannte Verweiblichungsphänomene auf, so dass innerhalb der Gruppe der endokrin wirksamen Verbindungen Substanzen mit potenziellen estrogenen und anti-androgenen Wirkungen in den Mittelpunkt des öffentlichen und wissenschaftlichen Diskurses geraten sind. Aufgrund ihrer hohen estrogenen Wirkstärke stehen, neben den biologisch hochwirksamen natürlichen Hormonen 17β-Estradiol (E2), Estron (E1) und Estriol (E3), auch synthetische Estrogene, wie beispielsweise das in Kontrazeptiva enthaltene 17α-Ethinylestradiol (EE2), im Verdacht für Effekte in der Umwelt verantwortlich zu sein (Desbrow et al., 1998; Houtman et al., 2004). Des Weiteren können auch Xenoestrogene, wie zum Beispiel die als Abbauprodukte von nichtionischen Tensiden bekannten Alkylphenole, trotz ihres in der Regel deutlich geringeren Wirkpotenzials für Effekte verantwortlich sein oder zu ihnen beitragen. Grund dafür ist ihr im Vergleich zu natürlichen und synthetischen Hormonen oft mengenmäßig bedeutsameres Vorkommen. Estrogene gelangen zum größten Teil über häusliche und industrielle Abwässer in die Umwelt, was dazu führt, dass Wasserorganismen diesen Substanzen besonders intensiv exponiert sind.

Für die Exposition mit estrogen wirksamen Substanzen belegen heute zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Laborexperimente, dass es zu Beeinträchtigungen des Reproduktionssystems, der neuronalen Entwicklung oder auch zu Krebserkrankungen kommen kann (Gülden et al., 1997; Christiansen et al., 1998; Panter et al., 1998; Parmigiani et al., 1998; Routledge et al., 1998; Tabata et al., 2001; Orlando and Guillette, 2002; Hu et al., 2002; Newbold, 2002; Brion et al., 2004). Beispielhaft sei hier eine Untersuchung zu EE2 genannt, in der festgestellt wurde,

dass es in der Lage ist, bereits in der umweltrelevanten Konzentration von 0,1 ng L^{-1} eine Beeinflussung des Reproduktionssystems bei Fischen auszulösen (Purdom et al., 1994). Die Ergebnisse aus Labor- und Expositionstudien auf Freilandbedingungen zu übertragen, ist allerdings mit verschiedenen Unsicherheitsfaktoren verbunden, was Rückschlüsse und eine Risikoabschätzung für das Vorkommen von Estrogenen in der Umwelt erschwert (Tyler et al., 1998).

Aufgrund der intensiveren Exposition mit Estrogenen sind Beeinträchtigungen der Reproduktionsgesundheit von Organismen vor allem aus aquatischen Ökosystemen bekannt. Bei freilandökologischen Befunden besteht jedoch die große Schwierigkeit, einen direkten Zusammenhang zum Vorkommen von Estrogenen nachzuweisen.

Vor allem in Flussläufen und hier im Besonderen in der Nähe von Kläranlagenausläufen werden Symptome wie beispielsweise das so genannte Intersex-Phänomen beobachtet, bei dem in männlichen Organismen sowohl männliche als auch weibliche Gonaden (Zwittergonaden) angelegt sind (Purdom et al., 1994; Jobling et al., 1998). Schon vor über 20 Jahren konnten diese Symptome in England beobachtet werden (Sweeting, 1981). Bei männlichen Regenbogenforellen, die in Käfigen unterhalb von Kläranlagen gehalten wurden, konnte neben erhöhten Vitellogenin-Gehalten auch ein verlangsamtes Wachstum des Hodengewebes nachgewiesen werden (Purdom et al., 1994). Als ein spezifisch weibliches Dotterprotein gilt Vitellogenin als anerkannter Biomarker für die Exposition mit estrogen wirksamen Substanzen (Heppell et al., 1995; Sumpter and Jobling, 1995). Mittlerweile gibt es zahlreiche Studien, die das Auftreten von Intersex, erhöhte Vitellogenin-Gehalte, eine Verlangsamung oder Inhibierung des Gonadenwachstums und andere Symptome von Reproduktionsstörungen beschreiben und einen Zusammenhang mit dem Vorkommen von Estrogenen vermuten (Folmar et al., 1996; Jobling et al., 1996; Jobling et al., 1998; Allner, 2005). Aufgrund hochempfindlicher Messtechniken wurde es in der Vergangenheit immer häufiger möglich, das Vorkommen von Estrogenen in Oberflächengewässern analytisch zu bestätigen und diese auch im Bereich von Effektkonzentrationen zu quantifizieren (Belfroid et al., 1999; Ternes et al., 1999a; Spengler et al., 2001; Kuch und Ballschmiter, 2001). Nur wenige Studien kombinieren in diesem Zusammenhang direkt Untersuchungen zu biologischen

Effekten und chemische Analyseverfahren (Petrovic et al., 2002; Pawlowski et al., 2003). In der Regel sind anthropogen belastete Flussläufe Gegenstand von Untersuchungen.

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die marine Umwelt, aufgrund der in der Regel vorherrschenden großen Verdünnungen von einmündenden oder eingeleiteten Wassermengen, nicht von einem umweltrelevanten Vorkommen estrogen wirksamer Substanzen betroffen ist. Aus diesem Grund gibt es zu dieser Thematik im Vergleich zu Flüssen sehr viel weniger Daten, sowohl hinsichtlich der Reproduktionsgesundheit von aquatischen Organismen, als auch zum Vorkommen von Estrogenen. Dennoch zeigen einige Studien, dass auch in Meeren und hier im Besonderen in den Küstenzonen Beeinträchtigungen der Reproduktionsgesundheit von Organismen festzustellen sind (Allen et al., 1999; Oberdörster and Cheek, 2000; De Metrio et al., 2003; Scott et al., 2005). Des Weiteren bestätigen Arbeiten von Atkinson et al. (2003) und Braga et al. (2005), dass die besonders im Verdacht stehenden natürlichen und synthetischen Hormone ebenfalls in der Meeresumwelt nachzuweisen sind.

Auch im Küstenbereich der Ostsee konnten bei Fischen Symptome von Fruchtbarkeitsstörungen beobachtet werden. So stellten Gercken und Sordyl (2002) bei Aalmuttern (*Zoarces viviparus*) das Vorkommen von Intersex, Störungen der Larvalentwicklung und eine Degeneration der Eientwicklung (Atresien) fest. Als Ursache wurde eine Gewässerbelastung mit estrogen wirksamen Substanzen vermutet. Bisher fehlten für diese Küstenregion jedoch analytische Daten, um die These eines direkten Zusammenhangs zwischen den Fruchtbarkeitsstörungen und einem Vorkommen von Estrogenen stützen zu können.

2. Zielstellung und Überblick

Die am häufigsten in der Umwelt beobachteten Effekte zeigen so genannte Verweiblichungen, und begründen damit die wissenschaftliche Fokussierung auf estrogenartig wirkende Substanzen, die auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind. Die von Gercken et al. (2002) beschriebenen Reproduktionsstörungen bei Individuen der Fischspezies Aalmutter (*Zoarces viviparus*), die in küstennahen Regionen der deutschen Ostsee gefangen wurden, waren ausschlaggebend für die Wahl dieser Küstenzone als Untersuchungsgebiet. Die Ostsee ist aus vielerlei Gründen als ein besonders sensibles Ökosystem einzustufen (Matthäus, 1996; Helsinki Commission, 2003). Sie umfasst mit einer Fläche von 415 000 km² die größte Brackwassermenge der Erde. Das Wasservolumen beträgt nur 21 600 km³ und mit einer mittleren Tiefe von 52 m ist die Ostsee ein flaches Meer. Durch enge Durchlässe erfolgt über die Nordsee ein stark begrenzter Wasseraustausch mit dem Atlantischen Ozean. Für die Betrachtung ökotoxikologischer Belange sind auch die beträchtliche Flusswasserzufuhr und die durch eine stabile Dichteschichtung eingeschränkte Vertikalzirkulation zu erwähnen. Die Anrainerstaaten verursachen durch ihre zahlreichen häuslichen und industriellen Abwassereinleitungen eine komplexe Expositionssituation. Um die ökologische Relevanz von Estrogenen und damit einen Zusammenhang zwischen deren Vorkommen und den beobachteten Reproduktionsstörungen bei Fischen in der Ostsee diskutieren zu können, sind zunächst Kenntnisse zum Vorkommen potenziell relevanter Substanzen erforderlich.

Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen zweier Messkampagnen (Juli 2003 und Juli 2004) küstennahes Oberflächenwasser der Ostsee hinsichtlich der im Folgenden genannten Zielstellungen untersucht werden. Zunächst war es Aufgabe der vorliegenden Arbeit, eine analytische Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Estrogenen in einer küstennahen marinen Umwelt zu entwickeln, um erste Konzentrationsdaten für Oberflächenwasser der deutschen Ostsee zu liefern („target“-Analytik). Die im Vergleich zu Kläranlagenausläufen oder auch Flusswasser zu erwartenden geringeren Konzentrationen machten eine Quantifizierungsmethode mit niedrigen Nachweisgrenzen für die ausgewählten Analyte erforderlich.

Für die Ökosphäre sind allerdings nicht die Einzelkonzentrationen von Analyten von Bedeutung, sondern die Wirkung dieser in ihrer Gesamtheit (Mischung/Kombination). Mit Hilfe eines estrogensensitiven *in vitro*-Testsystems sollten estrogene Gesamtwirkpotenziale der Proben ermittelt werden. Hierfür sollte eine universelle Probenvorbereitung entwickelt werden, um möglichst repräsentative Extrakte für die biologischen Untersuchungen zur Verfügung zu stellen. Als *in vitro*-Testsystem zur Erfassung der Estrogenität von Ostseeproben wurde der so genannte Hefezelltest („yeast estrogen screen“, YES) ausgewählt.

Um eine Aussage machen zu können, welche Substanzen für die im Biotest gemessene Estrogenität verantwortlich sind, sollten die Proben mit Hilfe des Ansatzes der Biotest-geleiteten chemischen Analytik („bioassay-directed chemical analyses“, BDCA) untersucht werden. Die für diese Fragestellung zu entwickelnde Fraktionierungsmethode sollte auf Gesamtextrakte mit nachgewiesener Estrogenität angewendet werden. Nachfolgende chemische und biologische Untersuchungen der Einzelfraktionen ermöglichen es dann, die verantwortlichen Analyte zu identifizieren. Darüber hinaus ist es mit der BDCA möglich, Aussagen zu treffen, ob noch andere, nicht in der „target“-Analytik enthaltene Estrogene von Bedeutung sein könnten und/oder auch Anti-Estrogene in relevanten Konzentrationen in den Proben vermutet werden können.

Überblick

Die Einleitung in **Kapitel 1** gibt eine Zusammenfassung über den aktuellen Stand der Forschung, um die Bedeutung der in dieser Arbeit behandelten Thematik herauszustellen.

Kapitel 2 skizziert die Hintergründe und Zielstellungen der verschiedenen Arbeitsinhalte.

Im allgemeinen Teil (**Kapitel 3**) erfolgt zunächst die Charakterisierung der ausgewählten Substanzen. Die für Estrogene bedeutsamen biologischen und chemischen Untersuchungsmethoden werden vorgestellt und die innerhalb der vorliegenden Arbeit angewendeten Methoden detaillierter beschrieben.

Mit Hilfe von Wiederfindungsexperimenten wurde die Extraktionsausbeute der ausgewählten Analyte bei großvolumigen Anreicherungen überprüft. Die

Festphasenextraktion von durchschnittlich 49 L-Proben wurde schließlich während zweier Probennahmekampagnen im Juli 2003 und Juli 2004 auf Oberflächenwasserproben der Ostsee angewendet. Die Vermessung der Proben erfolgte mit Hilfe von Hochleistungs-Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie. Die entwickelte Analyse-Methode ermöglichte die Identifizierung und Quantifizierung von ausgewählten Estrogenen in Küstenregionen der deutschen Ostsee und leistet damit einen Beitrag für eine Datengrundlage zum Vorkommen von Endokrinen Disruptoren. Die Ergebnisse der chemischen Analytik sind im Publikationsbeitrag I (**Kapitel 4**) wiedergegeben.

Diese chemische „target"-Analytik lieferte Informationen zum Vorkommen von ausgewählten Estrogenen. Die sich anschließenden biologischen Untersuchungen ermöglichten die Bestimmung der Probenestrogenität. Die Ergebnisse, die mit Hilfe des eingesetzten, estrogen-sensitiven Biotests erzielt wurden, sind im Publikationsbeitrag II (**Kapitel 5**) präsentiert und diskutiert. Auch wurden hier aus den Konzentrationsdaten der chemischen Analytik und den für die einzelnen Analyte im Biotest ermittelten, relativen Wirkpotenzialen (Estradiol-Äquivalenzfaktoren) so genannte Estradiol-Äquivalente kalkuliert. Diese kalkulierten Estradiol-Äquivalente wurden mit den im Biotest gemessenen Estradiol-Äquivalenten verglichen.

Mit Hilfe des Ansatzes der Biotest-geleiteten chemischen Analyse wurden ausgewählte Gesamtextrakte fraktioniert und anschließend mit dem Ziel einer eindeutigen Zuordnung von Analytkonzentration und Estrogenität im Biotest chemisch und biologisch analysiert. Die Ergebnisse der Fraktionierungsuntersuchungen sind in der Publikation III (**Kapitel 6**) dargestellt.

In **Kapitel 7** werden die wichtigsten Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen herausgestellt und abschließend diskutiert.

Einen Überblick über die Arbeit in ihrer Gesamtheit bietet die Zusammenfassung in **Kapitel 8**.

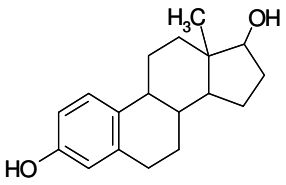
3. Allgemeiner Teil

3.1 Substanzen mit estrogener Wirkung – Auswahl der Analyte

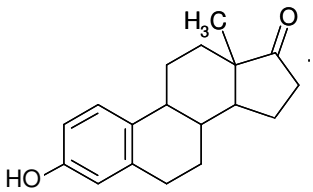
Zu den estrogen wirksamen Substanzen zählen eine Vielzahl von Verbindungen mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften, deren Gemeinsamkeit ihre mögliche Wirkung auf das Sexualsystem ist. Umfangreiche Übersichten von Verbindungen, deren estrogene Wirksamkeit festgestellt worden ist, sind unter anderem bei Colborn et al. (1993), Schäfer et al. (1996), Gülden et al. (1997), WWF (1997) und Bruhn et al. (1999) erschienen.

Aus dieser Vielfalt wurden zur Entwicklung der chemischen und biologischen Untersuchungsmethode Substanzen ausgewählt, die ein breites Substanzspektrum abdecken und hinsichtlich ihres Umweltvorkommens und ihrer Estrogenität als potenziell relevant eingestuft wurden (vgl. dazu Kap. 3.1.1 ff.). Dazu zählen Vertreter aus der Gruppe der natürlichen und synthetischen Hormone, ausgewählte phenolische Xenoestrogene, sowie zwei so genannte Phytoestrogene (Abb. 1).

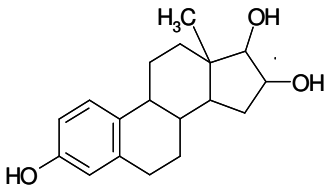
Natürliche Estrogene:



17β-Estradiol (E2)

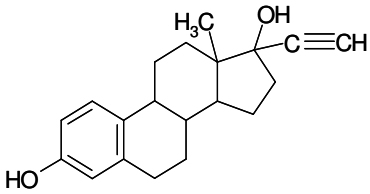


Estron (E1)



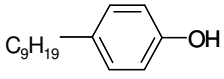
Estriol (E3)

Synthetisches Estrogen:

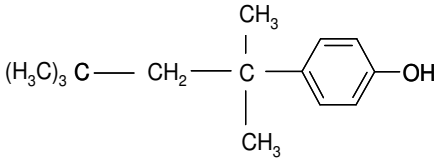


17α-Ethinylestradiol (EE2)

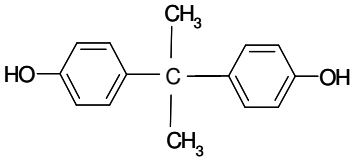
Xenoestrogene:



Nonylphenol (NP)

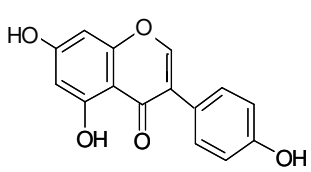


4-*tert*-Octylphenol (4-*tert*-OP)

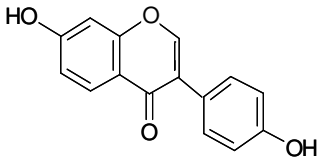


Bisphenol A (BPA)

Phytoestrogene:



Genistein



Daidzein

Abb. 1: Strukturen der ausgewählten Verbindungen.

Trotz ihrer Vielfältigkeit sind viele der estrogen wirksamen Substanzen auch durch Gemeinsamkeiten ihrer chemischen Struktur charakterisiert. Auffällig sind die häufig vorhandenen phenolischen Strukturen, die, oft gekoppelt mit Hydroxy-Gruppen, mitverantwortlich für eine mögliche Bindung an den Estrogenrezeptor sein sollen. Nach Brzozowski et al. (1997) liegt die relativ geringe Spezifität des Estrogenrezeptors (ER) in seiner großen Bindungsdomäne begründet, die die zweifache Größe des E2 besitzt. Dadurch ist es einer großen Vielfalt an Substanzen möglich, am ER gebunden zu werden und damit die hormonellen Regelkreise zu beeinflussen.

3.1.1 Bedeutung und Vorkommen natürlicher Estrogene

Natürliche Estrogene sind Steroidhormone und bilden zusammen mit der Gruppe der Gestagene die Summe der weiblichen Sexualhormone. Estrogene sind aber auch wichtiger Bestandteil der hormonellen Gesundheit des Mannes. Das wichtigste Estrogen im weiblichen und männlichen Körper ist das E2. Die Hauptaufgabe der natürlichen Estrogene ist die Regulierung des Reproduktions-systems, doch steuern sie auch maßgeblich die postnatale Entwicklung, beeinflussen das kardiovaskuläre System, den Fett- und Knochenstoffwechsel. Den Steroiden ist ein Grundskelett eigen (Abb. 2), die so genannte Gonan- oder Steran-Struktur ($C_{17}H_{28}$), welche aus vier kondensierten Kohlenstoffringen besteht:

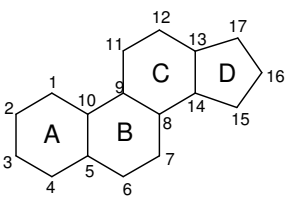


Abb. 2: Grundstruktur der Steroidhormone.

Die Biosynthese der natürlichen Estrogene erfolgt bei den Vertebraten in den Ovarien bzw. den Hoden, aber auch in den Nebennieren und im Fettgewebe. Steroidhormone werden nicht gespeichert, sondern direkt nach der Synthese in das Blutplasma ausgeschüttet, wo sie reversibel an spezifische steroidbindende Proteine der Bluteiweißkörper (z.B. Albumin) gebunden werden und an ihre Erfolgsorgane transportiert werden. Diese gebundenen Hormone sind inaktiv und stellen in dieser Form auch eine Hormonreserve dar. Als lipophile Substanzen passieren sie passiv die zellulären Membranen und können so die im Zellkern lokalisierten Estrogenrezeptoren aktivieren (King und Greene, 1984; Gasc und Baulieu, 1986). Die Existenz eines estrogenbindenden Rezeptor-Proteins wurde in den frühen 60er Jahren von Jensen und Jacobsen (1962) entdeckt. Dieser, seit der Entdeckung eines weiteren Estrogenrezeptors (ERβ) im Jahre 1995 (Kuiper et al., 1996) benannte ERα, gilt als der klassische Estrogenrezeptor, der für die typischen estrogenen Wirkungen verantwortlich gemacht wird (Mueller, 2004). Der ERα kommt daher auch in den klassischen estrogenen Zielgeweben vor, wohingegen der ERβ in Prostata, Hoden, Eierstöcken und Teilen des Gehirns nachgewiesen wurde (Couse et al., 1997; Kuiper et al., 1997a, 1997b). Die unterschiedliche Gewebeverteilung der beiden ER-Subtypen ERα und ERβ legt die Vermutung nahe, dass ihnen spezifische, voneinander abweichende biologische Funktionen zukommen (Barkhem, 2002). Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgt durch die Bindung eines Estrogens, was mit der Abspaltung eines an den Rezeptor angelagerten, inhibierenden, so genannten Hitzeschock-Proteins („heat shock protein“) einhergeht (Klinge, 2001). Der so „aktivierte“ Rezeptor-Ligand-Komplex lagert sich an das rezeptorbindende DNA-Element („estrogen response element“, ERE) an und löst damit eine Genaktivierung aus. Der Transkription in die mRNA folgt schließlich die Translation in Aminosäure-Sequenzen und damit die Synthese von Proteinen als Reaktion der Hormonwirkung. Nachdem das Steroidhormon seine Funktion erfüllt hat, wird es aus der Rezeptorbindung entlassen und in den Leberzellen inaktiviert bzw. transformiert. Die Biotransformation hat im Allgemeinen zum Ziel, die Polarität der jeweiligen Substanz zu erhöhen, um diese dann schneller über den Harn oder die Galle ausscheiden zu können (Abb. 3).

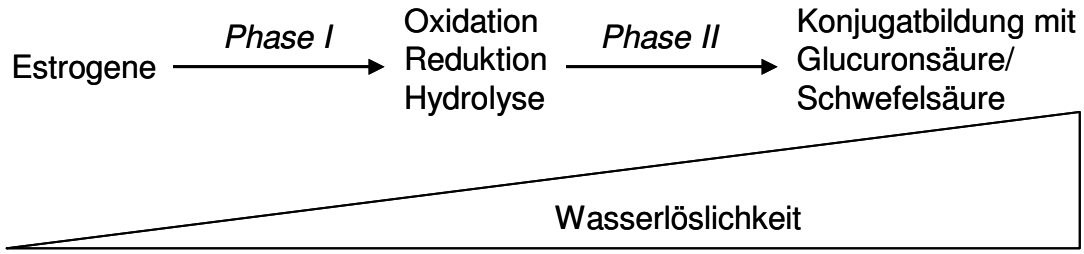


Abb. 3: Metabolisierungsreaktionen von Estrogenen in der Leber.

Man unterscheidet hier Phase I-Reaktionen, in denen vor allem oxidative Metabolisierungen (Hydroxylierung, Dehydrierung) vorherrschen. Das bedeutsamste endogene Estrogen E2 ($C_{18}H_{24}O_2$) wird zunächst durch die Oxidation der aliphatischen Hydroxygruppe in Position 17 (vgl. Abb. 1) zu E1 ($C_{18}H_{22}O_2$) metabolisiert. Bei schwangeren Frauen ist der Hauptmetabolit des E2 allerdings das E3 ($C_{18}H_{24}O_3$), welches durch eine Hydroxylierungsreaktion aus E1 in Position 16 entsteht. In den nachfolgenden Phase II-Reaktionen werden diese Metabolite mit Glucuronsäure (Glucuronidierung) oder Sulfat (Sulfatierung) konjugiert. Als Konjugate werden sie schließlich über den Urin und die Gallenflüssigkeit ausgeschieden. Auch körperfremde Stoffe, wie beispielsweise Arzneimittel oder Umweltchemikalien, werden in der Regel über diese Metabolisierungsreaktionen umgewandelt und schließlich ausgeschieden.

Nach Schätzungen von Johnson et al. (2000a) beträgt die tägliche Ausscheidung an Estrogenen bei Frauen durchschnittlich 17 µg, wobei schwangere Frauen ein Vielfaches mehr ausscheiden (Tabelle 1). Die Exkretion von Männern ist vergleichbar mit der von Frauen in der Menopause (7 µg).

Tabelle 1: Tägliche Ausscheidungen von Estrogenen beim Menschen[a].

Ausscheidungen von natürlichen Estrogenen bei Mann und Frau in µg pro Tag

	E2	E1	E3
Männer	1,6	3,9	1,5
Frauen	3,5	8	4,8
Frauen in der Menopause	2,3	4	1
Schwangere Frauen	259	600	6000

[a] nach Johnson et al. (2000a).

Nicht zu vergessen sind die signifikanten Ausscheidungen aus der Tierhaltung. Milchkühe beispielsweise scheiden bis zu 36 mg pro Tag Gesamtestrogene aus (Blok und Wösten, 2000). Turan (1995) konnte für trächtige Pferdestuten eine Exkretion von 100 mg pro Tag nachweisen.

Von den endogenen Estrogenen wird ausschließlich E3 zur lokalen Therapie von Erkrankungen im Genitalbereich eingesetzt. Für pharmakologische Anwendungen wurde in erster Linie das E2 derart verändert, dass eine längere Bioverfügbarkeit gewährleistet ist, so zum Beispiel beim EE2, welches als Hauptwirkstoff in Kontrazeptiva zum Einsatz kommt (vgl. Abschnitt zu Synthetischen Estrogenen).

Estrogene werden als Konjugate ausgeschieden und gelangen in dieser inaktiven Form in die Kläranlagen. Dort werden sie durch mikrobielle Aktivität von beispielsweise *Escherichia coli*-Stämmen dekonjugiert (D'Ascenzo et al., 2003) und liegen damit wieder in ihrer aktiven Struktur vor. Mit relativ geringen Halbwertszeiten von 2-3 Tagen (Ying et al., 2002a) werden natürliche Steroide gut biologisch abgebaut. In Batch-Experimenten konnte die schnelle Oxidation von E2 zu E1 beobachtet werden, welches ohne weitere Hauptmetabolite weiter abgebaut wurde (Ternes et al., 1999b; Lee and Liu, 2002). Aufgrund von Konzentrations-messungen im Zulauf und Ablauf von Kläranlagen kalkulierten Baronti et al. (2000) Abbauraten von 61% für E1 und bis zu 95% für E3. Der Abbau für E2 und EE2 wird mit 80-90% angegeben. Die vermeintlich schlechten Abbauraten von E1 könnten sich auch damit erklären lassen, dass es in der Kläranlage selbst, durch die Oxidation von E2, gebildet wird.

Der unvollständige Abbau von natürlichen Estrogenen in den Kläranlagen führt zu ihrem Eintrag in die aquatische Umwelt. Sie sind in Kläranlagenabläufen und in den angrenzenden Oberflächengewässern noch in Konzentrationen von pg bis ng pro Liter nachweisbar (Belfroid et al., 1999; Baronti et al., 2000; Kuch und Ballschmiter, 2001; Ternes et al., 1999a; Nasu et al., 2001; Desbrow et al., 1998; Snyder et al., 1999; Adler et al., 2001). Konzentrationsdaten für die marine Umwelt sind kaum vorhanden. Der Autorin ist ausschließlich die Arbeit von Atkinson et al. (2003) bekannt, der mit Hilfe eines Radioimmuno-Assays in der Küstenzone der Kokos-Insel (Pazifischer Ozean) einen Gesamt-Estrongehalt von 1,68 ng L^{-1} nachweisen konnte und in Wasserproben aus dem offenen tropischen Meer in der

Region der Hawaiianischen Inseln und Französisch-Polynesien E1 noch mit bis zu 52 pg L^{-1} quantifiziert hat.

Zur Abschätzung der Sorptionsneigung und Bioakkumulation werden Adsorptionskoeffizienten bzw. der Verteilungskoeffizient zwischen *n*-Octanol und Wasser (K_{OW}) herangezogen. Mit einem log K_{OW} zwischen 2,8 und 3,9 werden natürliche Steroide als mäßig hydrophob eingestuft und können damit in signifikanten Anteilen auch an Sediment und Schwebstoffen gebunden sein (Lai et al., 2000).

Für die ökotoxikologische Relevanz einer Substanz ist die Konzentration entscheidend, die am Zielorgan oder -gewebe auftritt. Diese Konzentration ist ein Ergebnis aus externer Umweltkonzentration des Analyten und dem Vorgang der Bioakkumulation in Abhängigkeit von pharmakokinetischen Eigenschaften wie Metabolisierung/Exkretion (Mackay und Fraser, 2000; Lai et al., 2002a). Für natürliche Estrogene kalkulierten Lai et al. (2002a) geringe Biokonzentrations-faktoren, aber merkten an, dass ihre ökotoxikologische Relevanz bedingt durch ihre hohe Wirkstärke nicht unterschätzt werden darf. In Untersuchungen mit der Frischwasser-Alge *Chlorella vulgaris* konnten Lai et al. (2002b) durchschnittliche Biokonzentrationsfaktoren von 27 feststellen. Analytische Untersuchungen von Kläranlagenausläufen und Gallengewebe von Fischen, die diesen exponiert wurden, zeigten, dass sich neben NP und NPEOs auch natürliche und synthetische Estrogene im Gewebe anreichern und als Folge estrogene Effekte induzieren können (Gibson et al., 2005).

3.1.2 Bedeutung und Vorkommen synthetischer Estrogene

Synthetische Estrogene sind in der Regel Derivate vom E2 und zeigen daher wie die natürlichen Estrogene die in Abb. 2 gezeigte Steroidstruktur. Sie wurden in erster Linie für die beiden Einsatzgebiete der Empfängnisverhütung und Hormonersatztherapie entwickelt. Das bedeutsamste synthetische Estrogen ist das EE2 ($C_{20}H_{24}O_2$), welches in Kombination mit verschiedenen Gestagenen Hauptwirkstoff der meisten Kontrazeptiva ist. Durch Einführung der Ethinylgruppe in der 17α-Position wird der rasche Abbau dieses synthetischen Hormons verhindert und eine verbesserte orale Verfügbarkeit erreicht. Johnson et

al. (2000a) gehen in ihren Abschätzungen davon aus, dass 25% der Frauen im gebärfähigen Alter die Pille nehmen. Täglich wird hier eine EE2 Dosis im Bereich von 10 bis 50 µg eingenommen.

Die Modifikation des EE2 durch die Einführung einer Methyletherfunktion führt zum Mestranol, einem weiteren synthetischen Estrogen, welches in Kontrazeptiva enthalten ist. In Kläranlagen erfolgt durch mikrobielle Abspaltung der Methyletherfunktion die Umwandlung in EE2. Aus umweltanalytischen Gesichtspunkten ist Mestranol daher kaum relevant und wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Als Pharmazeutikum gegen Beschwerden in der Menopause kommt das 17β-Estradiolvalerat zum Einsatz. Es wird in der Leber leicht und nahezu vollständig zu E2 hydrolisiert (Seibert, 1996), und ist demnach in seiner originären Form für die Umwelt ebenfalls nicht relevant.

Um die estrogene Wirkung entfalten zu können, wird EE2 in der Leber zu E2 de-ethinyliert. Ein Großteil jedoch, bis zu 80%, wird nicht metabolisiert und analog zu den natürlichen Estrogenen in konjugierter Form ausgeschieden (Bolt, 1979). Die Dekonjugation durch Bakterien in der Kläranlage führt zu einer Rückführung in die aktive Form. In Untersuchungen zur aeroben Biodegradation zeigen Jürgens et al. (2002), dass bei gleichen Inkubationsbedingungen die Halbwertszeit von 17 Tagen für EE2 verglichen mit 1,5 Tagen bei E2 deutlich höher ist. In Batch-Experimenten bestätigten Ternes et al. (1999b) die höhere Persistenz von EE2, welches sich in der 80stündigen Inkubationsdauer im Gegensatz zu beispielsweise E2 nur unwesentlich abbaute. Synthetische Estrogene sind im Allgemeinen schwerer biologisch abbaubar als natürliche Steroide und lassen sich daher trotz des um ca. eine Größenordnung deutlich geringeren Umwelteintrags im gleichen Konzentrationsbereich nachweisen (Spengler et al., 2001).

Konzentrationen in den Kläranlagenausläufen und den angrenzenden Oberflächengewässern liegen wie auch bei den natürlichen Estrogenen im ng bis pg L^{-1}-Bereich (Desbrow et al., 1998; Belfroid et al., 1999; Snyder et al., 1999; Ternes et al., 1999a; Baronti et al., 2000; Adler et al., 2001; Kuch und Ballschmiter, 2001). In folgenden Review-Artikeln sind Übersichten zu Umweltkonzentrationen dargestellt: López de Alda und Barceló (2001a), Ying et al. (2002a), Kuster et al. (2004) und Petrovic et al. (2004).

Synthetische Steroide haben höhere log K_{OW}-Werte als die natürlichen Steroide. Mit einem log K_{OW} von 4,15 für EE2 ist von einer nicht unbedeutenden Sorption an Sediment oder Schwebstoffen auszugehen, welches zu einer Konzentrationsabnahme in der wässrigen Phase beitragen kann (Lai et al., 2000). Trotz der biologischen Abbaubarkeit und den relativ geringen Umweltkonzentrationen von EE2 kalkulierten Lai et al. (2002a) eine schwache, aber vorhandene Bioakkumulation. Im Vergleich zu Xenoestrogenen wurden allerdings um Größenordnungen niedrigere Biokonzentrationsfaktoren errechnet.

3.1.3 Bedeutung und Vorkommen phenolischer Xenoestrogene

Zu den im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten Umweltchemikalien gehören mit NP, 4-*tert*-OP und BPA drei Vertreter von Xenoestrogenen, die als gemeinsames Strukturmerkmal mindestens eine phenolische Gruppe aufweisen (vgl. Abb. 1).

Die in *para*-Stellung alkylierten Phenole NP ($C_{15}H_{24}O$) und 4-*tert*-OP ($C_{14}H_{22}O$) werden als Ausgangsstoffe für die Herstellung von Alkylphenolethoxylaten (APEOs) eingesetzt und werden beim Abbau der APEOs wieder frei. Bei APEOs ist die OH-Gruppe des Phenolrings durch Ethoxylat-Gruppen ersetzt, die den hydrophilen Teil des Moleküls bilden. Die Alkylkette mit in der Regel 8 oder 9 C-Atomen bildet den lipophilen Teil. Die daraus resultierende Oberflächenaktivität führt zu ihrer großen Bedeutung als nichtionische Tenside. Sie finden breite Anwendung als Hilfs- oder Grundstoffe in Reinigungsmitteln, Farbstoffen, Pestiziden oder auch in Industriezweigen wie beispielsweise der metallverarbeitenden- und Textilindustrie, in der Kunststoffproduktion oder der Papierherstellung. Ca. 55% des APEO-Einsatzes entfällt auf den industriellen Produktionssektor. Der übrige Anteil wird vor allem in industriellen Reinigungsmitteln (30%) und Haushaltsreinigern (15%) verwendet (Field und Reed, 1996). Die mengenmäßig bedeutsamen APEOs sind die NPEOs (C_9H_{19}-C_6H_4-(OC_2H_4)n-OH) und OPEOs, wobei die NPEOs ca. 80% des gesamten APEO-Einsatzes ausmachen. Das eingesetzte NPEO ist ein technisches Gemisch aus verschiedenen Nonylphenol-Isomeren (Wheeler et al., 1997) mit 1 bis 40 Ethoxy-Einheiten (C_2H_4O). Renner (1997) kalkulierte eine weltweite jährliche APEO-Produktionsmenge von ca. 500 000 Tonnen, von denen ca. 60% über Klär-

anlagenausläufe und direkte Einträge in die aquatische Umwelt gelangen. Aufgrund ihrer Giftigkeit auf Wasserorganismen (WGK 3, stark wassergefährdend) besteht seit 1986 in europäischen Ländern eine freiwillige Selbstverpflichtung der Industrie zum Verzicht auf APEOs in Haushaltswasch- und -reinigungsmitteln. Die Selbstverpflichtung wurde 1992 auf industrielle Reinigungsmittel erweitert. Da sie nach wie vor in industriellen Produktionsprozessen zum Einsatz kommen, konnte für das Jahr 1995 der Verbrauch von Alkylphenolen in Deutschland noch auf 20 000 Tonnen geschätzt werden (Maguire, 1999). NP wurde in die Liste der prioritären gefährlichen Stoffe der im Jahr 2000 verabschiedeten EU-Wasserrahmenrichtlinie (Richtlinie 2000/60/EG) aufgenommen. Im November 2003 wurde die europäische Richtlinie 2003/53/EG durch das deutsche Bundeskabinett im Rahmen einer Verordnung in nationales Recht umgesetzt, worin ein Anwendungsverbot für Produkte mit Konzentrationen von NP und NPEOs ≥ 0,1 Massen% beschlossen wurde. In zunehmendem Maße werden APEOs durch die biologisch gut abbaubaren Alkoholethoxylate (AE) und Alkylethoxylate (AEO) ersetzt. Aufgrund der sich nach wie vor in großen Mengen im Umlauf befindlichen Produkte mit APEO-Anteil, der Persistenz ihrer Metabolite und dem zugelassenen Einsatz in anderen Ländern besteht nach wie vor für diese Substanzen eine große Umweltrelevanz.

Im Verlauf von komplexen Transformationsprozessen entstehen unter anaeroben und aeroben Bedingungen verschiedene Metabolite. Durch die Abspaltung von hydrophilen Ethoxy-Einheiten entstehen lipophilere und damit persistentere kurzkettige APEOs und schließlich die Alkylphenole. Durch Oxidation der endständigen Ethoxy-Gruppe und/oder der Alkylkette entstehen Alkylphenoxysäuren (APnECs). Auch diese können zu den Alkylphenolen abgebaut werden (Ahel et al., 1994; Jonkers et al., 2001). Mit Halbwertzeiten von 8 bis 51 Tagen für OP (Johnson et al., 2000b) und 35 bis 58 Tagen für NP (Ekelund et al., 1993) werden diese nur langsam unter Aufspaltung des Phenolrings schließlich zu CO_2 und H_2O mineralisiert.

Das Vorhandensein von Alkylphenolen in der Umwelt ist ausschließlich auf anthropogene Ursachen zurückzuführen. Aufgrund des breiten Einsatzgebietes und der hohen Produktionsmengen gelangen sie über industrielle und öffentliche Kläranlagenausläufe in angrenzende Oberflächengewässer. Zahlreiche Studien

belegen Konzentrationen im µg L^{-1}-Bereich (Thiele et al., 1997; Ying et al., 2002b). Heemken et al. (2001) konnten NP und 4-*tert*-OP in der Nordsee in Konzentrationen von 0,02 bis 84 ng L^{-1} nachweisen. Neuere Messungen in der Nordsee von Xie et al. (2005) bestätigen Konzentrationen für NP und 4-*tert*-OP im pg bis ng L^{-1}-Bereich.

Die von Ahel und Giger (1993) ermittelten log K_{OW}-Werte von 4,48 für NP und 4,12 für 4-*tert*-OP deuten auf eine signifikante Sorption an Schwebstoffen, Sediment oder Klärschlamm hin. Die damit einhergehende erhöhte Akkumulationsneigung wurde mit einer 20000 bis 70000fachen Biokonzentration dieser Analyte in aquatischen Organismen in verschiedenen Untersuchungen bestätigt (Ekelund et al., 1990; Pedersen und Lindholst, 1999; Ferreira-Leach und Hill, 2001; Legler et al., 2002; Pedersen und Hill, 2002).

BPA ($C_{15}H_{16}O_2$) enthält zwei Phenolringe, die mit den beiden OH-Gruppen für die Stoffeigenschaften entscheidend sind. Die gute Polymerisierbarkeit ist der Grund dafür, dass BPA zu den weltweit bedeutsamsten Industriechemikalien zählt. Es wird unter anderem zur Herstellung von Polycarbonaten, Epoxydharzen und Flammschutzmitteln verwendet. 1995 belief sich die BPA-Produktion in Deutschland auf 210 000 Tonnen und deckte damit ungefähr die Hälfte des westeuropäischen jährlichen Bedarfes (Leisewitz und Schwarz, 1997). BPA kann auf allen Stufen des Stoffflusses, von der Produktion bis zur Entsorgung, in die Umwelt freigesetzt werden (BUA, 1997).

In Oberflächengewässern und Kläranlagen wird BPA mit über 96% sehr gut abgebaut (Staples et al., 1998). Die Mineralisierung erfolgt hauptsächlich auf biologischem Wege über die Zwischenprodukte 4-Hydroxybenzoesäure und 4-Hydroxyacetophenon bis hin zu CO_2 und H_2O (Lobos et al., 1992). Der Abbau erfolgt mit einer Halbwertszeit von wenigen Tagen (2,5 bis 4 Tage) relativ schnell (Dorn et al., 1987; Staples et al., 1998; Klecka et al., 2001; Kang und Kondo, 2002).

Das ubiquitär vorkommende BPA wurde in Kläranlagenausläufen und Flüssen in Konzentrationen im ng bis µg L^{-1}-Bereich nachgewiesen (Heemken et al., 2001; Spengler et al., 2001; Heisterkamp et al., 2004; Rodriguez-Mozaz et al., 2004). Rodriguez-Mozaz et al. (2004) wiesen BPA in niedrigen ng L^{-1}-Konzentrationen

auch im Grund- und Trinkwasser nach. In der Nordsee konnten Heemken et al. (2001) BPA im tidebeeinflussten Elbemündungsbereich mit 7 bis 249 ng L^{-1} quantifizieren.

Aufgrund der geringen Halbwertszeit und eines log K_{OW}-Wertes, der je nach Literaturangabe zwischen 2,2 und 3,8 liegt (Leisewitz und Schwarz, 1997), ist nur von einer geringen bis moderaten Sorption an Sedimenten und Schwebstoffen auszugehen. Ying et al. (2003) zeigten, dass BPA im Vergleich zu Alkylphenolen, natürlichen und synthetischen Steroiden nur schwach an Sediment bindet. Aufgrund der hohen Produktionsmengen ist aber trotz der geringen Halbwertszeit und schwachen Bioakkumulation von einer Relevanz für die aquatische Umwelt auszugehen.

3.1.4 Bedeutung und Vorkommen von Phytoestrogenen

Phytoestrogene sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die strukturell den natürlichen, endogenen Steroidhormonen ähneln. In der Pflanze selbst haben diese Inhaltsstoffe vielfältige Funktionen. Sie dienen beispielsweise als Blätterschutz oder sind am Zellaufbau beteiligt. Phytoestrogene sind in der Lage, bei Wirbeltieren estrogen zu wirken, das heißt als Estrogen-Agonisten aufzutreten. Sie können aber auch anti-estrogen und damit antagonistisch wirken, weshalb sie auch als selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) bezeichnet werden (Ososki et al., 2003). Das Blockieren von Estrogenrezeptoren durch die im Vergleich zu E2 schwächer estrogen wirksamen Phytoestrogene führt in dem Fall dazu, dass estrogene Aktivität vermindert bzw. verhindert wird (Brzezinski und Debi, 1999). Das Auftreten als Agonist oder Antagonist ist abhängig vom Zellgewebe, vom Estrogenrezeptor und von der Konzentration zirkulierender endogener Estrogene (Gruber et al., 2002). Bei hohen Konzentrationen von zirkulierenden endogenen Estrogenen entfalten sie eine antagonistische Wirkung, da sie die Rezeptoren für Estrogene höherer Wirkungskraft blockieren. Bei niedrigen Estrogenspiegeln (z.B. in der Menopause) kommt es hingegen zu einer agonistischen Wirkung. Die Entdeckung eines zweiten Estrogenrezeptor-Subtypes ERβ führte dazu, dass Verständnis von organselektiven Wirkungen von Estrogenen weiter voran zu bringen (Kuiper et al., 1996; Mosselmann et al., 1996).

Im Zusammenhang mit der Wirkungsweise von Phytoestrogenen wurde festgestellt, dass diese eine höhere Bindungsaffinität zum ERβ zeigen (Kuiper et al., 1998).

Im Vergleich zu E2 handelt es sich bei Phytoestrogenen also um schwache Estrogene, die eine um mehrere Größenordnungen niedrigere estrogene Wirkstärke aufweisen (Gruber et al., 2002). Ihre zum Teil sehr hohen Konzentrationen in bestimmten Pflanzenarten können jedoch dazu führen, dass, in Abhängigkeit der menschlichen Ernährungsweise, die Plasmaspiegel von Phytoestrogenen die der endogenen Steroide um Größenordnungen übersteigen und damit im Bereich von Wirkkonzentrationen liegen können (Safe, 1995).

Die Phytoestrogene werden in verschiedene Klassen eingeteilt: steroide Estrogene, die nur in wenigen Pflanzen vorkommen und die ubiquitär vorkommenden phenolischen Estrogene mit den größten Substanzgruppen der Isoflavone, Coumestane und Lignane. Die wichtigsten Vertreter der Isoflavone sind Daidzein ($C_{15}H_{10}O_4$) und Genistein ($C_{15}H_{10}O_5$), die auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden (vgl. Abb. 1). Diese beiden Substanzen kommen in beträchtlichen Konzentrationen in Soja und Sojaprodukten vor, aber auch in Kleesorten und anderen Leguminosen (Mazur, 1998). Ihre Wirkung auf den Hormonhaushalt ist durch die in den 40er Jahren in Australien aufgetretene so genannte Klee-Krankheit („clover disease“) bekannt geworden und damit in den Blickwinkel von Wissenschaft und Forschung geraten. Schafe, die auf einer Kleeweide gehalten wurden, zeigten starke Reproduktionsstörungen, welche auf die vermehrte Aufnahme von Formononetin, einem Vorläufer von Daidzein, zurückgeführt wurde (Bennetts et al., 1946). Auch beim Menschen sind estrogene Wirkungen, wie verlängerte follikuläre Zyklusphasen bei Frauen nach erhöhtem Verzehr von phytoestrogenhaltiger Nahrung, nachgewiesen (Cassidy et al., 1994). Aufgrund der niedrigeren Zellteilungsrate in der Follikelphase bei Frauen mit verlängertem Zyklus wird für diese ein geringeres Brustkrebsrisiko erwartet. Die erheblich geringere Inzidenz von Brustkrebs bei asiatischen Frauen, die durch ihre sojareiche Kost ein Vielfaches mehr an Phytoestrogenen zu sich nehmen, scheint dies zu bestätigen. Krebshemmende Wirkung und weitere positive Einflüsse von Phytoestrogenen, wie z.B. auf die Knochendichte und das kardiovaskuläre System, führt seit einigen Jahren dazu, dass vermehrt phytoestrogenhaltige

Nahrungsergänzungsmittel auf den Markt kommen und Phytoestrogene auch als Alternative zur Hormonersatz-Therapie gepriesen werden. Es ist wichtig, an dieser Stelle anzumerken, dass Wissenschaftler dies sehr kontrovers diskutieren, denn auch nachteilige Effekte, beispielsweise sogar eine Förderung von Krebserkrankungen, konnten in Untersuchungen beobachtet werden (Hsieh et al., 1998).

Ein Teil der mit der Nahrung aufgenommenen Phytoestrogene wird analog zu den endogenen Estrogenen über den Urin und die Faeces ausgeschieden und kann so über Kläranlagenausläufe in die Umwelt gelangen. In der aquatischen Umwelt können sie auch in Oberflächengewässern von Bedeutung sein, die mit Abwassern aus der holzverarbeitenden Industrie (Papier- und Zellstoffindustrie) belastet sind.

Zum Vorkommen von Phytoestrogenen in Kläranlagenausläufen und Oberflächengewässern liegen nur sehr wenige Daten vor. In unbehandelten und behandelten Abwässern einer Papier- und Zellstofffabrik in Ontario (Kanada) quantifizierten Kiparissis et al. (2001) Genistein in Konzentrationen von 13,1 bzw. 10,5 µg L^{-1}. Spengler et al. (2001) konnten Genistein in 60% ihrer untersuchten Kläranlagenausläufe mit einer Median-Konzentration von 7,6 ng L^{-1} nachweisen. In Japan identifizierten Kawanishi et al. (2004) Genistein als hauptverantwortliche Substanz für die Estrogenität einer Flusswasserprobe und quantifizierten Genistein und Daidzein mit hohen Konzentrationen von 143,4 bzw. 42,9 µg L^{-1}.

Kalkulierte Log K_{OW}-Werte mit 2,8 bzw. 2,55 für Genistein und Daidzein (K_{OW} Win, 1999) lassen nur eine geringe Sorptionsneigung an Sedimenten, Klärschlamm und Schwebstoffen vermuten. Eine signifikante Bioakkumulation wird daher nicht erwartet.

3.2 Bestimmung estrogener Wirksamkeit mit Hilfe biologischer Testsysteme

Ob eine Substanz bzw. eine Umweltprobe estrogen wirksam ist und wie hoch ihre estrogene Potenz ist, kann nur mit biologischen Testverfahren festgestellt werden. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden bisher zahlreiche *in vivo*- und *in vitro*-Testverfahren entwickelt, von denen die Wichtigsten nachfolgend kurz beschrieben werden. Umfangreiche Übersichten zu *in vivo*- und *in vitro*-Assays sind unter anderem bei folgenden Autoren erschienen: Reel et al. (1996), Gülden et al. (1997), Zacharewski (1997), Holmes et al. (2001) und Scrimshaw und Lester (2004). Der in der vorliegenden Arbeit angewendete Hefezelltest („yeast estrogen screen“, YES) wird in Kapitel 3.2.2 ausführlicher erläutert.

3.2.1 *In vivo*-Assays

Je höher die biologische Komplexität eines Testsystems, desto höher gilt die Aussagekraft und Übertragbarkeit der Ergebnisse auf natürliche Systeme. Da *in vivo*-Methoden traditionell seit Jahrzehnten angewendet werden, gibt es viele anerkannte Tests, die auf einer umfangreichen guten Datengrundlage basieren und für Toxizitäts- und Risikobewertungen herangezogen werden. Die Vorteile von *in vivo*-Methoden liegen insbesondere darin begründet, dass sie biologische Funktionen wie Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion mit berücksichtigen. Mit ihrer Anwendung wird ein breiter Bereich von physiologischen Mechanismen abgedeckt.

Zu den ältesten und klassischen Estrogentests gehören der Allen-Doisy-Test (Allen und Doisy, 1923) und der Uterusgewicht-Test bei Nagetieren (Bülbing und Burn, 1935). Beide Tests basieren auf der Funktion von Estrogenen, im Verlauf des Brunstzyklus eine Verdickung und Verhornung des Scheidenepithels und ein Wachstum des Uterus zu induzieren. In den Tests werden bei juvenilen oder kastrierten Ratten oder Mäusen, das heißt bei Tieren, die selbst keine Estrogene produzieren, diese Funktionen durch die Gabe von estrogen wirksamen Verbindungen hervorgerufen. Bei dem Eileitergewicht-Test (Dorfman und Dorfman, 1953) werden estrogene Testsubstanzen juvenilen Vögeln mit dem Futter über mehrere Tage bis Wochen verabreicht. Bei einer estrogenen Wirksamkeit kommt es durch eine intensive Zellteilung zu einer Gewichtszunahme

des Eileiters. Nach der neonatalen Injektion von Estrogenen kommt es zu einer frühzeitigen Geschlechtsentwicklung bei weiblichen Ratten und Mäusen, während die Injektion bei geschlechtsreifen Tieren Störungen des Reproduktionszyklus und Ovulationsstörungen auslöst. Nicht nur direkt schädigende Wirkungen auf die Sexualorgane, sondern auch Veränderungen der Hypothalamus-Hypophysenfunktionen konnten Gellert et al. (1974) mit diesem Test für o,p'-DDT beobachten. Dass die Geschlechtsdifferenzierung bei vielen Reptilien von der Inkubationstemperatur der Eier abhängig ist, wird sich in einem weiteren *in vivo*-Assay zunutze gemacht. Werden während der Phase der Geschlechts-differenzierung estrogen wirksame Substanzen auf die Eischale appliziert, wird auch bei Temperaturen, die sonst männliche Nachkommen entstehen lassen würden, die Entwicklung von Ovarien induziert (Bergeron et al., 1994; Wibbels und Crews, 1992). Auch die Geschlechtsdifferenzierung bei Vögeln in Abhängigkeit von der Exposition mit Estrogenen ist Gegenstand von Untersuchungen. In Vogeleier injizierte Estrogene führen zu einer Verweiblichung des männlichen Embryos, die sich in der gleichzeitigen Ausprägung von Gonaden und Eileitern zeigt. Dies wurde unter anderem für die Exposition von Seemöwen mit o,p'-DDT, p,p'-DDT und Methoxychlor von Fry und Toone (1981) festgestellt. Vitellogenine, die als spezielle Lipoproteine in der Leber von eierlegenden Tieren synthetisiert werden, sind als Vorstufe des Eidotters in der Regel nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen in juvenilen und männlichen Tieren nachweisbar. Die Synthese von Vitellogenin erfolgt allerdings auch in männlichen Tieren, wenn diese estrogen wirksamen Substanzen exponiert sind. Der Nachweis von Vitellogenin im Blutplasma männlicher Fische gilt daher als anerkannter Biomarker zur Erfassung von estrogener Wirksamkeit von Testsubstanzen und Umweltproben (Purdom et al., 1994; Sumpter and Jobling, 1995).

3.2.2 *In vitro*-Assays

Die Anwendung von *in vitro*-Assays ist vor allem dann besonders sinnvoll, wenn zahlreiche Testsubstanzen oder Umweltproben für ein erstes Screening schnell und kostengünstig untersucht werden müssen (Gray et al., 1997).

Die Synthese von Vitellogenin kann dabei auch Basis eines *in vitro*-Testsystems sein. Als Nachweis für Estrogenität gilt die Vitellogeninsynthese in estrogen-exponierten Leberzellkulturen von Fröschen oder Fischen (Pelissero et al., 1993). Die Messung der Rezeptorbindung von Xenoestrogenen in estrogenrezeptor-reichen Geweben oder Zellen kann mit Hilfe eines Kompetitionstests, der auf der Verdrängung von gebundenem, isotopenmarkiertem ^{3}[H]-17β-Estradiol basiert, erfolgen (Nelson, 1974; White et al., 1994; Jobling et al., 1995). Rezeptor-bindungstests wurden entwickelt, um einen hohen Probendurchsatz einfach und schnell zu untersuchen. Sie gelten als robust sowie vergleichsweise kostengünstig und werden daher oft für ein erstes Screening eingesetzt. Als Beispiel sei hier auch der von Hock und Seifert (1998) entwickelte Enzyme-Linked-Receptor-Assay (ELRA) genannt, der auf dem Prinzip des indirekten kompetitiven Enzymimmunoassays (ELISA) basiert. Ein anderer Kompetitions-Assay basiert auf der Fluoreszenzpolarimetrie. Gemessen wird hier die Fähigkeit einer Testsubstanz, an den Estrogenrezeptor zu binden und damit einen fluoreszierenden Liganden aus dem Liganden-Rezeptor-Komplex zu verdrängen (Bolger et al., 1998). Das Ziel von Bindungstests besteht darin, festzustellen, ob eine Substanz am Rezeptor bindet oder nicht. Eine Aussage, ob es sich hierbei um eine agonistische oder antagonistische Substanz handelt, kann mit Rezeptor-bindungstests also nicht getroffen werden. Das Prinzip von DNA-Bindungsassays, wie sie von Cheskins et al. (1997) entwickelt wurden, beruht auf der Tatsache, dass der Estrogenrezeptor nur in aktiviertem Zustand, das heißt, wenn seine Bindungsstelle mit einem Liganden besetzt ist, an das spezifische DNA-Element („estrogen response element“, ERE) bindet.

Zellbasierte Testansätze, in denen sowohl die Rezeptorbindung, als auch die transkriptionale Aktivität berücksichtigt werden, sind nachfolgend beschrieben. Der Endpunkt des von Soto et al. (1992) entwickelten so genannten E-Screen-Assays ist die durch eine Testsubstanz oder Probe induzierte Proliferationsrate einer Estrogenrezeptor-positiven Brustkrebszelllinie (MCF-7) im Vergleich zu einer hormonfreien Kontrolle. Das hier zugrunde liegende Testprinzip lässt sich auch auf Zelllinien übertragen, die natürlicherweise weder den Estrogenrezeptor noch die weiteren für eine Zellantwort notwendigen zellulären Komponenten enthalten. Das Einschleusen (Transfektion) von Genen in Bakterien, Hefen oder Säugetierzellen

ermöglicht es, estrogensensitive Testsysteme herzustellen. Am häufigsten wurden Tests mit transfizierten Hefezellen entwickelt, so unter anderem von Klein et al. (1994, 1995), Arnold et al. (1996) und Routledge und Sumpter (1996). Der in der vorliegenden Arbeit angewendete Hefezelltest (Abb. 4) basiert auf dem von Routledge und Sumpter entwickelten so genannten Yeast Estrogen Screen (YES). In rekombinante Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde (1) ein Gen eingeschleust, welches den menschlichen Estrogenrezeptor hERα exprimieren kann, und (2) ein Reporterplasmid transfiziert, welches neben dem Reportergen für das Enzym β-Galactosidase (*lac*Z-Gen) auch das Estrogenrezeptor-bindende DNA-Element (ERE) besitzt. Bindet eine estrogen wirksame Substanz an den Rezeptor, wird dieser aktiviert und an das ERE gebunden. Die Bindung des Ligand-Rezeptor-Komplexes an das ERE führt zur Transkription des *lac*Z-Reportergens und somit zur Synthese von β-Galactosidase. Dieses Enzym metabolisiert die gelbe Substanz Chlorphenol-rot-β-D-galactopyranosid (CPRG) in den roten Farbstoff Chlorphenolrot (CPR). Der Farbumschlag kann mit Hilfe von Absorptionsmessungen erfasst werden.

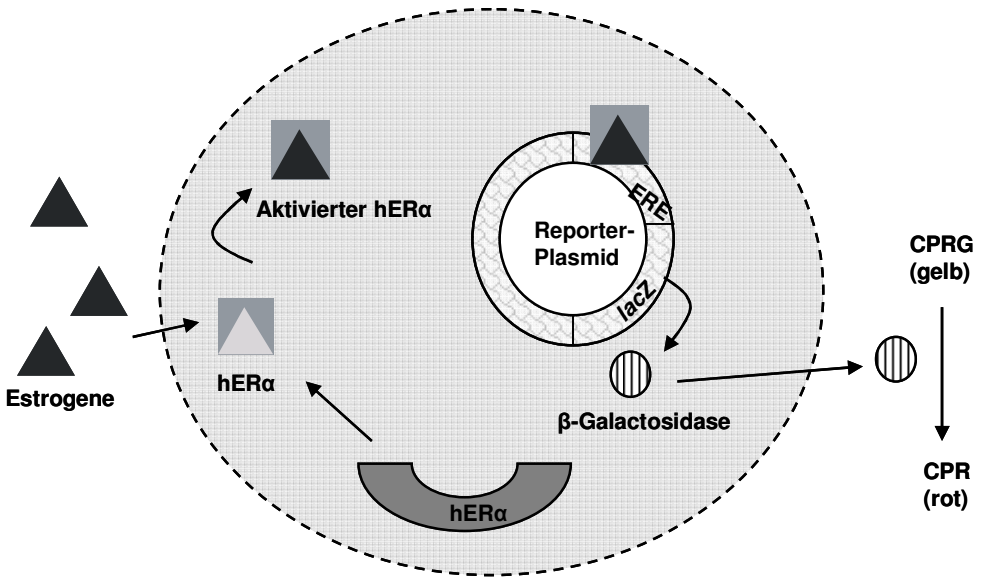


Abb. 4: Schematische Darstellung der estrogen-induzierten Farbreaktion im Hefezelltest (YES). (hERα: Estrogenrezeptor, *lac*Z: Reportergen *lac*Z, ERE: estrogen response element, CPRG: Chlorphenol-rot-β-D-galactopyranosid, CPR: Chlorphenolrot).

Die Verwendung des Reportergens für β-Galactosidase ist dabei nur eine Möglichkeit. In einem von Klotz et al. (1996) entwickelten Assay wurden estrogensensitive Zellen (Brustkrebszelllinie MCF-7) mit einem Reportergen transfiziert, welches beispielsweise Luziferasen codiert. Zellbasierte Testsysteme haben den Vorteil, dass sie wichtige biologische Funktionen, wie die Membranpassage der Testsubstanzen und/oder Proteinbindung mit berücksichtigen (Oosterkamp et al., 1997).

3.3 Estrogenes Wirkpotenzial in Abhängigkeit von Analyt und Testsystem

Vergleichende Studien zur Nachweisstärke von *in vitro*-Testsystemen und zu relativen Wirkpotenzialen von ausgewählten Estrogenen wurden u.a. von Andersen et al. (1999), Fang et al. (2000), Gutendorf und Westendorf (2001) und Schultis (2005) durchgeführt, auf die sich die nachfolgenden Aussagen beziehen. Im Allgemeinen wird festgestellt, dass Testsysteme, die auf Säugetierzelllinien basieren, um ca. eine Größenordnung empfindlicher sind, als beispielsweise Hefezelltests. Gegenüber Rezeptorbindungstests zeigen wiederum die zellbasierten Hefeassays eine höhere Sensitivität. Die für eine Reihe von Estrogenen ermittelten relativen estrogenen Wirkstärken differieren je nach Studie und angewendetem Testsystem, doch gilt generell, dass natürliche und synthetische Steroidhormone die mit Abstand höchsten estrogenen Aktivitäten aufweisen. Xenoestrogene und Phytoestrogene haben im Vergleich ein um Größenordnungen niedrigeres estrogenes Wirkpotenzial, was auch in Übereinstimmung mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ist (vgl. Publikation II).

Folmar et al. (2002) verglichen in ihrer Studie auch die Empfindlichkeit von *in vitro*-Assays mit *in vivo*-Expositionsstudien. Für die natürlichen und synthetischen Estrogene zeigten sich vergleichbare Wirkstärken, wohingegen für Xenoestrogene in der *in vivo*-Studie deutlich höhere Potenzen als in den *in vitro*-Tests ermittelt wurden. Auch diese Studie belegt, dass *in vitro*-Testsysteme gut geeignet sind, um im Rahmen von Risikoabschätzungen für erste Testserien herangezogen zu werden, die aber bei einem Hinweis auf estrogene Aktivität durch langfristige Studien an Tieren (z.B. Full Life Cycle Test) erweitert werden müssen. Die meist höhere Sensitivität, die Berücksichtigung von wichtigen Metabolisierungs-reaktionen, Veränderungen der Bioverfügbarkeit und sensiblen Zeitfenstern in der Organismusentwicklung sind hierfür entscheidende Kriterien.

3.4 Spurenanalytik von Estrogenen in wässrigen Matrices

In der Umweltanalytik folgt nach der Probenvorbereitung, die die Anreicherung, Extraktion und Aufreinigung umfasst, die analytische Bestimmung, bei der in der Regel die chromatographischen Methoden Gaschromatographie und Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit verschiedenen Detektionen, wie UV-Absorption, elektrochemische Detektion, Fluoreszenz-Detektion und Massenspektrometrie gekoppelt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein spurenanalytisches Verfahren entwickelt werden, welches mit seinem universellen Charakter ein möglichst breites Substanzspektrum erfasst und damit den Ansatz eines „non-target"-Verfahrens verfolgt. Die Probenaufarbeitung wurde also nicht auf die gezielte Bestimmung einiger weniger, sich ähnelnder Substanzen ausgerichtet („target"-Analytik), sondern auf die Erfassung einer Gruppe von Substanzen mit verschiedenen chemisch-physikalischen Eigenschaften, um die Vielfalt an umweltrelevanten Estrogenen so weit wie möglich zu berücksichtigen.

3.4.1 Probenanreicherung

Ein Ziel der Probenvorbereitung ist die selektive Anreicherung von ausgewählten Substanzen bei gleichzeitiger Abtrennung von störenden Begleitstoffen, der so genannten Matrix. Für die Extraktion von Analyten aus Wasserproben werden vor allem zwei Verfahren angewendet: die Flüssig-Flüssig-Extraktion („liquid-liquid extraction", LLE) und die Festphasenextraktion („solid phase extraction", SPE). Die LLE basiert auf der Verteilung der Analyte zwischen der wässrigen Phase und einem mit dem Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel.

Bei dem in der vorliegenden Arbeit angewendeten Verfahren der SPE erfolgt die Anreicherung der Analyte aufgrund der Adsorption der Analyte an einem ausgewählten Festphasenmaterial, dem Adsorbens. Die Probe wird durch die Festphase gedrückt oder gezogen, wobei die Analytmoleküle mit der Festphase in Wechselwirkung (Van-der-Waals-Kräfte, Dipol-Dipol-Wechselwirkung, Wasserstoffbrückenbindung) treten und festgehalten werden. Gleichzeitig werden störende Begleitstoffe abgetrennt. Eine weitergehende Aufreinigung kann nachfolgend mit Hilfe von Waschlösungen erzielt werden. Die Analyte werden

anschließend mit einem geeigneten Elutionsmittel, in der Regel organische Lösungsmittel, von der Festphase gelöst und eluiert. Die SPE hat mit der Möglichkeit, höhere Anreicherungsfaktoren zu erzielen, dem deutlich geringeren Lösungsmittelverbrauch, der großen Zeitersparnis und der Möglichkeit der Automatisierung große Vorteile gegenüber der klassischen LLE und hat sich daher in vielen Anwendungsgebieten inzwischen durchgesetzt (Tölgyessy und Liska, 1999). Daneben kann durch Variation der chromatographischen Bedingungen eine selektivere Anreicherung der Analyte erfolgen.

Für die Vielzahl von analytischen Fragestellungen steht auch eine Vielzahl von Adsorbentien zur Verfügung. Bei der Anreicherung von Estrogenen aus Wasserproben werden häufig Kieselgel basierte Umkehrphasen („reversed phase“) eingesetzt (Spengler et al., 1999; Ternes et al., 1999a; Ternes et al., 1999c; Bolz et al., 2000; Kelly, 2000; Adler et al., 2001; Benijts et al., 2002; Takasu et al., 2002; Anderson et al., 2003; Ingrand et al., 2003; Williams et al., 2003; Nakada et al., 2004; Pawlowski et al., 2004; Rodriguez-Mozaz et al., 2004; Quirós et al., 2005). Die Kieselgeloberfläche ist bei diesen Phasen mit unpolaren Alkylketten, in der Regel Octadecyl-Ketten (C_{18}), belegt, die aufgrund der sich ausbildenden unpolaren Wechselwirkungen die Analyte retardieren. In den letzten Jahren kommen zunehmend auch Festphasen auf Polymerbasis zur Anwendung (Belfroid et al., 1999; Larsson et al., 1999; Snyder et al., 1999; Kuch und Ballschmiter, 2001; López de Alda und Barceló, 2001b; Isobe et al., 2003; Vanderford et al., 2003; Benijts et al., 2004a; Brossa et al., 2004; Jahnke et al., 2004; Lagana et al., 2004; Quintana et al., 2004). Diese Polymerphasen besitzen eine hohe Retentionskapazität und eignen sich aufgrund ihrer polaren und unpolaren Eigenschaften für ein breiteres Substanzspektrum. Sie kommen daher insbesondere für den Einsatz von Multimethoden, das heißt für die simultane Bestimmung von Substanzen mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften, in Frage. Das in der vorliegenden Arbeit für die Anreicherung von Estrogenen aus Oberflächenwasser verwendete Copolymer Oasis HLB (Hydrophilie-Lipophilie-Balance, HLB; Fa. Waters) besteht aus zwei monomeren Komponenten, dem lipophilen Divinylbenzol und dem hydrophilen N-Vinylpyrrolidon. Aufgrund des hydrophilen N-Vinylpyrrolidons ist die Oasis HLB-Festphase wasserbenetzbar. Die Kapazität zur Retention bleibt daher auch nach

einem Trockenlaufen der Kartusche gewährleistet, was für die Probenvorbereitung einen nicht zu unterschätzenden Vorteil darstellt.

3.4.2 Aufreinigung der Extrakte

Bei der Festphasenextraktion wird zwar bereits ein Großteil unerwünschter Probenbestandteile abgetrennt, doch ist das für stark matrixbelastete Proben oft nicht ausreichend. Um Probenextrakte aufzureinigen, gibt es eine Vielzahl von so genannten Cleanup-Verfahren. Neben der LLE ist vor allem die Adsorptions-chromatographie mit Aluminiumoxid, Kieselgel oder Florisil weit verbreitet. Zur Aufreinigung von Extrakten kommt häufig auch die Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) zur Anwendung. Bei der auch als Größenausschluss-chromatographie bezeichneten GPC besteht die Festphase aus einem gelartigen Polymer mit unterschiedlichen Porengrößen. Die Probenmoleküle diffundieren in Abhängigkeit ihrer Größe unterschiedlich weit in die Poren hinein und werden so entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine ergänzende Abtrennung von Matrixkomponenten mit Hilfe einer Aufreinigung der Extrakte an Kieselgel erzielt.

3.4.3 Chromatographie

Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie („high performance liquid chromatography“, HPLC) und die Gaschromatographie (GC) sind die in der Spurenanalytik von Estrogenen am häufigsten eingesetzten Trennmethoden. Die Trennung komplexer Stoffgemische erfolgt aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkungen der Analyte mit einer mobilen und einer stationären Phase.

Die GC ist geeignet für die Auftrennung thermostabiler, flüchtiger Analyte. Die stationäre Phase (oft Polysiloxan, je nach Material mit Methyl-, Phenyl- und anderen Gruppen modifiziert) befindet sich als dünner Film an der Innenseite einer Kapillarsäule. Die Säule wird von einer mobilen Phase, dem Trägergas (Helium, Wasserstoff oder Stickstoff), durchströmt, in welches die gasförmigen Analyte injiziert werden. Für die Auftrennung mittels GC werden Estrogene als Substanzen mittlerer Polarität in der Regel vorher derivatisiert. Das Ziel ist dabei unter anderem die Überführung in unpolarere und flüchtigere Verbindungen mit der

damit verbundenen Möglichkeit der gaschromatographischen Auftrennung. Zu den wichtigsten Derivatisierungen zählen die Silylierung, die Acylierung und die Alkylierung (Syhre et al., 1996). Die erforderlichen Derivatisierungsschritte sind aufwendig und schließen durch ihre Selektivität eine „non-target"-Analytik aus. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Selektivität wird die GC in der Spurenanalytik in der Regel mit der massenspektrometrischen Detektion (siehe Kapitel 3.4.4) gekoppelt.

Die HPLC kommt zur Auftrennung von in Flüssigkeit gelösten Stoffgemischen zur Anwendung. Im Vergleich zur GC eignet sie sich vor allem für temperaturempfindliche, schwerer verdampfbare, polarere und höhermolekulare Substanzen. Das Trennsystem besteht aus einer flüssigen mobilen Phase, in die die Probe injiziert wird, und einer sich in einer Trennsäule befindlichen stationären Phase. Die Auftrennung von Analyt und anderen Probenbestandteilen erfolgt aufgrund von reversiblen Wechselwirkungen des Analyten mit der Oberfläche der festen Phase, der so genannten Retention. Je nach Polarität der stationären Phase werden in der HPLC grundsätzlich zwei Verfahren voneinander unterschieden: die Normalphasen- („normal phase", NP-) HPLC mit polaren stationären Phasen, wie Kieselgel oder Aluminiumoxid in Kombination mit unpolaren Lösungsmitteln (z.B. Hexan) und die Umkehrphasen- („reversed phase", RP-) HPLC mit unpolar modifizierten stationären Phasen. In der RP-HPLC werden am häufigsten C_8- oder C_{18}-Phasen eingesetzt, bei denen die polaren Silanolgruppen des Kieselgels mit apolaren Alkylketten modifiziert sind. Als Laufmittel kommen bei der RP-HPLC polare Lösungsmittel wie Wasser, Methanol oder Acetonitril zum Einsatz. Für die Vermessung der Proben wurde in der vorliegenden Arbeit eine C_{18}-Phase mit polarem „endcapping" verwendet, um eine Retention von sowohl hydrophoben als auch polaren Analyten zu erreichen. Unpolare Wechselwirkungen wie Van-der-Waals-Kräfte und polare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen bewirken hier die substanzspezifische Retention. Die Kopplung von HPLC mit der Massenspektrometrie erlaubt eine empfindliche, selektive Bestimmung von Estrogenen und hat sich neben der GC-MS in den letzten Jahren zu einer der am häufigsten eingesetzten Messmethode entwickelt (López de Alda et al., 2003).

3.4.4 Massenspektrometrie

Ein Massenspektrometer (MS) setzt sich prinzipiell aus einem Einlasssystem (Ionenquelle), einem Trennsystem (Massenanalysator) und einem Detektor zusammen. Die zu analysierende Probe wird in das MS eingebracht, verdampft und ionisiert. Als bewegte geladene Teilchen lassen sich die Ionen in einem Analysator nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) auftrennen und anschließend detektieren.

Im Folgenden werden die Charakteristika des in dieser Arbeit eingesetzten Tandem-Massenspektrometers (API 4000, Fa. Applied Biosystems), verschiedene Ionisierungstechniken, sowie die Problematik von in der LC-MS-Analytik auftretenden Matrixeffekten beschrieben.

In dem hier verwendeten Quadrupol-MS werden die Ionen durch die Anordnung von vier parallelen stabförmigen Metallelektroden (Quadrupol), an denen eine Kombination aus Gleich- und Wechselspannung angelegt ist, auf einer stabil oszillierenden Bahn geleitet. Ionen, die von dem vordefinierten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis abweichen, fliegen auf einer instabilen Bahn und werden durch Zusammenstöße mit den Metallstäben neutralisiert.

Mit der Ionisierung bei Atmosphärendruck („atmospheric pressure ionisation“, API) wurde eine herausragende Kopplung von Flüssigchromatographie und dem Hochvakuumbereich des Massenspektrometers entwickelt (Niessen, 1998; Reemtsma, 2001). Mit Hilfe der Ionenquelle („Interface“) wird der Eluentenstrom aus der HPLC verdampft und die Analyte ionisiert. Man unterscheidet unter anderem die Elektrospray-Ionisierung („electrospray ionisation“, ESI), die chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck („atmospheric pressure chemical ionisation“, APCI) und die Photoionisierung („atmospheric pressure photo ionisation“, APPI). Um die Effizienz des Ionisierungsprozesses zu verbessern, ist es bei der ESI weit verbreitet, dem Eluenten ein Ionisierungshilfsmittel (z.B. Ameisensäure, Essigsäure, Ammoniumformiat oder Ammoniumacetat) zuzusetzen. Die genannten Ionisierungsformen liefern insbesondere bei der ESI neben Quasimolekül-Ionen $[M+H]^+$ bzw. $[M-H]^-$ auch Na^+-, K^+- oder NH_4^+-Addukte oder NaCl-Cluster (Hogenboom et al., 2001).

Bei der APCI wird der Eluentenstrom zunächst in die Gasphase überführt und mittels einer Korona-Entladungsnadel („corona discharge needle“) Ionen erzeugt. Der Ionisierungsprozess erfolgt schließlich durch einen Elektronentransfer von Ionen der Lösungsmittelmoleküle oder von Gasionen auf die Analytmoleküle. Die eingestellte Temperatur wirkt hier im Gegensatz zur ESI oder APPI direkt auf die sich in der Gasphase befindenden Moleküle. Die thermische Belastung ist bei der APCI demnach größer und somit ist diese Ionisierungstechnik für thermolabile Substanzen weniger geeignet.

Die erst seit wenigen Jahren zur Verfügung stehende APPI wurde mit dem Ziel entwickelt, dass mit LC-MS zu erfassende Substanzspektrum um Analyte mit geringer Polarität zu erweitern. Die Ionisierung wird durch Photonen induziert, die von einer UV-Lampe emittiert werden. Zum Eluentenstrom wird hier in der Regel ein Dopant, häufig Toluol, zugegeben, welcher durch Photonenabsorption ionisiert wird. Die so gebildeten Toluol-Kationen übertragen ihre Ladung auf die Analyt-Moleküle und steigern damit die Ionisierungseffizienz. Die APPI ist aufgrund ihrer Selektivität für Substanzen geringer Polarität, für ein Substanzspektrum mit breitem Polaritätsbereich, wie es in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, weniger geeignet.

Die ESI gilt im Vergleich zur APCI als schonende Ionisierungstechnik und wird aus diesem Grund häufig eingesetzt. Sie wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet und wird im Folgenden detaillierter beschrieben (Abb. 5).

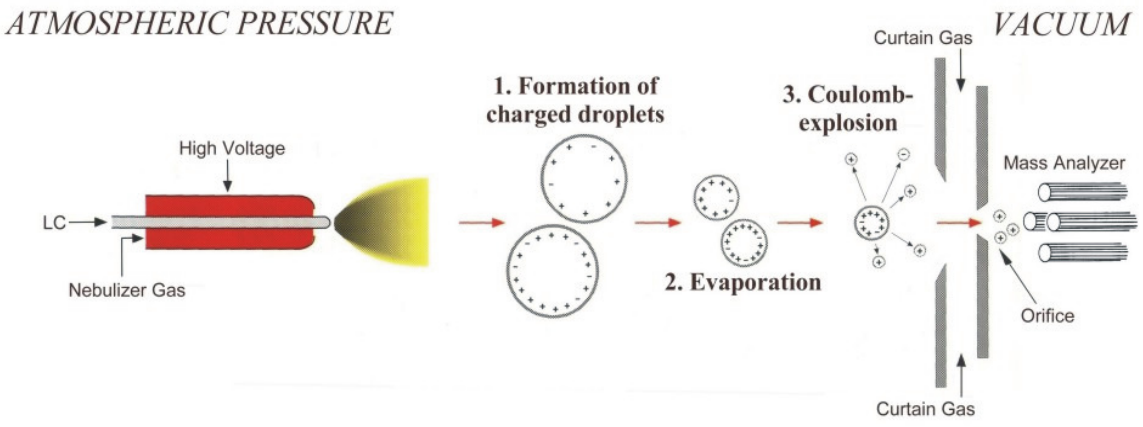


Abb. 5: Prinzip der Elektrospray-Ionisierung (ESI) (Applied Biosystems, 2002).

Bei der ESI wird der Flüssigkeitsstrom aus der HPLC durch eine feine Metallkapillare geleitet, versprüht und mit Hilfe der dort anliegenden Hochspannung („Ionspray"-Spannung, IS) ionisiert. Je nach Polarität der anliegenden Spannung wird ein positiver oder negativer Ladungsüberschuss erzeugt. Um ein gleichmäßiges Spray zu erzeugen, wird der Sprühvorgang durch ein Trocknungsgas („Nebulizer"-Gas) unterstützt. Ein weiteres Trocknungsgas, bestehend aus einem beheizten Stickstoffstrom („Turbo"-Gas, ist in Abb. 5 nicht dargestellt), der koaxial auf den Sprühkegel gerichtet ist, beschleunigt den Verdampfungsprozess und ermöglicht damit auch die Anwendung von höheren Flussraten und einem hohen Wasseranteil im Eluenten. Die Selbstabstoßung der elektrostatisch geladenen Tröpfchenoberfläche nimmt mit Verringerung der Tröpfchengröße zu, bis diese schließlich die Oberflächenspannung übersteigt und es zu wiederholten so genannten „Coulomb-Explosionen" kommt. Die Molekül-Ionen werden so in die Gasphase transferiert (Desolvatisierung) und über ein Spannungs- und Vakuumgefälle in den Massenanalysator geleitet. Zu den Details im Prozess der Ionenbildung gibt es verschiedene Theorien, die unter anderem bei Gaskell (1997), De la Mora et al. (2000) und Kebarle (2000) nachzulesen sind.

Das verwendete Tandem-MS besteht aus 3 Quadrupolen („triple stage quadrupole"-Tandem-MS), wovon der erste (Q1) und der dritte (Q3) als Massenfilter funktionieren. Der mittlere Quadrupol (Q2) kann als so genannte Stoßzelle arbeiten, in der die durch den ersten Massenfilter selektierten Vorläufer-Ionen („precursor ions") durch Stöße mit Stickstoffmolekülen, dem Kollisionsgas („collision activated dissociation", „CAD"-Gas), fragmentiert werden. Die entstehenden Produkt-Ionen („product ions") können im nachgeschalteten Massenfilter aufgetrennt werden. Mit dem auch als Triple-Quadrupol-MS bekannten MS können als Tandem-MS vier verschiedene Messtechniken angewendet werden.

Im „Product-Ion Scan" wird im Q1 ein Vorläufer-Ion selektiert, im Q2 fragmentiert und das Spektrum der Fragmente im Q3 aufgetrennt. Die substanzspezifische Fragmentierung kann Informationen über die Struktur des Analyten liefern.

Der „Precursor-Ion Scan" wird häufig für die Metabolitaufklärung eingesetzt. Die Ionen werden ohne Selektion durch den Q1 geleitet und werden im Q2 fragmentiert. Über die im Q3 selektierten Masse/Ladungsverhältnisse kann mit

Hilfe der so ausgewählten Fragmente auf die dazugehörigen Vorläufer-Ionen geschlossen werden.

Im „Neutral Loss Scan“-Modus werden Ionen nur dann vom Detektor aufgezeichnet, wenn ein Produkt-Ion erzeugt wurde, welches eine zu einem Vorläufer-Ion charakteristische Massendifferenz aufweist.

In der quantitativen Analytik wird aufgrund der Selektivität und Empfindlichkeit am häufigsten der „Multiple Reaction Monitoring“-Modus angewendet (Abb. 6).

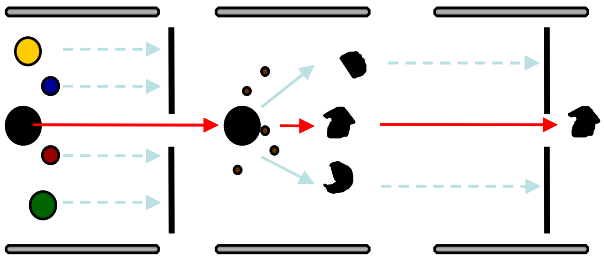


Abb. 6: Verwendete Messtechnik: Das „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM) (Applied Biosystems, 2002).

Im Q1 ausgewählte Vorläufer-Ionen werden im Q2 charakteristisch fragmentiert und spezifische Produkt-Ionen im Q3 aufgezeichnet. Durch die Detektion dieser substanzspezifischen so genannten Massenübergänge kommt es zu einem verringerten Rauschen und damit zu einer hohen Empfindlichkeit.

Matrixeffekte in der LC-MS-Analytik

Ein Nachteil bei der Quantifizierung mittels LC-ESI-MS ist die häufig auftretende Beeinflussung der Ionisierungseffizienz und damit des massenspektrometrisch generierten Signals durch koeluierende Probenbestandteile (Kebarle und Tang, 1993). Dieser so genannte Matrixeffekt kann die Ionisierung der Ziel-Analyte verstärken oder aber unterdrücken und hat damit wesentlichen Einfluss auf die Empfindlichkeit und Richtigkeit der Messung. Der Mechanismus, der dem Matrixeffekt zu Grunde liegt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt, doch gibt es mittlerweile zahlreiche Veröffentlichungen, die die Ursachen von Matrixeffekten zu erklären versuchen (Enke, 1997; Fenn et al., 1997; Bruins, 1998; Amad et al., 2000; Constantopoulos et al., 2000; King et al., 2000; Cole, 2000; Annesley, 2003). Eine wichtige Theorie geht davon aus, dass die Analyt-Moleküle mit den

koeluierenden Matrixsubstanzen während des Ionisierungsvorgangs um die nur begrenzt vorhandenen Oberflächenladungen konkurrieren (Benijts et al., 2004b). Bei der Verwendung von LC-ESI-MS für die Untersuchung komplexer Probenmatrices wird daher der Matrixeffekt häufig thematisiert und es werden verschiedene Verfahren zu seiner Minimierung und Kompensation angewendet (Motoyama et al., 1999; Steen et al., 1999; Choi et al., 2001; Dijkman et al., 2001; Ferguson et al., 2001a; Ferguson et al., 2001b; Gangl et al., 2001; Pascoe et al., 2001; Ternes et al., 2001; Leinonen et al., 2002; Zrostlíková et al., 2002; Anderson et al., 2003; Dams et al., 2003; Ingrand et al., 2003; Liang et al., 2003; Matuszewski et al., 2003; Zöllner et al., 2003; Benijts et al., 2004b; Gomes et al., 2004; Heisterkamp et al., 2004; Jahnke et al., 2004; Souverain et al., 2004; Hu et al., 2005; Kloepfer et al., 2005). Um eine möglichst richtige und nachweisstarke Messmethode zu erzielen, ist es zunächst erforderlich, den Matrixeffekt, das heißt das Vorhandensein störender Begleitstoffe, zu minimieren. Um dies zu erreichen, werden folgende Methoden angewendet: (1) eine selektive Extraktion, (2) effiziente Probenaufreinigung, (3) optimierte Gradientenelution, (4) Verdünnung des Extraktes. Bei Multimethoden in der Spurenanalytik, das heißt bei der Parallelbestimmung von vielen Substanzen mit möglichst niedrigen Nachweisgrenzen, ist die Anwendung der oben genannten Methoden oftmals nicht oder nur unter sehr viel Zeit- und Arbeitsaufwand möglich.

Da sich die auftretenden Matrixeffekte also in der Regel nicht vollständig eliminieren lassen, müssen diese kompensiert werden. Bei konstanten Matrixeffekten können in Vorversuchen die Wiederfindungsraten der Analyte aus der zu untersuchenden Probenmatrix bestimmt werden und die Ergebnisse um diese korrigiert werden. Da sich der Matrixeffekt in der Regel allerdings sehr variabel verhält, müssen oft andere Verfahren zur Anwendung kommen.

Für komplexe Proben ist die Quantifizierung über die Standardaddition eine sehr zuverlässige Methode. Proben-Aliquote werden hier mit verschiedenen Konzentrationen der Analyte aufgestockt. Die Standardaddition ist daher sowohl zeit- und arbeitsaufwenig als auch äußerst materialintensiv und kam daher für die vorliegende Arbeit nicht in Frage.

Die Zugabe einer definierten Konzentration strukturell ähnlicher Substanzen, die mit den Ziel-Analyten koeluieren, und dem Matrixeffekt in gleicher Weise

unterliegen, ist im Gegensatz zur Standardaddition eine relativ einfach durchzuführende Maßnahme. Der Einsatz von strukturell sich derart ähnelnden Substanzen ist allerdings nur selten möglich. Isotopenmarkierte Standards wiederum sind oft sehr teuer und ihre Verfügbarkeit ist nicht für alle Ziel-Analyte gewährleistet, weshalb in der Praxis oft ein isotopenmarkierter Standard für mehrere Analyte eingesetzt wird.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Kalibrierung über externe Standards, die einem Matrixstandard zugegeben werden, durchzuführen. Dieser Matrixstandard muss der Probenmatrix exakt entsprechen, ohne dabei die Ziel-Analyte zu enthalten, was für viele umweltanalytische Fragestellungen nicht garantiert ist.

Bei der von Zrostlíková et al. (2002) entwickelten Echo-Peak-Technik folgt der Injektion der Probenlösung eine zeitlich verzögerte zweite Injektion von Standards. Jedem zu bestimmenden Analyt folgt ein korrespondierender Standard, der Echo-Peak, der damit dem nahezu gleichen Matrixeffekt unterliegt.

Der im Rahmen dieser Arbeit angewendete Ansatz zur Quantifizierung des Matrixeffektes wird nachfolgend kurz erläutert (vgl. auch Publikation I). Die Bestimmung der Analytkonzentrationen erfolgte über eine externe Kalibrierung. Bei einer externen Kalibrierung über verdünnte Standardlösungen bleibt der Matrixeffekt jedoch unberücksichtigt und wurde daher gesondert quantifiziert: Vor der LC-MS-Messung wurde jede Probe zweigeteilt. Ein Proben-Aliquot wurde unverändert vermessen, während zu dem anderen Teil eine bekannte Menge Standardlösung hinzugegeben wurde. Die Differenz aus der in der Probe bereits vorhandenen Analytkonzentration und der Konzentration in der aufgestockten Probe wurde mit der bekannten Aufstockungskonzentration verglichen. Der Matrixeffekt wurde als prozentualer Anteil der vor der Messung zugegebenen Analytkonzentration berechnet und kann auch als Wiederfindung der Messung bezeichnet werden. Für die Auswertung und Darstellung in Publikation I (Kapitel 4) wurde der Begriff der Signalsuppression verwendet, der prozentual den Anteil der unterdrückten Messsignale wiedergibt (Signalsuppression (%) = 100% - Matrixeffekt (%)).

3.5 Kombination von biologischen und chemischen Methoden

Durch die Kombination von biologischen und chemischen Untersuchungsmethoden wird versucht, die Vorteile beider zu kombinieren und damit die Aussagekraft von erzielten Ergebnissen zu erhöhen. Aus chemischen und biologischen Methoden kombinierte Verfahren wurden in den letzten Jahren in zunehmendem Maße auch für die Untersuchung von Umweltproben hinsichtlich ihres estrogenen Wirkpotenzials und der Identifizierung verantwortlicher Analyte angewendet (Petrovic et al., 2004). Oft werden Kläranlagenausläufe oder Oberflächengewässer mit Hilfe der chemischen Analytik, in der Regel GC-MS oder LC-MS, untersucht und Proben-Aliquote in ausgewählten Biotests eingesetzt (Körner et al., 2000; Fawell et al., 2001; García-Reyero et al., 2001; Huang und Sedlak, 2001; Körner et al., 2001; Fenet et al., 2003; Aerni et al., 2004; Céspedes et al., 2004; Céspedes et al., 2005; Pawlowski et al., 2004; Rutishauser et al., 2004; Quirós et al., 2005; Vermeirssen et al., 2005).

Mit dem von Schuetzle und Lewtas (1986) geprägten Begriff der Biotest-geleiteten chemischen Analyse („biotest directed chemical analysis“, BDCA) wird ein Ansatz verfolgt, der zum Ziel hat, diejenigen Substanzen zu identifizieren, die im eingesetzten Biotest eine spezifische Wirkung induziert haben. Kommt die biologische Untersuchung eines Gesamtextrakts zu einem Positivbefund, wird dieser Extrakt fraktioniert und die Einzelfraktionen sowohl chemisch als auch biologisch analysiert. Die Analyse dieser Fraktionen, die idealerweise nur eine relevante Substanz enthalten, macht dann eine Identifizierung der für den biologischen Effekt verantwortlichen Substanzen möglich. Dieses Konzept wird daher auch vor dem Hintergrund eines „non-target“-Screenings eingesetzt. Die BDCA basiert auf dem Vorgehen bei der „toxicity identification evaluation“ (TIE), welches von der amerikanischen Umweltbehörde (US-EPA) zu Beginn der 90er Jahre entwickelt wurde (Norberg-King et al., 1991; Ankley und Burkhard, 1992). Der Ansatz einer BDCA, das heißt die Kombination aus chemischer Analytik und biologischen Testverfahren einschließlich der Fraktionierung des Gesamtextrakts, wird weniger häufig verfolgt (Desbrow et al., 1998; Snyder et al., 1999; Thomas et al., 2001; Cargouët et al., 2004; Furuichi et al., 2004; Heisterkamp et al., 2004; Iwasaki et al., 2004; Kawanishi et al., 2004; Nakada et al., 2004).

4. Publikation I:

Journal of Chromatography A 1090 (2005) 98-106

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea

Iris-Constanze Beck[a,b], Regina Bruhn[a], Juergen Gandrass[a], Wolfgang Ruck[b]

[a] *GKSS Research Centre, Institute for Coastal Research, Max-Planck-Str. 1, D-21502 Geesthacht, Germany*
[b] *University of Lueneburg, Faculty of Environmental Sciences, Institute for Ecology and Environmental Chemistry, Scharnhorststr. 1, D-21335 Lueneburg, Germany*

Abstract

An analytical method has been developed for the determination of five naturally occurring estrogens (estradiol, estriol, estrone, genistein, daidzein), one synthetic hormone (ethynylestradiol) and three xenoestrogens (4-nonylphenol, 4-*tert*-octylphenol, bisphenol A) in coastal marine waters. The procedure includes a solid-phase extraction of approx. 50 L water samples on the solid-phase copolymer Oasis HLB followed by a clean-up on silica. Twenty-five percent aliquots were used for the analytical determination of the analytes using high performance liquid chromatography coupled with electrospray-ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). Calculated extraction recoveries between 52 (4-*tert*-octylphenol) and 91% (nonylphenol) were obtained for the method developed. Matrix interferences occurring during electrospray ionisation were quantified by spiking the extracts prior to the measurements. Method detection limits ranged from 0.02 (estrone) to 1 ng L^{-1} (estriol). The method was applied to determine environmental estrogens in coastal waters of the Baltic Sea. The analyses showed the presence of five compounds at levels between 0.10 (estrone) and 17 ng L^{-1} (ethynylestradiol).

Keywords: Estrogens; Xenoestrogens; Endocrine disruptors; Solid-phase extraction; HPLC-ESI-MS/MS; Matrix interferences; Marine environment; Baltic Sea

1. Introduction

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) of either natural or synthetic origin have the ability to interfere with the normal functioning of the endocrine system. Of major concern are estrogenic compounds which have the potential to influence the regulation of development and growth by mimicking endogenous hormones [1,2]. In many well-documented examples the reproduction of wildlife has been adversely affected by EDCs [3-5]. Steroid estrogens have the potential to exert estrogenic effects in the low ng L^{-1} level, whereas alkylphenolic compounds are estrogenic at µg L^{-1} concentrations [4]. The discussion about effects on human health is still controversial [2]. It is hypothesized that EDCs are associated with a decreased male reproductive capacity [6-8]. The substances enter the environment mainly through sewage treatment plant (STP) effluents due to inefficient removal rates during the wastewater treatment process [9]. Accordingly, most of the reported effects are found in the aquatic environment, especially in rivers with a high charge of domestic and industrial wastewaters. The most commonly used analytical technique for EDCs in the past has been gas chromatography with mass spectrometric detection (GC/MS) [9-16]. However, in recent years the combination of solid-phase extraction (SPE) as a fast sample preconcentration and the separation and determination with liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has become a widely-used tool for determination of estrogens and/or xenoestrogens in environmental samples [17-22]. One drawback of the electrospray mass spectrometry technique during measurements of environmental samples is the signal suppression effect, which has a negative influence on the reproducibility and accuracy of the analyses. Various approaches such as a selective extraction procedure followed by an efficient sample clean-up or the use of suitable co-eluting surrogates and standard-addition to eliminate or compensate matrix effects have been discussed [23-27].

Natural and synthetic hormones are frequently detected in sewage treatment plant effluents and receiving surface waters with concentrations ranging from pg to ng L^{-1} [11,17,28], whereas alkylphenolic compounds are found in concentrations up to µg L^{-1} [12,14,29]. In contrast, comparable analytical data for marine environments are scarce. Heemken et al. [30] determined concentrations of alkylphenols in the North Sea ranging from 1 to 84 ng L^{-1}. The natural hormone metabolite estrone could be

found at average concentrations of 52 pg L^{-1} in open-ocean water samples from tropical regions by Atkinson et al. [31].

Due to higher dilution in marine waters, the concentrations of EDCs are expected to be low and thus, direct effects of single estrogenic substances are assumed to be of minor or negligible relevance [32]. For this reason, aquatic ecosystems have received only little attention in recent years and thus there is a lack of knowledge concerning the occurrence and fate of these chemicals in marine environments [31]. Insufficient detection limits of analytical procedures for the determination of estrogenic substances in marine waters is another reason why only few data concerning contamination levels in marine environments are available. Especially in the semi-enclosed Baltic Sea, with limited water exchange, the organisms are exposed to a variety of compounds, which could lead to a background exposure, with complex effects such as e.g. a decreasing fitness of nearshore ecosystems. A histopathological assessment of the gonads of male fish using the eelpout (*Zoarces viviparous*) as sentinel species showed the presence of intersexuality at a number of locations between the Wismar Bay and the Darss Peninsula [33]. It is suggested that this is due to the exposure to endocrine disrupting compounds, but analytical data are lacking.

The most important discharger in this region is the STP of the city of Wismar. The STP was rebuilt between 1996 and 2002 for the optimised cleaning of receiving wastewaters. The municipal STP (90.000 population equivalents) has an average inflow of untreated wastewater in the range of 10.200 m^3/day. It consists of three main treatment steps: a primary mechanical clarification followed by a secondary biological treatment comprising nitrification and denitrification zones and finally a chemical clarification including a phosphate elimination step.

The current work is focussed on the natural and synthetic hormones including 17β-estradiol (E2), estrone (E1), estriol (E3) and 17α-ethynylestradiol (EE2), the phytoestrogens daidzein and genistein, the phenolic substances 4-nonylphenol (NP), 4-*tert*-octylphenol (4-*tert*-OP) and bisphenol A (BPA) and their analytical determination in the Baltic Sea. The main objectives were (i) to develop a method for the simultaneous determination of selected estrogens in coastal waters using LC-MS/MS including an extraction method that allows the preconcentration of high-volume water samples and (ii) to apply this method to samples from different locations situated in the Baltic Sea in order to provide baseline contamination data.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Standard substances were purchased from the following companies: E1, E2, E3 and EE2 from Sigma (Seelze, Germany), E2-D3 from Supelco (Taufkirchen, Germany), NP from Riedel-de Haen (Seelze, Germany), 4-*tert*-OP from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany), 4-*n*-OP from Promochem (Wesel, Germany), BPA, genistein and daidzein from Fluka (Buchs SG, Switzerland), BPA-D16 from Cambridge Isotope Laboratories (Massachusetts, USA). Stock solutions of these substances were prepared in methanol at 1 µg µL^{-1}. Calibration as well as spiking mixtures were diluted from stock solutions and generally contained all analytes including deuterated standards. Methanol SupraSolv® and ammonium acetate Fractopur® were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Dichloromethane and acetone of Picograde® quality were purchased from Promochem (Wesel, Germany). Deionised organic-free water was obtained from a Milli-Q Plus 185TM coupled to an Elix 5TM system (Millipore, Schwalbach, Germany). The solid-phase extraction sorbent Oasis HLB (divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone, 60 µm, bulk material) was supplied by Waters (Eschborn, Germany).

2.2. Sampling

High-volume water samples were collected at five locations in the Baltic Sea between 7 and 11 July 2003 and between 26 and 29 July 2004 (Fig. 1) with the research vessel “Ludwig Prandtl”.

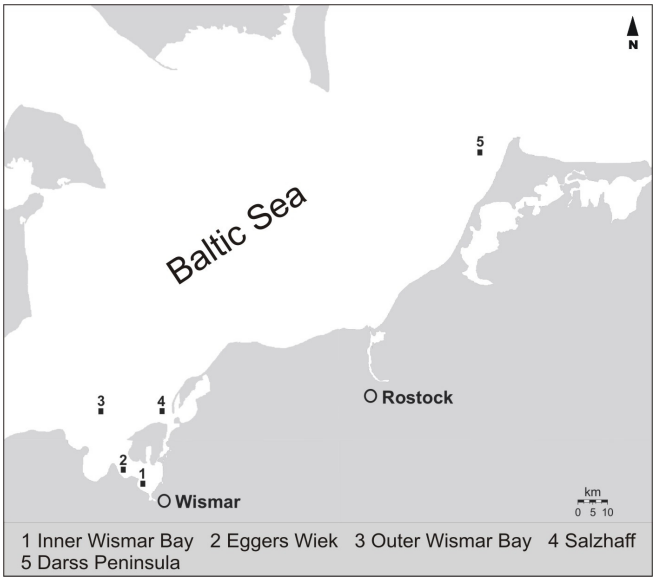


Fig. 1: Location of sampling sites in the German Baltic Sea.

All sampling sites were located in the eastern part of the German Baltic Sea. Several parameters of the water samples (pH, °C, DOC, POC, Salinity) were measured and data for both campaigns are given in Table 1.

Table 1: Characteristics of the water samples taken at five different sampling sites in the German Baltic Sea (Campaigns July 2004 and July 2003)

Sampling site	Longitude (°E)	Latitude (°N)	Temperature (°C)		pH		DOC[a] (mg L^{-1})		POC[b] (mg L^{-1})		Salinity (‰)	
			2003	2004	2003	2004	2003	2004	2003	2004	2003	2004
Inner Wismar Bay	11°26.4	53°54.5	18.0	19.0	8.1	8.4	5.5	5.0	7.8	9.3	12.0	12.4
Eggers Wiek	11°23.4	53°57.1	18.8	19.5	8.2	8.5	4.8	4.0	3.7	10.8	12.6	12.8
Outer Wismar Bay	11°18.5	54°02.4	18.0	18.8	8.2	8.3	4.1	3.1	2.7	2.8	14.1	11.7
Salzhaff	11°29.4	54°02.4	18.0	18.5	8.2	8.3	4.5	3.7	2.0	3.0	13.4	12.5
Darss Peninsula	12°29.1	54°28.0	16.5	15.5	8.1	8.0	4.5	3.3	2.6	1.9	10.3	9.4

Three locations were situated in the inner coastal waters (Inner Wismar Bay, Eggers Wiek and Salzhaff), where intersex prevalences and histological alterations in eelpouts (*Zoarces viviparous*) were found [33]. The sampling site Inner Wismar Bay was situated directly in the vicinity of the STP of the city of Wismar. The stations Outer Wismar Bay and Darss Peninsula were expected to be reference sites.

2.3. Sample enrichment, extraction and clean-up

Sampling at a water depth of approximately 1.5 m was performed using a Kiel in situ pump (KISP) system developed by Petrick et al. [34]. Surface water was filtered in situ through a glass fibre filter (GF 52, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany, 30 cm i.d., pore size 1 µm). For analyte enrichment, two approaches were used: a direct in situ solid-phase extraction as well as experiments on board with water samples temporarily stored in stainless steel containers. For the container and in situ experiments, glass cartridges (4 cm i.d.) were used, which were packed with 4 g Oasis HLB. Prior to the experiments the cartridges were conditioned with 150 mL acetone:methanol (80:20, v/v) followed by 150 mL Milli-Q water.

2.3.1 Container Experiments

The filtrate was pumped on board through teflon tubes and three 49 L stainless steel containers were filled in an alternating manner in order to obtain three samples that were as homogeneous as possible. The samples were extracted with Oasis HLB cartridges using 2 bar excess pressure of nitrogen. At each station, one sample was used for a recovery experiment at a spiking level of 4 ng L^{-1}. With the other two samples a duplicate determination of the environmental analyte concentrations was performed.

2.3.2. In situ experiments

Simultaneous to the container experiments, one in situ sample was taken at each station (except for station Outer Wismar Bay, July 2003). For this purpose, the outlet of the filter holder of the in situ pump system was directly connected to a cartridge which was attached to a flow meter. In approx. 1.5 m water depth, the KISP pumped with an initial flow rate of 300 mL min^{-1} for a period of three to four hours to obtain an extracted volume similar to those in the container experiments, but depending on the load of clogging substances different volumes in the range between 19 and 104 L were enriched on the sorbent.

2.3.3. Extraction and Clean-up

After sampling, the cartridges were stored in darkness at 4 °C until the complete processing in the laboratory. Initially, cartridges were washed with 200 mL of deionised water. Afterwards, the solid-phase material was dried overnight by sucking air through the columns. To avoid contamination, the air was purified with charcoal filters attached to the inlet of the glass columns. Analytes were eluted from the cartridges by primarily using 100 mL of solvent (acetone:methanol (80:20, v/v)), which was drawn into the SPE material, left to infuse for 5 min and then was sucked through the cartridge drop by drop, while another 100 mL of solvent was added. The sample extracts were reduced to 1-2 mL by rotary evaporation and finally reduced to 100 µL under a gentle stream of nitrogen (purity 99.999%). 400 µL of dichloromethane were added to the vial to get a solvent composition of dichloromethane:methanol of 80:20 (v/v). The 500 µL extract was quantitatively transferred to a prepared 3 g silica gel column (1 cm i.d. x 15 cm). Previously, the silica gel (0.063 - 0.200 mm, Merck, Darmstadt, Germany) had been baked out

overnight at 450 °C to remove organic contaminants. Purification of the extracts was accomplished by eluting the column subsequently with 7 mL dichloromethane:methanol (90:10, v/v) followed by another 7 mL with a composition of 80:20 (v/v). The eluate was finally reduced to a volume of 400 µL. A 50 µL aliquot was used for the determination of analyte concentrations. For calculation of signal suppressions during LC-ESI-MS/MS measurements another aliquot of 50 µL was spiked with a defined amount of standard solution. The remaining volume of 300 µL was needed for further and still ongoing investigations in order to analyse the estrogenic potential of these environmental samples.

2.4. LC-MS/MS analysis

Liquid chromatography was performed on an Agilent Series 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a degasser, a binary pump, an autosampler and a column oven. The analytes were chromatographed on a C18 polar end-capped reversed-phase column (SynergiTM Hydro-RP) with a particle size of 4 µm, a length of 150 mm and an inner diameter of 2.0 mm. The column was guarded with a precolumn of the same packing material (4 mm x 2.0 mm), both from Phenomenex (Aschaffenburg, Germany). The column oven temperature was set to 23°C. Injection volume was 10 µL. Samples were analysed in negative and positive ionisation modes.

Chromatography was carried out using the mobile phases A (water) and B (methanol), both containing equal concentrations of ammonium acetate (NH4Ac). The gradient was performed as follows: 30% B > 90% B (8 min) / 90% B > 100% B (15 min) / 100% B (5 min) / 100% B > 30% B (2 min). The system was re-equilibrated for 5 min between runs. The flow rate of the mobile phase was set to 200 µL min^{-1}. The influence of different NH4Ac concentrations used as an eluent modifier to enhance ionisation efficiency was investigated at concentrations of 0 mM, 2.5 mM, 5 mM and 10 mM NH4Ac. Moreover, for negative and positive ionisation mode different levels of ion spray voltages (-3500 V, -4200 V, -4500 V; +5000 V, +5500 V, respectively) were tested. The measurements were carried out by flow injection analysis with an eluent composition of 90% B and an injection volume of 5 µL standard solution or spiked field sample (Section 3.1). Finally, the field samples were

analysed using an optimised modifier concentration of 2.5 mM NH4Ac and an ion spray voltage of -4500 V and +5500 V, respectively.

The LC system was coupled to a triple-stage quadrupole mass spectrometer (API 4000, Applied Biosystems/MDS Sciex, Darmstadt, Germany). Optimisation of the ion source and MS/MS settings was performed by the automatic optimisation function of the MS software (Analyst 1.4, Applied Biosystems) assisted by manual optimisation using infusion with a syringe-pump and flow injection of standard solutions. The relevant instrument settings for each precursor-product ion transition are shown in Table 2.

Table 2: Retention times, MS and MS/MS detection parameters

Analyte	Retention time (min)	Precursor ion (*m/z*)	Declustering potential (V)	Product ions (*m/z*) (% rel. abundance)[a]	Collision energy (V)	Collision cell exit potential (V)
E1	14.7	269.2 $[M-H]^-$	-106	145 (100)	-52	-7
				143 (40)	-78	-7
E2	14.7	271.2 $[M-H]^-$	-121	145 (100)	-58	-9
				183 (90)	-58	-9
E2-D_3	14.7	274.2 $[M-H]^-$	-110	145 (100)	-56	-7
				185 (80)	-58	-13
E3	12.7	287.2 $[M-H]^-$	-111	145 (100)	-62	-7
				171 (120)	-52	-13
EE2	14.5	295.2 $[M-H]^-$	-110	145 (100)	-54	-7
				143 (65)	-74	-11
				159 (45)	-52	-9
				183 (40)	-55	-11
Daidzein	12.4	255.1 $[M+H]^+$	80	199 (100)	37	14
				152 (55)	61	10
Genistein	13.1	271.1 $[M+H]^+$	70	153 (100)	39	10
				91 (95)	63	6
BPA	13.6	227.1 $[M-H]^-$	-70	133 (100)	-32	-7
				212 (185)	-30	-15
BPA-D_{16}	13.5	242.2 $[M-H]^-$	-70	143 (100)	-36	-7
				97 (10)	-34	-3
NP	17.7	219.2 $[M-H]^-$	-70	133 (100)	-42	-7
				117 (15)	-82	-5
4-*tert*-OP	16.6	205.2 $[M-H]^-$	-80	133 (100)	-34	-7
				117 (10)	-82	-7
4-*n*-OP	18.1	205.2 $[M-H]^-$	-70	106 (100)	-28	-5
				-	-	-

[a] Relative abundances of quantifier ions were set to 100%.

The electrospray ion source (Turbo-Ionspray, Applied Biosystems) was operated at 250°C. Nitrogen was used as nebulizer, drying, curtain and collision gas. Ion source gas 1 (nebulizer gas) was adjusted to 50 psi and ion source gas 2 (drying gas) to 70 psi. The nitrogen settings for curtain gas and collision gas were optimised to 10 and 6 psi, respectively. For quantification the multiple reaction monitoring (MRM) mode was chosen. The dwell time for each precursor-product ion transition was set to 50 ms.

2.5. Data analysis

The base peak selected for quantitation of the analytes investigated corresponds to the deprotonated molecule $[M-H]^-$, whereas the phytoestrogens daidzein and genistein are detected as protonated molecules $[M+H]^+$. The analysed compounds were identified by the following criteria (i) two characteristic precursor-product ion transitions (quantifier and qualifier), (ii) specific ratios of the intensities of the product ions and (iii) specific retention times (Table 2). The monitored precursor-product ion transitions of three compounds (E1, EE2, NP) for (a) a standard solution (approx. 1.4 ng absolute), (b) a field sample (Inner Wismar Bay, 2004) and (c) the corresponding spiked field sample are depicted in Fig. 2. As shown, the quantitation of EE2 in environmental samples was hampered by interfering signals. In order to ensure correct determination, two additional transitions of EE2 were measured. The product ion m/z 153 was chosen as qualifier due to consistent ratios to the quantifier m/z 145 concerning field samples.

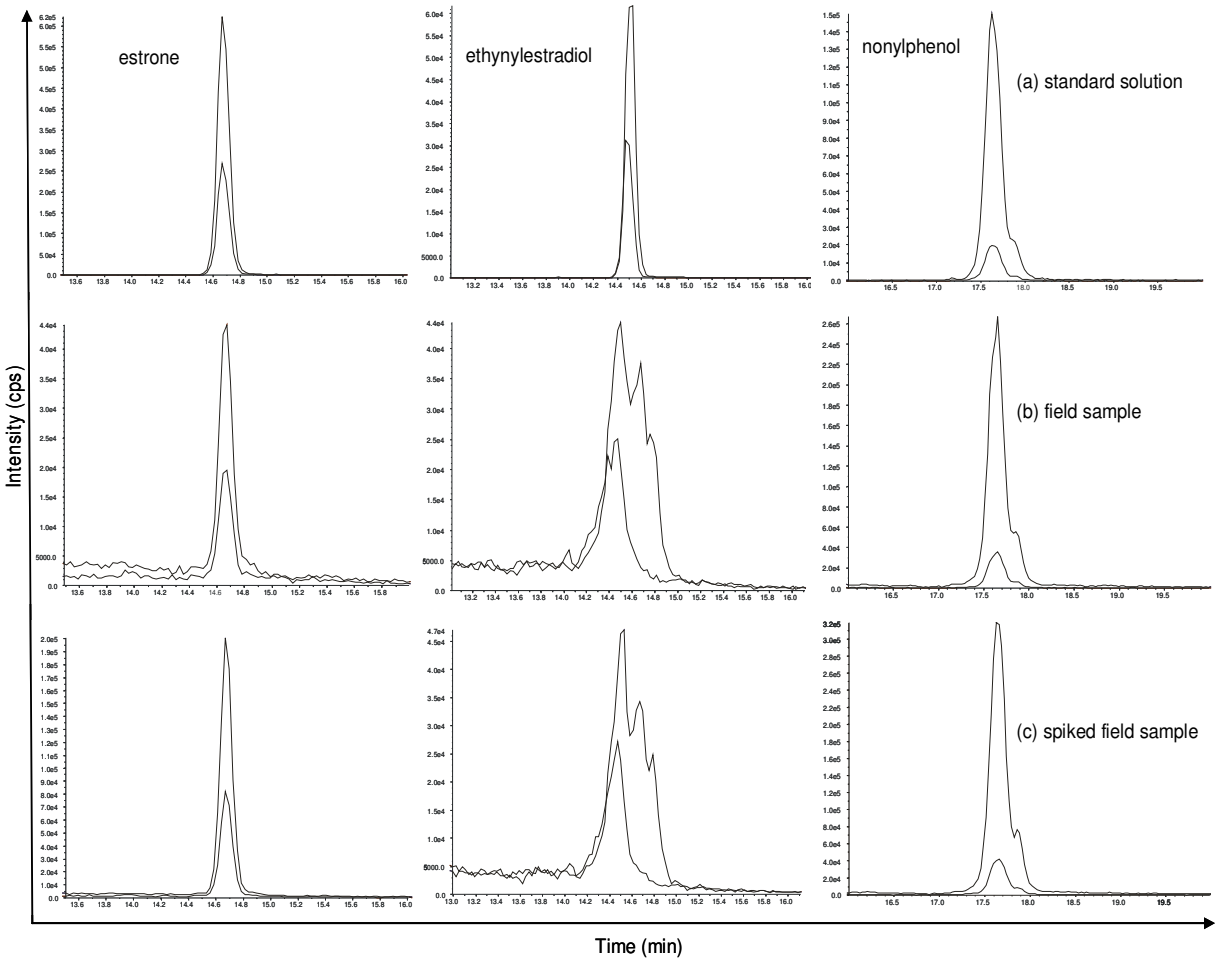


Fig. 2: Chromatograms of three analytes showing quantifier and qualifier (E1, EE2, NP) of (a) a standard solution, (b) a field sample (Inner Wismar Bay) and (c) the corresponding spiked field sample.

Quantification was performed using an external eight-point calibration curve covering the range from 50 pg to 5 ng absolute. Within measurement sequences, every 8 to 10 hours, field samples were bracketed with external calibrations to cover possible fluctuations in signal intensity. Calculated concentrations from the container experiments and in situ samples were corrected for signal suppression. Signal suppression was determined from aliquots of the sample extracts spiked prior to LC-MS/MS analysis using a defined amount of standard solution containing a mixture of all compounds analysed (spiking level 2 ng L^{-1}). The overall method recovery was obtained from non-spiked samples and samples spiked prior the solid-phase extraction with a spiking level of 4 ng L^{-1}. Both, signal suppression and overall method recovery, were assessed by comparing results from spiked and non-spiked samples. Extraction recoveries were calculated from overall method recoveries and signal suppression. The instrumental limit of detection (LOD) and the method

detection limit (MDL) were determined as the concentration with a signal-to-noise-ratio (S/N) of 3 (Table 3).

Table 3: Instrumental limits of detection (LOD) and method detection limits (MDL)

Analyte	LOD (pg absolute)	MDL (ng L^{-1})
E1	0.2	0.02
E2	4	0.30
E3	8	1.0
EE2	5	0.45
Daidzein	2	0.43
Genistein	5	0.61
BPA	8	0.04
NP	13	0.12
4-*tert*-OP	6	0.14

The instrumental LOD was calculated by the S/N determined by injecting 10 µL of the lowest calibration concentration. The MDLs were estimated from analyses of field samples with lowest observed concentrations. Observed concentrations with values between MDL and MQL (method quantification limit, S/N=10), indicated in Table 4, were only determined by the quantifier (S/N between 3 and 10, specific retention time). Possible sample contamination during the sampling and extraction procedure was quantified by blank cartridges, which were handled like the sample columns. In the blanks, only BPA, NP and 4-*tert*-OP could be detected. As the blank concentrations were lower than 20% compared to lowest observed concentrations in field samples, a correction was considered as dispensable. Internal standards (E2-D_3, BPA-D_{16}, 4-*n*-OP) were used for confirmation of recovery results and not for quantitation purposes.

3. Results and discussion

3.1. Performance, recoveries and detection limits of the analytical method

The external eight-point calibration curve using an 1/x weighting showed linearity for all analytes in a range from 50 pg to 5 ng absolute with correlation coefficients r > 0.990. The repeatability of a tenfold injection of a standard solution (0.5 ng μL^{-1}) from the same vial gave relative standard deviations (RSDs) between 3% (daidzein) and 7% (BPA).

The eluent buffer concentration and the ion spray voltage have an important impact on the ionisation efficiency of analytes as shown in Fig. 3.

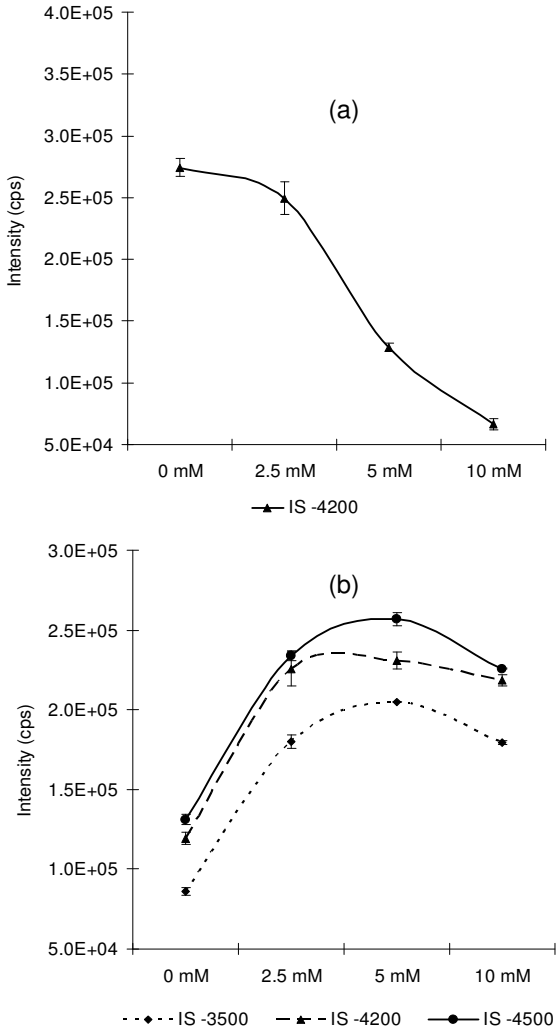


Fig. 3: Influence on signal intensities of EE2 using different modifier (NH_4Ac) concentrations for (a) a standard solution and (b) a spiked field sample. In figure (b) the impact of varying ion spray voltages is shown.

The optimisation of the buffer concentration from 0 to 10 mM ammonium acetate for an EE2 standard solution (0.34 ng μL^{-1}) with an ion spray voltage of -4200 V is depicted in Fig. 3 (a). Increasing NH4Ac concentrations were related to a decrease in signal intensity. The response of EE2 in a spiked matrix sample (approx. 0.75 ng μL^{-1}) at different buffer concentrations and three ion spray voltages (-3500 V, -4200 V and -4500 V) shows that in contrast to standard solutions higher buffer concentrations and a higher ion spray voltage are required for better signal intensities (Fig. 3 (b)). All analytes showed similar graphs. An optimised modifier concentration of 2.5 mM NH4Ac and an ion spray voltage of -4500 V for negative ionisation and +5500 V for positive ionisation were chosen.

In Fig. 4, arithmetic means of overall method recoveries, signal suppressions and calculated extraction recoveries of five spiking experiments at the different stations in the Baltic Sea (Sampling July 2004) are depicted.

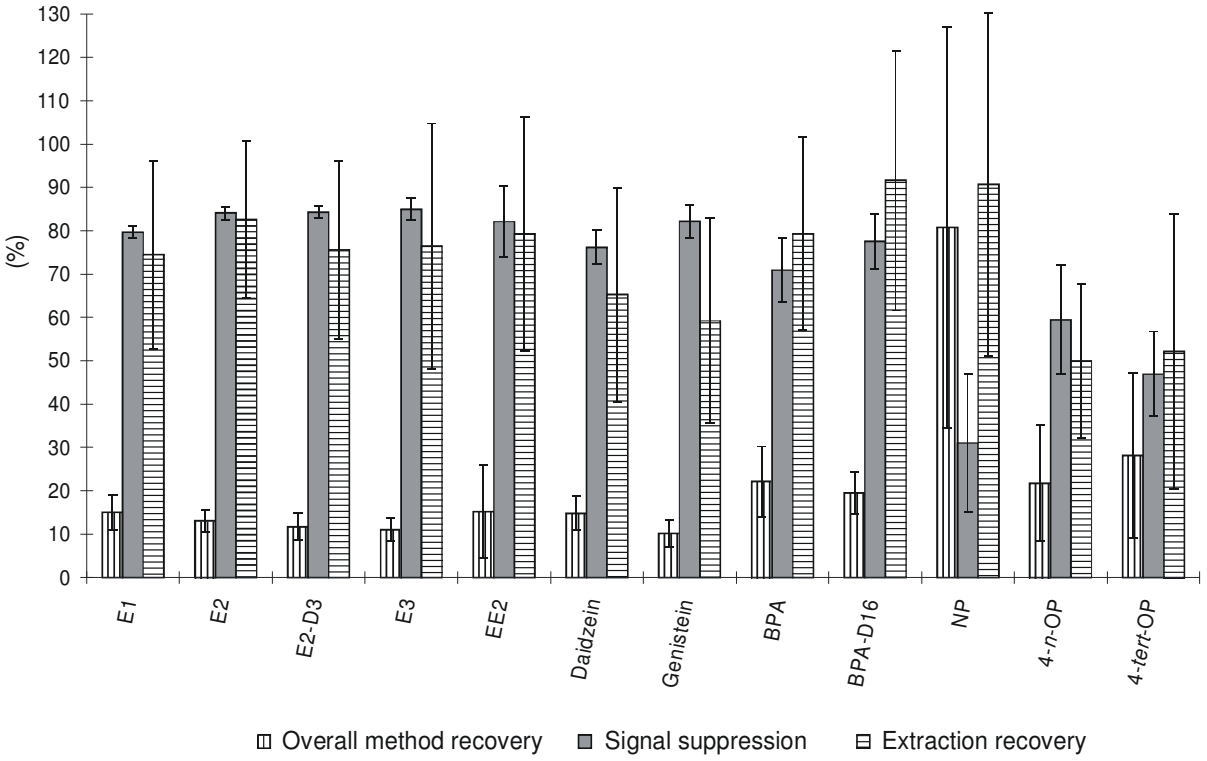


Fig. 4: Recovery results and signal suppressions calculated from five spiking experiments (except for NP (*n*=4)) during the sampling campaign in July 2004.

The spiking level was 4 ng L^{-1}. The overall method recoveries of the analytes vary between 10% (genistein) to 81% (NP). Matrix interferences caused by co-eluting components led to signal suppressions in a range of 31% (NP) to 85% (E3). One

reason for the significant signal interferences could be the universal extraction method and subsequent clean-up approach taken to allow analysis of a range of compounds simultaneously. The polymer Oasis HLB used is known as a sorbent which retains a broad spectrum of different substances covering acidic, neutral and basic compounds [26, 35]. In order to minimise the pH-dependent amount of co-extracted humic acids, the predominantly weak acidic analytes were extracted without acidification. Previous experiments have shown that recoveries for samples at pH 8.5 (spiked Milli-Q water) were nearly equivalent to those obtained for samples adjusted to pH 2.5 (results not given), which is in agreement with Quintana et al. [16]. The clean-up procedure reduced the amount of co-extracted substances, but not to the extent desirable for the electrospray ionisation technique. Therefore, for each individual sample signal suppression was calculated and quantitation results were corrected.

Extraction recovery was calculated from overall method recovery and signal suppression, which resulted in larger standard deviations (error bars in Fig. 4). Extraction recoveries ranged from 52% (4-*tert*-OP) to 91% (NP). The internal standards for E2, BPA and 4-*tert*-OP showed similar recovery results and thus accomplished their purpose of data confirmation. The powerful technique of tandem mass spectrometry led to instrumental LODs between 0.2 and 13 pg absolute (E1 and NP, respectively). The method developed allows the determination of estrogenic compounds in coastal waters in the range of 0.02 ng L^{-1} (E1) to 1 ng L^{-1} (E3) (Table 3).

3.2. Concentrations of estrogenic compounds in a coastal zone of the Baltic Sea

The occurrence of environmental estrogens in a coastal zone of the Baltic Sea was investigated by the application of the high-volume multi-compound extraction method as described in Section 2.3. Five different sampling sites, covering expected higher and lower contaminated sites, were analysed in the years 2003 and 2004. The concentrations were corrected for signal suppression and are summarised in Table 4. The in situ extractions and container experiments led to similar quantification results and thus, are not listed separately.

Table 4: Concentrations of estrogenic compounds at five different sampling sites in a coastal area of the German Baltic Sea for two sampling campaigns (July 2003 and July 2004)

	Concentration (ng L^{-1})[a]									
	Inner Wismar Bay		Eggers Wiek		Outer Wismar Bay		Salzhaff		Darss Peninsula	
Analyte	2003	2004	2003	2004	2003	2004	2003	2004	2003	2004
E1	0.47	0.53	0.42	0.51	0.33	0.16	0.27	0.34	0.25	0.10
	(0.45-0.49)	(0.52-0.53)	(0.36-0.50)	(0.54-0.49)	(0.31-0.35)	(0.13-0.20)	(0.27-0.28)	(0.30-0.37)	(0.24-0.26)	(0.08-0.11)
E2	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
E3	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
EE2	3.0	17.2	2.4	8.0	<MDL	2.1	1.7[c]	2.9	2.5	1.7[c]
	(2.1-3.8)	(16.5-17.9)	(<MDL-7.2)	(<MDL-14.1)		(<MDL-3.9)	(1.6[c]-1.8)	(1.7[c]-4.0)	(2.1-3.2)	(1.7[c]-1.8)
Daidzein	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Genistein	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
BPA	2.5	5.4	0.75	0.96	0.37	0.22	0.22	0.35[b]	1.1	0.47[b]
	(1.3-3.6)	(5.3-5.7)	(0.61-0.85)	(0.52-1.8)	(0.37-0.37)	(0.11-0.37)	(<MDL-0.38)	(0.31-0.39)	(0.67-1.4)	(0.28-0.66)
NP	4.3	6.1[b]	2.5	3.5	3.4	2.5	4.2	4.2	13.8	4.7[b]
	(3.1-6.2)	(5.9-6.3)	(1.3-3.4)	(2.1-5.2)	(3.3-3.6)	(1.6-3.9)	(1.6-6.3)	(2.2-7.5)	(9.4-21.3)	(3.7-5.8)
4-*tert*-OP	0.4	0.32	0.60	0.37	0.12	0.23	0.19	0.20	0.45	0.11[b]
	(0.3-0.56)	(0.10-0.57)	(0.31-1.1)	(0.35-0.40)	(0.11-0.13)	(0.14-0.36)	(0.14-0.22)	(0.14-0.26)	(0.08-0.95)	(0.04-0.17)

[a] Arithmetic means (*n*=3), except for Outer Wismar Bay 2003 (*n*=2); values have been corrected for signal suppression, but not for recovery.

[b] Values have been corrected for one outlier.

[c] Concentrations are between MDL and MQL.

E2, E3 and the phytoestrogens daidzein and genistein could not be detected. Possible explanations are high removal rates during the sewage treatment, including oxidation and degradation processes. However, the natural hormone E1 was found at all stations. The degradation of E2 to E1 and the fact that E1 is the most abundant estrogen excreted by menstruating and pregnant women are two reasons for the determination of E1 at all sampling sites.

As expected, the Inner Wismar Bay and Eggers Wiek showed the highest concentration levels for the natural (July 2004, E1: 0.53 ng L^{-1}, 0.51 ng L^{-1}, respectively) and synthetic hormones (July 2004, EE2: 17 ng L^{-1}, 8 ng L^{-1}, respectively). These relatively high concentrations of E1 are comparable with data from Atkinson et al. [31], who measured concentrations of E1 in Hawaiian open-ocean water of 52 pg L^{-1} and in lagoon seawater of 1.7 ng L^{-1} by using a radioimmunoassay technique. At much lower concentrations, E1 and EE2 could also be determined at stations expected to be low or not contaminated sites (Darss Peninsula, Outer Wismar Bay). Higher concentrations found for EE2 can probably be explained by its wide use as a contraceptive and its higher persistence compared to natural hormones. However, despite the selectivity of LC-MS/MS, co-extracted sample constituents led to difficulties in quantitation of EE2. An interfering compound with the same parent ion at m/z of 295, nearly the same retention time (14.5 min, Fig. 2 (b)) and similar fragmentation patterns (product ions at m/z of 145, 143 and 183) led to problems in exact peak integration. Ternes et al. [9] as well as Huang and Sedlak [36] reported matrix interferences for EE2 during GC-MS analyses and annotated the risk of overestimating concentration data, but using the selectivity of MS/MS a precise quantification became possible for them. The measurement of 4 precursor-product ion transitions and correct ratios between quantifier (m/z 145) and qualifier (m/z 159) ensured a correct determination. However, the interfering peak resulted in estimated measurement uncertainties in the range of 20 to 30%.

Also with regard to the phenolic xenoestrogens (BPA, NP, 4-tert-OP) the Inner Wismar Bay showed the highest concentrations. Mean concentrations varied between 5 ng (BPA), 6 ng (NP) and 0.3 ng (4-*tert*-OP) per litre (Sampling July 2004). Except for 4-*tert*-OP, the lowest observed concentrations were found at the Outer Wismar Bay (factor 25 for BPA and factor 2 for NP in comparison to the Inner Wismar Bay, July 2004). Similar concentrations determined from in situ and container

experiments show that no additional contamination from on board enrichment occurred.

The concentrations of analytes, determined at the Darss Peninsula suggest that there is a nearshore transport of contaminants from the Inner Wismar Bay in the direction of the outer located sampling site. Half-lives of up to 50 days [37] for the more persistent alkylphenols and estimated half-lives of 2-6 days for estrogenic steroids [38] seem to be sufficient to make transport from west to east possible. For this coastal area, a water flow from west to east is confirmed by rates of sediment transportation [39]. Both sampling campaigns (2003 and 2004) showed concentrations in similar ranges (except for EE2 found in the Inner Wismar Bay) and showed similar distribution patterns. Differences in concentrations between the years could be attributed to different charges of STP effluent water and the high variability of water bodies, partly characterised by different values of the parameters shown in Table 1.

Considering the lowest observed effect concentrations of E1 and EE2, which are in the ng and sub-ng L^{-1} range, respectively [40], the measured concentrations are of concern. E1 and EE2, having at least two orders of magnitude higher estrogenic activity compared to known phenolic xenoestrogens, are the target analytes mainly responsible for possible endocrine disrupting effects. In order to allow correlations between observed reproductive disorders in the Wismar Bay and detected concentrations of estrogenic substances, further investigations including chemical analyses and exposure experiments would have to be carried out.

It should be noted that this study is focused on the water phase, whereas for natural steroids and especially for synthetic hormones and phenolic compounds with higher log K_{OW} (octanol-water coefficient) values sorption on sediment or suspended particulate matter (SPM) could be a significant factor.

4. Conclusions

The analytical method presented allows the simultaneous extraction, identification and quantification of a range of compounds with known estrogenic activity in coastal surface waters. To the authors' knowledge, it is the first time that estrogenic compounds with the focus on natural and synthetic hormones have been detected in a coastal zone of the German Baltic Sea. E1, EE2 and the phenolic xenoestrogens BPA, NP and 4-*tert*-OP were found with concentrations of E1 and EE2 in the range of effect concentrations for aquatic organisms. Significant signal suppressions in electrospray ionisation occurred due to co-extracted matrix constituents and had to be controlled and corrected for by spiking experiments with aliquots of sample extracts. As a follow-up of this study, chemical analyses will be supplemented by the application of bioassays (Yeast-Screen, MCF-7-Bioassay) to assess estrogenic activities of the sample extracts.

Acknowledgements

The water sampling was performed with an in situ pump system from the Baltic Sea Research Institute, Warnemuende (IOW, Germany). The Institute and especially Dr. Peter Kömp and Dr. Kilian Smith are kindly acknowledged for their help. We express our thanks to Günther Plüschke (IOW) for the salinity measurements. We thank Armando Caba for his assistance during the sampling campaigns.

References

[1] T. Colborn, F.S. vom Saal, A.M. Soto, Environ. Health Perspect. 101 (1993) 378.

[2] R. Stone, Science 265 (1994) 308.

[3] C.E. Purdom, P.A. Hardiman, V.J. Bye, N.C. Eno, C.R. Tyler, J.P. Sumpter, J. Chem. Ecol. 8 (1994) 275.

[4] E.J. Routledge, D. Sheahan, C. Desbrow, G.C. Brighty, M. Waldock, J.P. Sumpter, Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 1559.

[5] C.R. Tyler, E.J. Routledge, Pure Appl. Chem. 70 (1998) 1795.

[6] E. Carlsen, A. Giwercman, N. Keiding, N.E. Skakkebaek, Environ. Health Perspect. 103 (1995) 137.

[7] J. Toppari, J.C. Larsen, P. Christiansen, A. Giwercman, P. Grandjean, L.J. Guillette, T.K. Jensen, P. Jouannet, N. Keiding, H. Leffers, J.A. McLachlan, O. Meyer, J. Müller, E. Rajpert-De Meyts, T. Scheike, R. Sharpe, J. Sumpter, N.E. Skakkebæk Environ. Health Perspect. 104 (1996) 741.

[8] S. Safe, Toxicology 205 (2004) 3.

[9] T.A. Ternes, M. Stumpf, J. Mueller, K. Haberer, R.-D. Wilken, M. Servos, Sci. Total. Environ. 225 (1999) 81.

[10] C. Desbrow, E.J. Routledge, G.C. Brighty, J.P. Sumpter, M. Waldock, Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 1549.

[11] A.C. Belfroid, A. Van der Horst, A.D. Vethaak, A.J. Schafer, G.B.J. Ris, J. Wegener, W.P. Cofino, Sci. Total. Environ. 225 (1999) 101.

[12] U. Bolz, H. Hagenmaier, W. Körner, Environ. Pollut. 115 (2001) 291.

[13] B. Gross, J. Montgomery-Brown, A. Naumann, M. Reinhard, Environ. Toxicol. Chem. 23 (2004) 2074.

[14] X. Jin, G. Jiang, G. Huang, J. Liu, Q. Zhou, Chemosphere 56 (2004) 1113.

[15] R. Liu, J.L. Zhou, A. Wilding, J. Chromatogr. A 1022 (2004) 179.

[16] J.B. Quintana, J. Carpinteiro, I. Rodriguez, R.A. Lorenzo, A.M. Carro, R. Cela, J. Chromatogr. A 1024 (2004) 177.

[17] C. Baronti, R. Curini, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili, R. Saperi, Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 5059.

[18] B.J. Vanderford, R.A. Pearson, D.J. Rexing, S.A. Snyder, Anal. Chem. 75 (2003) 6265.

[19] M. López de Alda, S. Díaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barceló, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 503.

[20] T. Benijts, W. Lambert, A. De Leenheer, Anal. Chem. 76 (2004) 704.

[21] L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marce, Chromatographia 59 (2004) 419.

[22] A. Jahnke, J. Gandrass, W. Ruck, J. Chromatogr. A 1035 (2004) 115.

[23] B.K. Choi, D.M. Hercules, A.I. Gusev, J. Chromatogr. A 907 (2001) 337.

[24] T. Ternes, M. Bonerz, T. Schmidt, J. Chromatogr. A 938 (2001) 175.

[25] J. Zrostlikova, J. Hajslova, J. Poustka, P. Begany, J. Chromatogr. A 973 (2002) 13.

[26] T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. De Leenheer, J. Chromatogr. A 1029 (2004) 153.

[27] S. Souverain, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, J. Chromatogr. A 1058 (2004) 61.

[28] H.M. Kuch, K. Ballschmiter, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 3201.

[29] B. Stachel, U. Ehrhorn, O.-P. Heemken, P. Lepom, H. Reincke, G. Sawal, N. Theobald, Environ. Pollut. 124 (2003) 497

[30] O.-P. Heemken, H. Reincke, B. Stachel, N. Theobald, Chemosphere 45 (2001) 245.

[31] S. Atkinson, M.J. Atkinson, A.M. Tarrant, Environ. Health Perspect. 111 (2003) 531.

[32] L.S. Shore, M. Gurevitz, M. Shemesh, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 51 (1993) 361.

[33] J. Gercken, H. Sordyl, Mar. Environ. Res. 54 (2002) 651.

[34] G. Petrick, D.E. Schulz-Bull, V. Martens, K. Scholz, J.C. Duinker, Mar. Chem. 54 (1996) 97.

[35] S. Weigel, R. Kallenborn, H. Huehnerfuss, J. Chromatogr. A 1023 (2004) 183.

[36] C.-H. Huang, D.L. Sedlak, Environ. Toxicol. Chem. 20 (2001) 133.

[37] G.-G. Ying, B. Williams, R.S. Kookana, Environ. Int. 28 (2002) 215.

[38] G.-G. Ying, R.S. Kookana, Y.-J. Ru, Environ. Int. 28 (2002) 545.

[39] StAUN Rostock, oral communication, 2004.

[40] W.F. Young, P. Whitehouse, I. Johnson, N. Sorokin, Technical Report P2-T04/1, Environment Agency, Bristol (2002)

5. Publikation II:

Chemosphere *in press*

Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen

Iris-Constanze Beck[a,b], Regina Bruhn[a], Juergen Gandrass[a]

[a] *GKSS Research Centre, Institute for Coastal Research, Max-Planck-Str. 1, D-21502 Geesthacht, Germany*
[b] *University of Lueneburg, Faculty of Environmental Sciences, Institute for Ecology and Environmental Chemistry, Scharnhorststr. 1, D-21335 Lueneburg, Germany*

Abstract

In the present study, the yeast estrogen screen (YES) has been used to assess the estrogenic activity in surface waters of a coastal region in the German Baltic Sea. Solid-phase extraction using the copolymer Oasis HLB followed by a clean-up on silica was carried out on approximately 50-l water samples. From the final 400 µl extract volume, 100 µl aliquots were used for the measurement of estrogenic activity and for chemical analysis, which was performed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). From twenty-nine samples taken during two campaigns (2003 and 2004) at five different stations twenty-seven samples showed an estrogenic response higher than 10%. The response in the YES was expressed as measured estradiol equivalents (EEQs), which were in the range of 0.01 (Darss Peninsula) to 0.82 ng/l (Inner Wismar Bay). Samples from stations located in inner coastal waters showed higher estrogenic activities than those from outer located stations. A comparison of measured estrogenicity (YES) and calculated estrogenicity (chemical analysis) showed significant differences, probably due to the presence of anti-estrogenic compounds and/or the estrogenic activity of unknown, not identified contaminants. The main contributors to the overall estrogenic activity were synthetic and natural hormones.

Keywords: Estrogens; Xenoestrogens; Recombinant Yeast Assay; 17ß-Estradiol equivalent concentrations; Marine environment

1. Introduction

The alteration of estrogen function in wildlife has been of major concern in recent decades (Tyler et al., 1998; Oberdörster and Cheek, 2000; Matthiessen, 2003). Adverse effects with regard to human health, namely the increasing incidence of cancer and the hypothesis of a decreasing reproductive fitness of men, are thought to be attributed to estrogenic compounds (Daston et al., 1997; Juberg, 2000). In addition to natural and synthetic hormones excreted by humans and livestock, many chemicals such as plasticizers, degradation products of non-ionic surfactants (alkylphenolic compounds), phthalates, polychlorinated biphenyls, brominated flame retardants and certain pesticides have been discovered to exhibit estrogenic activity. The chemical structures of estrogenic compounds show a high diversity, which makes it difficult to predict their estrogenic potency based on their structural characteristics. Their ability to interact with the human estrogen receptor α (hERα) is due to the large gap in the receptors' ligand-binding domain (Brzozowski et al., 1997). Reproductive disorders including feminizing effects have been reported especially from aquatic ecosystems, in which estrogens and xenoestrogens are discharged from sewage treatment plants (STPs) (Jobling et al., 1998; Allen et al., 1999). Due to their high estrogenic potency, natural and synthetic steroid hormones have been shown to be mainly responsible for the estrogenic activity of STP effluents (Desbrow et al., 1998; Houtman et al., 2004). Assuming similar modes of actions, the exposure to xenoestrogens although showing comparably low potencies, could potentially lead to concentration addition and significant combination effects (Kortenkamp and Altenburger, 1998; Rajapakse et al., 2002; Silva et al., 2002).

In vivo experiments for investigating estrogenic effects are, in general, time-consuming and expensive. Therefore, diverse *in vitro* assays have been established to identify estrogenic potentials in environmental samples. They are suitable screening tools to give first evidence of the occurrence of estrogenic contaminants in ecosystems (Andersen et al., 1999). The *in vitro* yeast estrogen screen (YES) has been used in many studies as a robust, rapid and sensitive tool for assessing estrogenic activities in environmental samples at moderate cost (Gaido et al., 1997; García-Reyero et al., 2001; Lorenzen et al., 2004). The assessment of estrogenic activities using the YES combined with the identification of estrogenic compounds with gas or liquid-chromatography coupled to mass spectrometry allows the main

contributors to the estrogenicity of environmental samples to be identified (Desbrow et al., 1998; García-Reyero et al., 2001; Aerni et al. 2004; Céspedes et al., 2004; Heisterkamp et al., 2004; Houtman et al., 2004; Nakada et al., 2004; Rutishauser et al., 2004; Quirós et al., 2005).

Endocrine disruption is often defined as abnormal vitellogenesis (Purdom et al., 1994; Sumpter and Jobling, 1995) or the occurrence of developmental disorders (e.g. intersexuality) (Jobling et al., 1998). Purdom et al. (1994) showed that ethinylestradiol may induce VTG synthesis with concentrations as low as 0.1 ng/l. At several locations in the German Baltic Sea Gercken and Sordyl (2002) reported VTG levels and ovo-testis in male eelpouts (*Zoarces viviparous*) as well as larvae deformations in female species. The Baltic Sea is a marine environment of high sensitivity. Its small volume (21.547 km^3) and restricted water exchange with the North Sea are leading to a high residence time of water. Additionally, the large catchment area of the world's largest brackish water body consequently leads to a complex exposure situation for the aquatic organisms (Helsinki Commission, 2003).

The main objective of the work presented here was to evaluate the overall estrogenicity of surface waters from a coastal region in the German Baltic Sea, where a prevalence of intersexuality in male eelpouts has been reported from inner coastal sites (Gercken and Sordyl, 2002). In order to assess the estrogenic activity, a recombinant yeast-based assay has been used. We carried out two sampling campaigns in July 2003 and 2004 to measure the estradiol equivalent concentrations of five different stations in the Baltic Sea. Dose-response relationships for selected substances and their relative estrogenic potencies expressed as estradiol equivalent factors (EEFs) were determined. EEFs together with previously obtained concentration data based on liquid-chromatography tandem mass spectrometry measurements (LC-MS/MS) were used to calculate estradiol equivalent concentrations. Finally, the results obtained by biological and chemical analysis were compared.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Standard substances used in the YES and in the chemical analysis were from the same production lot and were purchased from the following companies: estrone (E1), 17ß-estradiol (E2), estriol (E3) and 17α-ethinylestradiol (EE2) from Sigma (Seelze, Germany), 4-nonylphenol (NP) from Riedel de Haën (Seelze, Germany), 4-*tert*-octylphenol (4-*tert*-OP) from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany), bisphenol A (BPA), genistein and daidzein from Fluka (Buchs SG, Switzerland). Stock solutions of these substances were prepared in methanol at 1 µg/µl. Methanol SupraSolv® and ammonium acetate Fractopur® were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Dichloromethane and acetone of Picograde® quality were purchased from Promochem (Wesel, Germany). Deionised organic-free water was obtained from a Milli-Q Plus 185TM coupled to an Elix 5TM system (Millipore, Schwalbach, Germany). The solid-phase extraction sorbent Oasis HLB (N-vinylpyrrolidone-divinylbenzene copolymer, 60 µm, bulk material) was supplied by Waters (Eschborn, Germany). Samples were purified on silica (0.063-0.200 mm, Merck, Darmstadt, Germany) as described by Beck et al. (2005).

2.2 Sampling and preparation of solid-phase extracts

*S*urface water samples were collected at five locations in the Baltic Sea in July 2003 and July 2004 (Fig. 1).

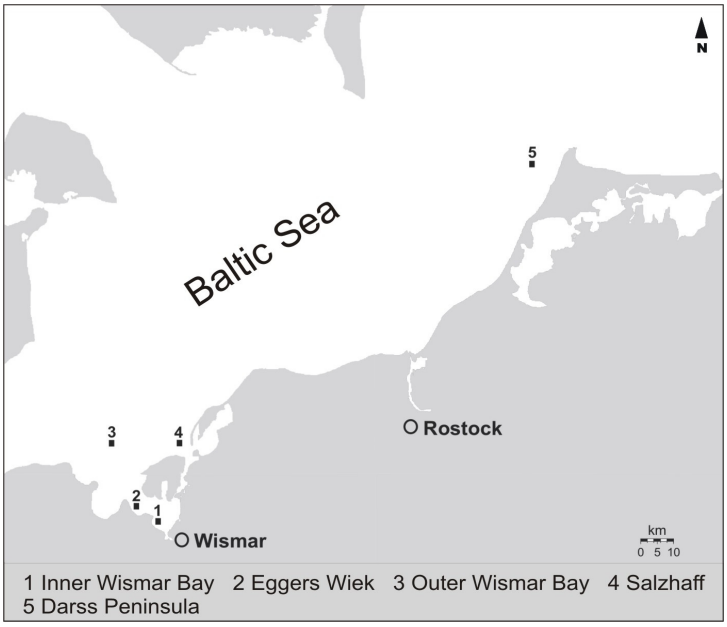


Fig. 1: Location of sampling sites in the German Baltic Sea.

All sampling sites were located in north-eastern Germany. Three locations were situated in inner coastal waters (Inner Wismar Bay, Eggers Wiek and Salzhaff), where intersex prevalence and histological alterations in eelpouts (*Zoarces viviparous*) were found (Gercken and Sordyl, 2002). The sampling site Inner Wismar Bay is situated directly in the vicinity of the STP of the city of Wismar. The stations Outer Wismar Bay and Darss Peninsula were expected to be reference sites.

Details of the sampling procedure and the preparation of the solid-phase extracts are described elsewhere (Beck et al., 2005). In brief, surface water samples were filtered in situ through glass fibre filters (1 µm pore size) and were solid-phase extracted using previously conditioned Oasis HLB (4 g, self-packed) cartridges. At each station one direct in situ solid-phase extraction was performed as well as experiments on board with water samples temporarily stored in stainless steel containers (49 l volume). The in situ sample (isp) as well as samples A and C from container experiments were used both for chemical and biological analysis and were therefore not spiked with internal standards. After extraction, the cartridges were stored in darkness at 4 °C for a maximum of 8 days. In the laboratory, the cartridges were washed using Milli-Q water, dried over night and eluted with 200 ml of solvent (acetone/methanol (80:20, v/v)). The sample extracts were concentrated and purified on silica columns. The eluate was finally reduced to a volume of 400 µl. An aliquot of 100 µl was needed for LC-MS/MS measurements, whereas another 100 µl aliquot was used for the YES assay. Blank columns were extracted and treated in the same way as described above.

2.3 Chemical analysis

Details of the chemical analysis have been described previously (Beck et al., 2005), but relevant information is given here in brief. Liquid chromatography was performed on an Agilent Series 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) using a C18 reversed-phase column (Synergi^{TM} Hydro-RP, 150x2.0 mm, 4 µm particle size). Chromatography was carried out using a gradient of the mobile phases A (water) and B (methanol), both containing 2.5 mM of ammonium acetate. The LC system was coupled to a triple-stage quadrupole mass spectrometer (API 4000, Applied Biosystems/MDS Sciex, Darmstadt, Germany).

Data analysis: For quantification the multiple reaction monitoring (MRM) mode was chosen. The precursor ions selected for quantitation of the analytes investigated

corresponds to the deprotonated molecules $[M-H]^-$, whereas the phytoestrogens daidzein and genistein are detected as protonated molecules $[M+H]^+$. The analysed compounds were identified by two characteristic precursor-product ion transitions (quantifier and qualifier), specific ratios of the intensities of the product ions and specific retention times. The quantitation of EE2 in environmental samples was hampered due to interfering signals. In order to ensure correct determination, two additional transitions of EE2 were measured. Calculated concentrations from the container experiments and in situ samples were corrected for signal suppression. Signal suppression was determined from aliquots of the sample extracts spiked prior to LC-MS/MS analysis. In blank cartridges, only BPA, NP and 4-*tert*-OP could be detected. As the blank concentrations were lower than 20% compared to the lowest observed concentrations in field samples, a correction was considered as dispensable.

2.4 Screening for estrogenic activity (YES)

The recombinant YES was kindly provided by J. Sumpter (Brunel University, Uxbridge, UK) and was carried out as described by Routledge and Sumpter (Routledge and Sumpter, 1996). The yeast cells (*Saccharomyces cerevisae*) are stably transfected with the human estrogen receptor (hERα) gene and an expression plasmid carrying the reporter gene lac-Z, which encodes the enzyme β-galactosidase. The binding of the receptor-ligand complex to the estrogen-responsive element (ERE) results in the expression of the reporter gene and consequently in the production of β-galactosidase, which metabolises the chromogenic substrate chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG) into chlorophenol red with an absorption maximum at 540 nm. Standard solutions and sample extracts were produced in methanol and 10 µl of dilution series were dispensed into triplicate wells of 96-well microtiter plates. Before adding 200 µl of the growth medium containing CPRG the plates were allowed to evaporate to dryness at room temperature. During incubation at 32 °C for 72 hours the microtiter plates were shaken at 80 rpm (GFL, Gesellschaft fuer Labortechnik, Burgwedel, Germany). The incubation time was prolonged to 96 hours for samples from station Salzhaff (2003) due to insufficient yeast growth. Afterwards, the absorbance of the medium was measured using a microplate reader (rosys anthos 2010, Zinsser Analytik, Frankfurt, Germany). The absorbance at 540 nm was regarded as estrogenic activity after subtraction of

absorbance at 640 nm to correct for yeast growth. In addition, the absorbance at 640 nm compared to reference wells (solvent control) was evaluated as a parameter for the inhibition of yeast growth.

Calculation of relative potencies and measured estradiol equivalents: Dose-response curves are generally depicted as arithmetic means with standard deviations of corrected absorbance data (curve fitting by the software Excel). The response of the test system towards the different chemicals investigated was determined by comparing the response to E2 and is depicted versus the logarithm of the dose (log dose in mol/L in culture). Relative estrogenic potencies are expressed as estradiol equivalency factors (EEFs) and are calculated by dividing the EC_{50} for E2 by the EC_{50} for each test compound (i):

$$EEF\ (i) = \frac{EC_{50}\ (E2)}{EC_{50}\ (i)}$$

Measured estradiol equivalents (EEQs) were determined as follows: Estrogenic activities of water extracts are expressed as a percentage of the maximum response of the positive control E2 from the same microtiter plate and are plotted to logarithmically transformed l-equivalents of water sample absolute per well. For transformation into EEQs generally the ranges of dose-response curves were selected, in which acute toxic effects could be most probably excluded. The response of sample extracts was interpolated from the E2 dose-response curve obtained from the same microtiterplate on the basis of a 20% response (EC_{20}) for samples from 2003. For all samples taken in July 2004 the EC_{10}-value was used consistently, since the maximum responses were lower than the 20% responses induced by some of the sample extracts. In exceptional cases, the estrogenicity was calculated necessarily on the basis of the EC_{50} or EC_{70} (Salzhaff, Inner Wismar Bay, Campaign 2003, respectively) since the responses were higher than 20% of the most diluted extracts. The concentration obtained in mol/l was extrapolated to the theoretical response of a one litre sample extract and was converted into ng/l-equivalent water sample used in the assay. The conversion in ng/l-equivalents was necessary in order to allow comparison of the measured estrogenicity with concentration data achieved by prior chemical analysis. As an example, the highest concentrations (1:1) of the dilution series represent a fortieth part of the extracted water volume. To obtain ng/l values the dilution of the 10 µl extract by adding 200 µl medium and the molecular weight of

E2 has to be considered. A 10% response in the YES was chosen as a significant estrogenic activity and a quantitative determination of estrogenicity was carried out.

Comparison of measured and calculated EEQs: In order to compare the results of the biological and chemical analysis and to estimate the contribution of target analytes to the overall estrogenicity of the real samples, calculated E2 equivalents (EEQs) were determined. Therefore concentration data obtained by LC-MS/MS analysis (see Beck et al., 2005) were multiplied with the determined relative potencies expressed as EEFs of the compounds in the YES:

$$\Sigma \text{ Calculated EEQ (i)} = \Sigma \text{ EEF (i)} * \text{c (i)}$$

The sum of the EEQ-values calculated for all individual compounds represent the calculated overall estrogenicity of the sample extract.

3. Results and discussion

3.1 Estrogenic activity of the standard chemicals towards the YES

The sensitivity of the YES was tested for the selected chemicals. All chemicals showed an activation of the estrogen receptor in a concentration-dependant manner. Dose-response curves for the individual analytes are depicted in Fig. 2. The relative estrogenic potencies covered a range from 1.25 to 2.5×10^{-6} for EE2 and for daidzein, respectively, and are summarized in Table 1. The most active chemical was the synthetic hormone EE2, with a 1.25-fold higher potency than E2, followed by the natural metabolites E1 and E3. With a relative potency of 1.5×10^{-4}, genistein showed a more than two orders of magnitude higher estrogenic response in the YES than daidzein, the second phytoestrogen tested. BPA was the most estrogenic environmental chemical followed by NP and 4-*tert*-OP, which showed a 4 to 6 orders of magnitude lower activity in comparison to E2.

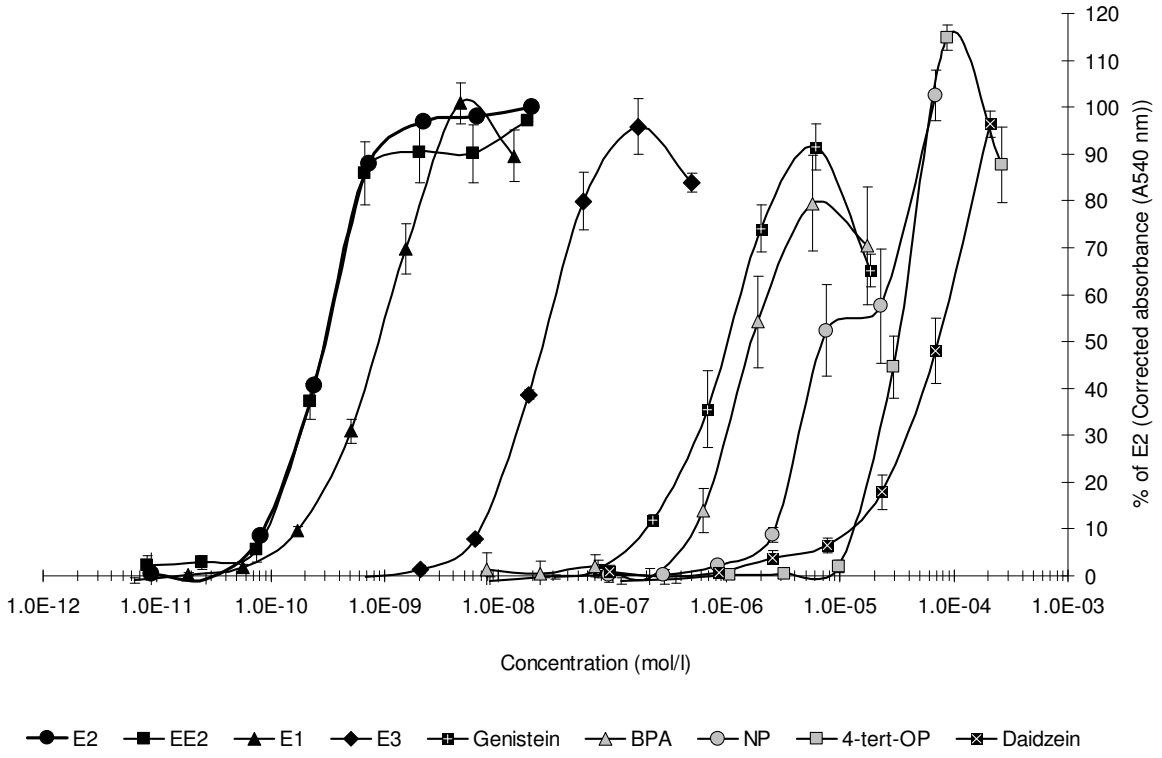


Fig. 2: Dose-response curves of estrogenic compounds in the YES. (Arithmetic means and standard deviations (*n*=4) of absorbance data (A540 nm), corrected for turbidity (A640 nm) and normalised to max. E2 response.)

Table 1: Effect concentrations and estradiol equivalent factors (EEFs) of different estrogenic compounds determined by the YES

Analyte	EC_{50}[a] (mol/l)	EEF[b] from EC_{50}
E2	1.8×10^{-10}	1
EE2	2.4×10^{-10}	1.25
E1	9.0×10^{-10}	2.5×10^{-1}
E3	2.2×10^{-8}	5.9×10^{-3}
Genistein	1.0×10^{-6}	1.5×10^{-4}
BPA	1.5×10^{-6}	1.2×10^{-4}
NP	7.0×10^{-6}	1.8×10^{-5}
4-*tert*-OP	3.1×10^{-5}	4.5×10^{-6}
Daidzein	6.0×10^{-5}	2.5×10^{-6}

[a] EC_{50}-values were calculated from dilution series (*n*=4).
[b] The EEF of each compound represents the activity in comparison to the E2 response of the same microtiter plate.

3.2 Estrogenic activity in samples taken in the Baltic Sea

Fig. 3 shows the estrogenic activities for three blank samples in comparison to the results for water samples taken in the Salzhaff (2004). All blank samples did not show any estrogenic activity. Thus, a contamination of cartridges during laboratory work could be excluded. The three samples taken in the Salzhaff showed inverted U-shaped dilution-response curves and a similar range of estrogenic activities. Exemplarily, the in situ sample induced a maximum response of 38% at a dilution of 1:4 which is equivalent to a concentration of 0.23 l-equivalents sample absolute per well. Based on the relating EC_{10}-value of E2, the activity of the in situ sample corresponds to 0.1 ng EEQ/l.

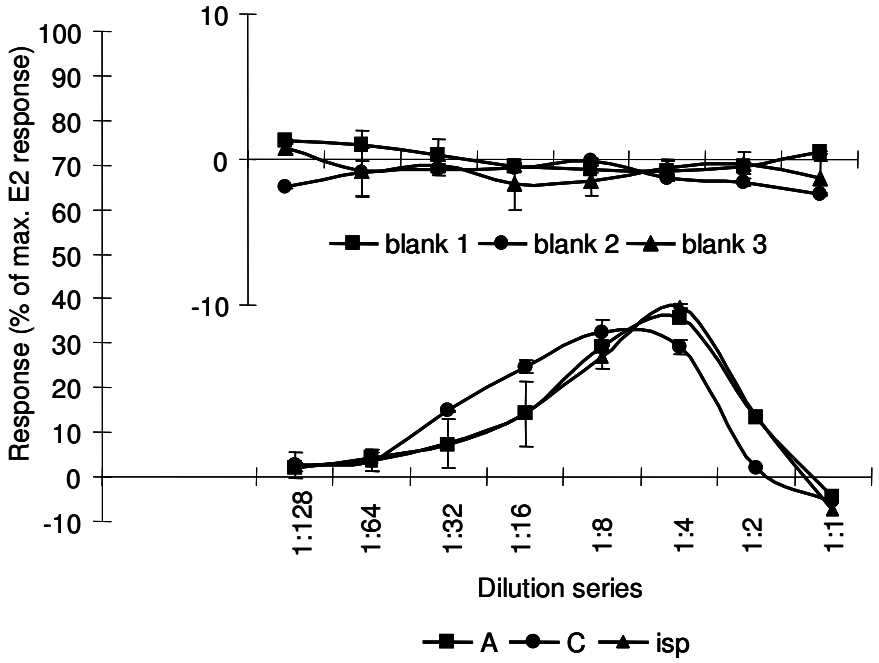


Fig. 3. Dilution-response curves for three water samples taken at the station Salzhaff (2004) and three blank samples analysed by the YES. (Arithmetic means and standard deviations (*n*=3) of absorbance data (A540 nm), corrected for turbidity (A640 nm) and normalised to max. E2 response).

Not only for samples from the Salzhaff, but for all field samples analysed, inverted U-shaped dose-response curves were obtained. The measurements of turbidity (A640 nm) compared to reference wells revealed a decreased cell density with higher sample doses. The inverse relationship between estrogenicity and inhibition of yeast growth as a function of dilution series (l-equivalents) is depicted in Fig. 4 for an in situ sample from Inner Wismar Bay (2003) with comparably high estrogenic activity

(0.46 ng/l EEQs). The inhibition of yeast growth was presumably caused by acute toxic sample constituents. However, data obtained by turbidity measurements (results not shown) revealed no interpretable relationships to sampling locations.

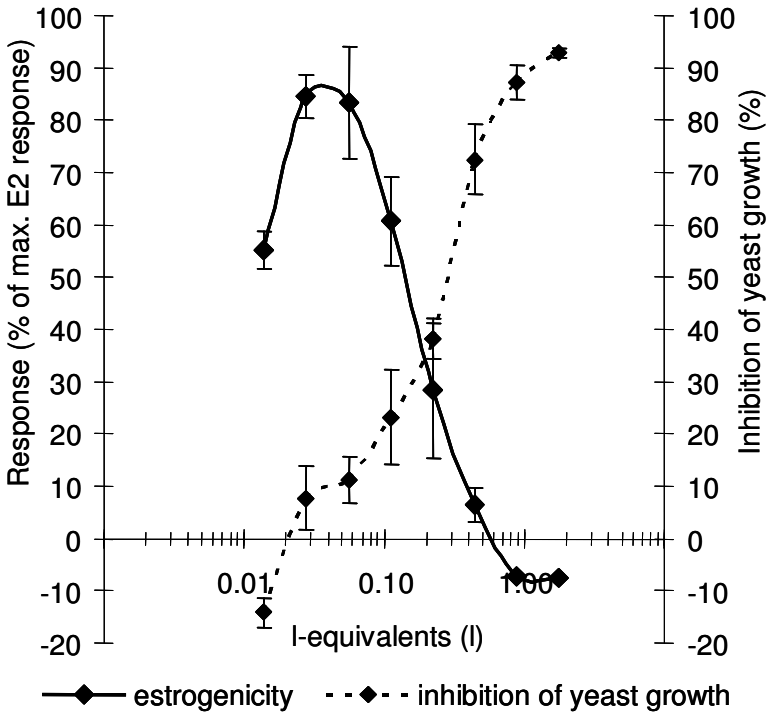


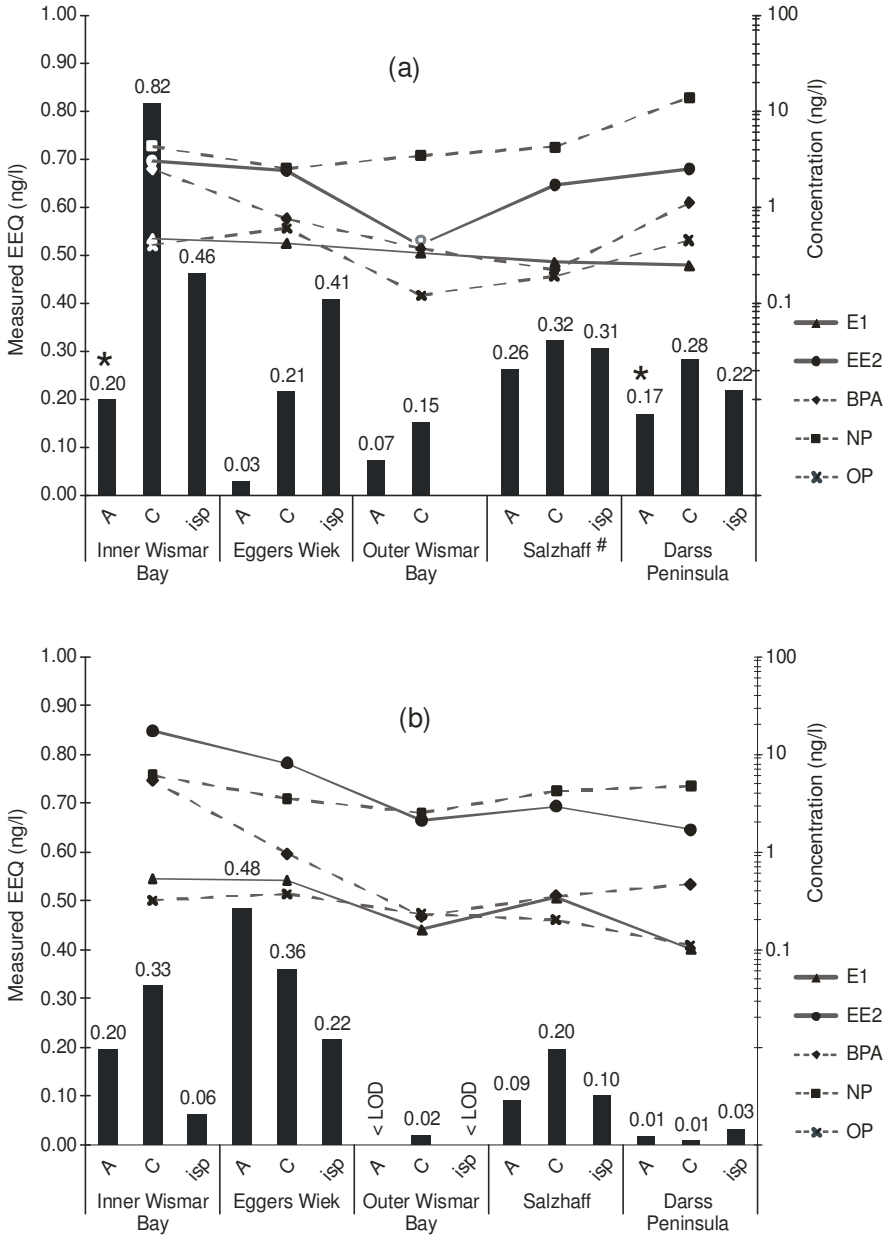
Fig. 4. Estrogenicity and inhibition of yeast growth in an in situ sample from the station Inner Wismar Bay (2003) measured by the YES. (Arithmetic means and standard deviations (*n*=3) of absorbance data (A540 nm), corrected for turbidity (A640 nm) and normalised to max. E2 response; inhibition of yeast growth expressed as absorbance at 640 nm and normalised to yeast growth of solvent controls).

A comprehensive overview of the results for estrogenicity for both sampling campaigns in July 2003 and July 2004 is given in Fig. 5. The bar plots represent the measured estrogenic activities, whereas analytical concentration data are integrated as arithmetic means including trendlines. The correlation between the obtained biological and chemical data is discussed later in section 3.3. In total, 29 water samples were measured with the YES. Only two samples showed a response lower than 10% and could therefore not be quantified. For the remaining samples significant estrogenicity could be observed, with EEQs all below 1 ng/l. The measured estrogenicity for samples taken in 2003 was in general higher than for samples taken in 2004, with the exception of station Eggers Wiek. The authors have no explanation for the decreased activities found in samples from 2004. Possible

reasons could be different origins of the investigated water bodies and/or varying inputs of estrogenic substances in the respective coastal environment. The highest estrogenic activities were found for samples from the station Inner Wismar Bay, whereas samples from 2003 showed a 2-3-fold activity compared to 2004 (0.20-0.82 and 0.06-0.34 ng/l EEQs, respectively). Eggers Wiek, the second station situated in inner coastal waters, showed EEQ values in the range of 0.03 to 0.41 ng/l (2003) with no apparent difference to the sampling in July 2004 (0.22-0.48 ng/l EEQ). Clear, positive estrogenic signals were obtained on analysing samples from the Salzhaff which showed an averaged EEQ of 0.13 ng/l (2004), which is approx. half of the value obtained for samples taken in 2003. Despite being far from inner coastal waters, samples from the Darss Peninsula taken in 2003 showed a significant estrogenicity ranging from 0.17 to 0.28 ng/l of EEQs. By comparison, samples from 2004 were approx. one order of magnitude less estrogenic (0.01-0.03 ng/l EEQs). The lowest observed estrogenicity could be determined for the location Outer Wismar Bay, where in 2004 only one sample showed an estrogenic activity slightly above 10%.

The unexpected estrogenicity observed for the outer located sampling sites suggests that there is a near-shore transport of estrogenic active compounds derived from inner coastal waters. Water flow from west to east in this coastal region is confirmed by the rates of sediment transportation (StAUN Rostock, 2004) and would support the hypothesis of a contaminant transport alongside the shore. The high estrogenic activities found in extracts from the Inner Wismar Bay, Eggers Wiek and Salzhaff are in agreement with the results of field studies concerning the reproductive health of eelpouts (*Zoarces viviparous*) carried out by Gercken and Sordyl (2002). Histopathological assessment of the gonads of male eelpouts showed a surprisingly high incidence of intersex conditions in species caught in inner coastal waters (Wismar, Salzhaff and Rostock) of the German Baltic Sea.

The deviations between estrogenic activities for individual stations are expected to be probably caused by changing heterogeneous water bodies. Samples from one station were taken at the same day, but not in parallel. A further reason that cannot be ignored is the variability of the biological test system, which showed a standard deviation of 22% of the EC_{50}-value for the positive control E2 (n=19, one outlier excluded).



incubation time was set to 96 hours due to an insufficient yeast growth followed by a decelerated response in the YES

* samples were prepared with a different clean-up procedure

Note, that the bar plots represent results for individual samples obtained by the YES, whereas concentration data are given as arithmetic means for the sampling stations. EE2 concentration in the Outer Wismar Bay (2003) was below the method detection limit, which is marked as an unfilled circle.

Fig. 5. Measured estradiol equivalents (bar plots) obtained by the YES and averaged concentrations for estrogenic compounds in surface water extracts taken at five different stations in the German Baltic Sea during sampling campaign in 2003 (a) and 2004 (b).

3.3 *In vitro* results versus calculated EEQs

The measured estrogenicities are presented in combination with results from chemical analysis in Fig. 5. The concentrations measured in samples from 2003 ranged from < MDL to 3.0 ng/l for the steroidal estrogens (E1 and EE2). The phenolic xenoestrogens (BPA, NP and 4-*tert*-OP) could be quantified in similar ranges (0.12-13.8 ng/l, 2003), but due to their considerably lower estrogenic potencies (see Table 1) they play only a minor role concerning the total estrogenicity of these samples. This conclusion also applies to samples taken in 2004. Relative proportions of steroid estrogens and phenolic xenoestrogens did not vary significantly between the different sampling stations. More detailed results of chemical analysis are published in Beck et al. (2005). A regression analysis of measured and calculated EEQs showed that the two sets of values do not correlate very well (R^2=0.39 for 2003, R^2=0.34 for 2004). For an exemplarily comparison the corresponding data from samples taken in 2003 are listed in Table 2.

Table 2: Measured estradiol equivalents and calculated estradiol equivalents for samples taken in July 2003

Location	Measured EEQs (ng/l)			Calculated EEQs (ng/l)		
	A	C	isp	A	C	isp
Inner Wismar Bay	0.20	0.82	0.46	0.02	3.95	4.85
Eggers Wiek	0.03	0.21	0.41	0.01	0.06	9.01
Outer Wismar Bay	0.07	0.15	-	0.04	0.04	-
Salzhaff	0.26	0.32	0.31	2.09	2.06	2.24
Darss Peninsula	0.17	0.28	0.22	0.01	4.08	2.71

The calculated EEQs for samples from the locations Inner Wismar Bay and Salzhaff are approx. 10-fold higher than the measured estrogenicity. The values obtained for Outer Wismar Bay are in the same range, whereas for Eggers Wiek and the Darss Peninsula no uniform behaviour could be observed. The differences between measured and calculated EEQs could have diverse reasons. In general, both the variability of the biological test system and the measurement uncertainty of trace analysis in the ng per litre range could contribute for deviations. Significantly higher values obtained in the YES indicate, that there are estrogenic compounds in the samples, which were not determined by the chemical target analysis. Anti-estrogenic

activities could be the reason for the lower EEQs measured with the YES. This comparison underlines the difficulty in achieving consistent results from biological and chemical analysis, especially in the case of complex environmental samples.

In both sampling campaigns the main contributors to the overall estrogenicity were the natural and synthetic steroids, which is in line with other studies (Desbrow et al., 1998; Körner et al., 2001; Cargouët et al., 2004; Nakada et al., 2004; Rutishauser et al., 2004). For example, for the sampling station Inner Wismar Bay (2003) the percentage contribution of EE2 to the overall estrogenicity calculated from chemical data was approx. 98.5%, whereas E1 contributed with approx. 1.5% to the calculated overall estrogenicity (individual calculated EEQs are not shown). Hence, uncertainties in the quantification of the main contributor to the observed estrogenicity (EE2), caused by matrix interferences during LC-MS/MS measurements, could strongly affect the values for calculated EEQs. The results obtained by chemical analysis indicate the presence of natural and synthetic hormones in the range of predicted no effect concentrations (PNECs) currently under discussion (0.1 ng/l for EE2, 3 ng/l for E1; Defra, 2004), whereas the analytical determined concentrations for the measured xenoestrogens were one ore more orders of magnitudes lower than their PNECs ranging from 61 ng/l (4-*tert*-OP) to 330 ng/l (NP) (OSPAR Commission, 2003; European Commission, 2002, respectively).

4. Conclusions

The YES was a suitable screening tool for the determination of the overall estrogenic activity in complex samples taken from a marine environment and gave first evidence for the estrogenicity of surface water extracts from a coastal zone in the German Baltic Sea. Samples from inner coastal waters (Inner Wismar Bay, Eggers Wiek and Salzhaff) generally showed higher responses than samples from the Outer Wismar Bay or Darss Peninsula. In the YES, inhibition of yeast growth was the reason for the masking of estrogenic response in more highly concentrated extracts. The occurrence of estrogenicity is supported by the presence of estrogenic compounds (EE2, E1, BPA, 4-*tert*-OP, NP) quantified with LC-MS/MS. A comparison between the measured and calculated EEQs showed differences within one order of magnitude. Synthetic and natural hormones (EE2 and E1, respectively) could be identified as the main contributors to the estrogenic activity of the surface waters analysed. As a cell-

based *in vitro* assay the YES does not contain all the complex endocrine-regulated mechanisms present in vertebrates. Hence, a correlation between the estrogenicity measured by the YES and the reproductive disorders found in fishes caught in the German Baltic Sea would be presumptuous. Therefore, studies with integrated methods using the combination of chemical analysis and *in vivo* exposure experiments would be adequate and necessary.

Acknowledgements

The water sampling was performed with in situ pump systems from the Baltic Sea Research Institute, Warnemuende (IOW, Germany). The Institute and especially Dr. Peter Kömp and Dr. Kilian Smith are kindly acknowledged for their help. We thank Armando Caba for his assistance during the sampling campaigns.

References

Allen, Y., Matthiessen, P., Scott, A.P., Haworth, S., Feist, S., Thain, J.E., 1999. The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments - further surveys of flounder. Sci. Total. Environ. 233, 5-20.

Aerni, H.-R., Kobler, B., Rutishauser, B.V., Wettstein, F.E., Fischer, R., Giger, W., Hungerbühler, A., Marazuela, M.D., Peter, A., Schönenberger, R., Vögeli, A.C., Suter, M.J.-F., Eggen, R.I.L., 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plants. Anal. Bioanal. Chem. 378, 688-696.

Andersen, H.R., Andersson, A.-M., Arnold, S.F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N.A., Bjerregaard, P., Christiansen, L.B., Gissel, B., Hummel, R., Jørgensen, E.B., Korsgaard, B., Le Guevel, R., Leffers, H., McLachlan, J., Møller, A., Nielsen, J.B., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K.L., Perez, P., Skakkebœk, N.E., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Sumpter, J.P., Thorpe, S.M., Grandjean, P., 1999. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. Environ. Health Perspect. 107, 89-108.

Beck, I.-C., Bruhn, R., Gandrass, J., Ruck, W., 2005. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. J. Chromatogr. A 1090, 98-106.

Brzozowski, A.M., Pike, A.C.W., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engström, O., Öhman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.-A., Carlquist, M., 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. Nature 389, 753-758.

Cargouët, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., Levi, Y., 2004. Assessment of river contaminants by estrogenic compounds in Paris area (France). Sci. Total Environ. 324, 55-66.

Céspedes, R., Petrovic, M., Raldúa, D., Saura, Ú., Piña, B., Lacorte, S., Viana, P., Barceló, D., 2004. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. Anal. Bioanal. Chem. 378, 697-708.

Daston, G.P., Gooch, J.W., Breslin, W.J., Shuey, D.L., Nikiforov, A.Y., Fico, T.A., Gorsuch, J.W., 1997. Environmental estrogens and reproductive health : A discussion of the human and environmental data. Reprod. Toxicol. 11, 465-481.

Defra, 2004. UK-Department for environment food and rural affairs. Assessment of the potential costs to the water industry of reducing oestrogenic steroid discharges in treated sewage effluent–final report WQD0004: http://www.fwr.org/defrawqd/wqd0004.htm.

Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* screening. Environ. Sci. Technol. 32, 1549-1558.

European Commission, 2002. European Union Risk Assessment Report: 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol. pp 117-118.

Gaido, K.W., Leonard, L.S., Lovell, S., Gould, J.C., Babai, D., Portier, C., McDonnell, D.P., 1997. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. Toxicol. Appl. Pharmacol. 143, 205-212.

García-Reyero, N., Grau, E., Castillo, M., López de Alda, M.J., Barceló, D., Piña, B., 2001. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. Environ. Toxicol. Chem. 20, 1152-1158.

Gercken, J., Sordyl, H., 2002. Intersex in feral marine and freshwater fish from northeastern Germany. Mar. Environ. Res. 54, 651-655.

Heisterkamp, I., Gandrass, J., Ruck, W., 2004. Bioassay-directed chemical analysis utilizing LC–MS: a tool for identifying estrogenic compounds in water samples? Anal. Bioanal. Chem. 378, 709-715.

Helsinki Commission, 2003. The Baltic Marine Environment 1999-2002. Baltic Sea Environment Proceedings No. 87, 2003.

Houtman, C., Van Oostveen, A.M., Brouwer, A., Lamoree, M.H., Legler, J., 2004. Identification of Estrogenic Compounds in Fish Bile Using Bioassay-Directed Fractionation. Environ. Sci. Technol. 38, 6415-6423.

Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. Environ. Sci. Technol. 32, 2498-2506.

Juberg, D.L., 2000. An Evaluation of Endocrine Modulators: Implications for Human Health. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 93-105.

Körner, W., Spengler, P., Bolz, U., Schuller, W., Hanf, V., Metzger, J.W., 2001. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 2. Biological Analysis. Environ. Toxicol. Chem. 20, 2142-2151.

Kortenkamp, A., Altenburger, R., 1998. Synergisms with mixtures of xenoestrogens: A reevaluation using the method of isoboles. Sci. Total Environ. 221, 59-73.

Lorenzen, A., Hendel, J.G., Conn, K.L., Bittman, S., Kwabiah, A.B., Lazarovitz, G., Massé, D., McAllister, T.A., Topp, E., 2004. Survey of hormone activities in municipal biosolids and animal manures. Wiley Periodicals, 216-225.

Matthiessen, P., 2003. Historical perspective on endocrine disruption in wildlife. Pure Appl. Chem. 75, 2197-2206.

Nakada, N., Nyunoya, H., Nakamura, M., Hara, A., Iguchi, T., Takada, H., 2004. Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. Environ. Toxicol. Chem. 23, 2807-2815.

Oberdörster, E., Cheek, A.O., 2000. Gender benders at the beach: Endocrine disruption in marine and estuarine organisms. Environ. Toxicol. Chem. 20, 23-36.

OSPAR Commission, 2003. OSPAR background document on octylphenol. ISBN 1-904426-19-0. pp 26-28.

Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. Chem. Ecol. 8, 275-285.

Quirós, L., Céspedes, R., Lacorte, S., Viana, P., Raldúa, D., Barceló, D., Piña, B., 2005. Detection and evaluation of endocrine-disrupting activity in water samples from Portuguese rivers. Environ. Toxicol. Chem. 24, 389-395.

Rajapakse, N., Silva, E., Kortenkamp, A., 2002. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. Environ. Health Perspect. 110, 917-921.

Routledge, E.J., Sumpter, P., 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environ. Toxicol. Chem. 15, 241-248.

Rutishauser, B.V., Pesonen, M., Escher, B., Ackermann, G.E., Aerni, H.-P., Suter, M.J.-F., Eggen, R.I.L., 2004. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three *in vitro* assays and chemical analysis of steroids. Environ. Toxicol. Chem. 23, 857-864.

Silva, E., Rajapakse, N., Kortenkamp, A., 2002. Something from „nothing“-eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. Environ. Sci. Technol. 36, 1751-1756.

StAUN Rostock, oral communication, 2004.

Sumpter, J.P., Jobling, S., 1995. Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. Environ. Health Perspect. 103, 173-178.

Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. Crit. Rev. Toxicol. 28, 319-361.

6. Publikation III:

Acta hydrochimica hydrobiologica *submitted*

Bioassay-directed fractionation for analyzing estrogens in surface waters of the German Baltic Sea

Iris-Constanze Beck[a,b], Regina Bruhn[a], Juergen Gandrass[a]

[a] *GKSS Research Centre, Institute for Coastal Research, Max-Planck-Str. 1, D-21502 Geesthacht, Germany*
[b] *University of Lueneburg, Faculty of Environmental Sciences, Institute for Ecology and Environmental Chemistry, Scharnhorststr. 1, D-21335 Lueneburg, Germany*

Abstract

A reversed-phase fractionation method has been developed to estimate the contributions of the most potent estrogens to observed estrogenic effect potentials. Surface water samples were taken in the German Baltic Sea (Inner Wismar Bay and Darss Peninsula, Sampling campaign July 2003) and were separated into seven individual fractions. Three fractions showed significant estrogenic activities and clear dose-dependant responses were obtained in the yeast estrogen screen (YES). In the 2nd fractions liquid chromatographic-electrospray-tandem mass spectrometric (LC-ESI-MS/MS) analyses showed the presence of bisphenol A (Inner Wismar Bay: 4.8 and 6 ng L^{-1}; Darss Peninsula: 0.91 and 1.7 ng L^{-1}) and ethinylestradiol (Inner Wismar Bay: 2.0 and 6.0 ng L^{-1}; Darss Peninsula: < MDL and 1.7 ng L^{-1}), whereas estrogenic activities in the YES were only around 10% of the positive control E2. Although not identified prior in the total extract the natural hormones estradiol (Inner Wismar Bay: 0.13 and 0.19 ng L^{-1}; Darss Peninsula: 0.12 and 0.16 ng L^{-1}) and estriol (Inner Wismar Bay: < MDL and 0.33 ng L^{-1}; Darss Peninsula: < MDL) could be detected in the 3rd fractions, where high estrogenic potentials could be observed. The 4th fractions showed high responses as well and estrone were herein quantified with concentrations of 0.16 and 0.18 (Darss Peninsula) up to 0.37 ng L^{-1} (Inner Wismar Bay). Measured and calculated estradiol equivalents for individual fractions correlated very well (R^2=0.78), when disregarding results of the 2nd fraction, where high deviations occurred.

Keywords: Bioassay-directed chemical analysis; Reversed-phase fractionation; HPLC-ESI-MS-MS; Yeast Estrogen Screen; Marine environment

1. Introduction

A great number of compounds have the ability to interact with the endocrine system of organisms. The binding to the estrogen receptor (ER) may be followed by an alteration of normal gene expression resulting in a destabilization of the endocrine system. Among endocrine disrupting compounds (EDCs) natural and synthetic hormones are known to have the highest estrogenic potency and are in most cases identified as the main contributors to the estrogenicity of environmental samples (Desbrow et al., 1998; Aerni et al., 2004; Cargouët et al., 2004; Houtman et al., 2004). Caused by their release via sewage treatment plant (STP) effluents into surface waters, effects of endocrine disruptors have been reported especially from aquatic ecosystems (Jobling et al., 1998; Allen et al., 1999; Fossi et al., 2004; Kirby et al., 2004). The exposure to EDCs may lead to a variety of effects in the field of developmental and reproductive disorders (Colborn, 2004). In cage experiments Purdom et al. (1994) could show that ethinylestradiol, a synthetic steroid hormone mainly used in birth control pills, induced vitellogenin synthesis in male rainbow trouts at concentrations as low as 0.1 ng L^{-1}. The induction of vitellogenin, a female yolk precursor protein, is often used as a biomarker for the evidence of endocrine disruption. In effluents and receiving river waters natural and synthetic hormones have been detected in the pg to ng per litre range (Belfroid et al., 1999; Baronti et al., 2000; Kuch and Ballschmiter, 2001). For coastal marine environments analytical data are scarce, possibly due to higher demands on analytical instrumentation and sample preparation. However, data from Atkinson et al. (2001) as well as from Beck et al. (2005a) reveal, that natural and synthetic hormones are also present in the low but relevant ng per litre range in anthropogenic influenced regions of marine ecosystems.

Previously accomplished chemical analyses of surface water samples taken in the German Baltic Sea showed the occurrence of the natural and synthetic hormones estrone and ethinylestradiol, and the xeno-estrogens bisphenol A, nonylphenol and 4-*tert*-octylphenol (Beck et al., 2005a). Concentration data were combined with relative estrogenic potencies of the analytes and were related to the measured estrogenicity (YES), which resulted in the presumption that estrone and ethinylestradiol were the main responsible compounds of occurring estrogenic activities (Beck et al., 2005b).

The main objective of the study presented here was to develop a bioassay-directed fractionation to estimate the contributions of the most potent estrogens to observed

individual effect potentials. Therefore a separation of major compounds causing the estrogenicity was required. Moreover, a fractionation should reduce the amount of interfering substances during LC-ESI-MS/MS measurements and cut of toxic components, which were responsible for inverted U-shaped dose-response curves obtained for total extracts using the YES. Results obtained by chemical and biological analyses of individual fractions were compared. In principle, the results of bioassay-directed fractionation can indicate the presence of (anti-)estrogenic substances not included in the target analysis.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Standard substances used in the YES and in the chemical analysis were: estrone (E1), 17β-estradiol (E2), estriol (E3) and 17α-ethinylestradiol (EE2) from Sigma (Seelze, Germany), 4-nonylphenol (NP) from Riedel de Haën (Seelze, Germany), 4-*tert*-octylphenol (4-*tert*-OP) from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany), bisphenol A (BPA), genistein and daidzein from Fluka (Buchs SG, Switzerland). Stock solutions of these substances were prepared in methanol at 1 µg μL^{-1}. Calibration as well as spiking mixtures were diluted from stock solutions and contained all analytes. Methanol SupraSolv® and ammonium acetate Fractopur® were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Deionised organic-free water was obtained from a Milli-Q Plus 185TM coupled to an Elix 5TM system (Millipore, Schwalbach, Germany).

2.2 Sampling and preparation of solid-phase extracts

Surface water samples from five locations in the German Baltic Sea (Sampling Campaigns in July 2003 and July 2004) were analysed for the occurrence of estrogens and xenoestrogens (Beck et al., 2005a) and for their overall estrogenicity (Beck et al., 2005b). All sampling sites were located in north-eastern Germany. The bioassay-directed fractionation was applied to total extracts from two sampling locations of sampling campaign 2003, which showed significant estrogenicity. Hence, fractionation was performed using aliquots of total extracts from Inner Wismar Bay (n=2) and from the outer located station Darss Peninsula (n=2). The station Inner Wismar Bay is situated in inner coastal waters, where Gercken and Sordyl (2002) could observe symptoms of endocrine disruptions in eelpouts (*Zoarces viviparous*).

For fractionation one in situ sample (isp) and one sample from container experiments (C) were chosen. Details of the sampling procedure and the preparation of the solid-phase extracts are described elsewhere (Beck et al., 2005a). In brief, surface water samples were filtered in situ through glass fibre filters and were extracted using solid-phase extraction with previously conditioned Oasis HLB (N-vinylpyrrolidone-divinylbenzene copolymer) cartridges. For container experiments the surface water was pumped on board, where three stainless steel containers were filled in an alternating manner. The samples from container experiments were extracted with Oasis HLB cartridges directly connected to the containers at 2 bar excess pressure of nitrogen. From the final extract volume of 400 µL an aliquot of 100 µL was used to perform fractionation with subsequent analyses of individual fractions using LC-MS/MS and the YES.

2.3 Reversed-phase separation and fractionation

Reversed-phase separation of a standard mixture was tested with a method development kit containing five different reversed phase columns from Phenomenex, (Aschaffenburg, Germany). Four of them were from the Synergi^{TM} column line (Hydro-RP, Polar-RP, Fusion-RP, Max-RP) and one Luna C18(2) column was chosen. All test columns were of the same size (150 x 2 mm) with a particle size of 4 µm for the Synergi^{TM} columns and 3 µm for the Luna column. Analytes were separated using an Agilent Series 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with a gradient program of the mobile phases A (water) and B (methanol) without any additives. The gradient was as follows: 30% B > 90% B (8

min) / 90% B > 100% B (15 min) / 100% B (5 min) / 100% B > 30% B (2 min). 10 µL of a standard mixture at a concentration level of 0.05 ng μL^{-1} were injected. The identification of analytes was performed as described in Section 2.4. The aim of these runs was an optimised chromatography with a peak separation of E1 and EE2 as suggested main contributors to the previously measured overall estrogenicity. Due to results presented in Section 3.1 the Synergi™ Polar-RP phase was chosen. For sample fractionation a column with following dimensions was used: 250 x 4.6 mm with a particle size of 5 µm. The column was guarded with a pre-column of the same packing (4 x 3 mm). 100 µL aliquots of selected sample extracts were injected manually and fractionated with a flow rate of 1 mL min^{-1} using a gradient of A (water) and B (methanol) without additives: 50% B > 100% B (50 min) / 100% B (2 min) / 50% B (3 min). Based on recovery experiments seven fractions were collected (1^{st} fraction: 0-6 min, 2^{nd} fraction: 6-19 min, 3^{rd} fraction: 19-24 min, 4^{th} fraction: 24-29 min, 5^{th} fraction: 29-35 min, 6^{th} fraction: 35-40 min, 7^{th} fraction: 40-52 min). The fraction volumes were reduced to dryness using a N_2 evaporation device adjusted to a temperature of 40 °C and were resolved in 200 µL of methanol. An aliquot of 100 µL was needed for chemical analysis: 50 µL for determination of analyte concentrations and a 50 µL aliquot spiked with a defined amount of standard solution for calculation of signal suppression occurring during LC-ESI-MS/MS measurements. The remaining aliquot of 100 µL was used for screening estrogenic activities of individual fractions by the YES.

2.4 Liquid chromatography-mass spectrometry

Liquid chromatography was performed on an Agilent Series 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) using a C18 reversed-phase column (Synergi™ Hydro-RP, 150 x 2.0 mm, 4 µm particle size). The column was guarded with a precolumn of the same packing material (4.0 x 2.0 mm), both from Phenomenex (Aschaffenburg, Germany). Chromatography was carried out using a gradient of the mobile phases A (water) and B (methanol), both containing 2.5 mM ammonium acetate: 30% B > 90% B (8 min) / 90% B > 100% B (15 min) / 100% B (5 min) / 100% B > 30% B (2 min). The system was re-equilibrated for 5 minutes between runs. The flow rate of the mobile phase was set to 200 µL min^{-1}. Injection volume was 10 µL. The LC system was coupled to a triple-stage quadrupole mass spectrometer (API 4000, Applied Biosystems/MDS Sciex, Darmstadt, Germany).

For mass spectrometric detection the multiple reaction monitoring (MRM) mode was chosen. Detailed informations concerning the mass spectrometric conditions were given previously (Beck et al., 2005a). An external seven-point calibration in the range of 50 pg to 5 ng absolute was used for quantification. Calculated concentrations of individual fractions were corrected for signal suppression. Signal suppression was determined from aliquots of the fractions spiked prior to LC-MS/MS analysis (spiking level of approx. 3 ng L^{-1}).

2.5 Yeast estrogen screen (YES)

The recombinant YES was kindly provided by J. Sumpter (Brunel University, Uxbridge, UK) and was carried out as described by Routledge and Sumpter (Routledge and Sumpter, 1996). The performance of the bioassay is described in Beck et al. (2005b), but an overview is given here. 17β-estradiol as positive control and fractions of sample extracts were produced in methanol and 10 µL of dilution series were dispensed into triplicate wells of 96-well microtiter plates. Before adding 200 µL of the growth medium containing the yellow chromogenic substrate chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG), the plates were allowed to evaporate to dryness at room temperature. During incubation at 32°C for 72 hours the microtiter plates were shaken at 80 rpm. Afterwards, the absorbance at 540 nm was measured, which is regarded as estrogenic activity after subtraction of absorbance at 640 nm to correct for growth of the yeast cells. The absorbance at 640 nm compared to reference wells (solvent control) was evaluated as a parameter for the inhibition of yeast cell growth caused by acute toxicity.

Responses obtained in the YES are expressed as measured estradiol equivalents (EEQs) and were determined as follows: Estrogenic activities of fractions are expressed as a percentage of the maximum response of the positive control E2 from the same microtiter plate and are plotted to logarithmically transformed L-equivalents of water sample absolute per well. The response of fractions was interpolated from the E2 dose-response curve obtained from the same microtiter plate based on a 10% response (EC_{10}) for 2nd fractions, whereas a basis of a 20% response (EC_{20}) was used for the 3rd and 4th fractions.

In order to compare the results of the biological and chemical analysis and to estimate the contribution of target analytes to the estrogenicity of the individual fractions, calculated E2 equivalents (EEQs) were determined. Therefore

concentration data obtained by LC-MS/MS analysis were multiplied with previously determined relative potencies (RP) of the target analytes (i) (see Beck et al., 2005b) using the YES:

Σ Calculated EEQ (i) = Σ RP (i) * c (i)

The sum of the EEQ-values calculated for all individual compounds represent the calculated estrogenicity of each individual fraction. Previously obtained results for total extracts should be in agreement with the sum of values obtained for the seven fractions.

3. Results and discussion

3.1 Peak separation and recoveries of analytes using a RP-HPLC fractionation

The separation of the estrogenic compounds, which seem to be mainly responsible for the measured overall estrogenicity in total extracts, was tested with five different reversed-phase columns. The columns chosen provide performance over a wide range of polarity. Synergi Max^{TM} is developed for highest selectivity of non-polar compounds, whereas the Synergi Polar-RP column allows highest selective retention of polar and aromatic compounds. Columns like the Luna C18(2), Synergi Hydro-RP and Synergi Fusion-RP cover the range for selectivity of mid-polar compounds. Chromatography of E1 and EE2 is depicted in Fig.1. Caused by their similar physico-chemical characteristics both analytes showed resembling behaviours of retention on all phases tested here. Only the Polar-RP column equipped with an ether-linked phenyl phase with polar endcapping achieves a chromatography selective enough for a clear separation of both analytes. The separation seems to be caused by π-π interactions between the phenolic groups of the analytes and the phenyl functional group of the Synergi Polar-RP phase.

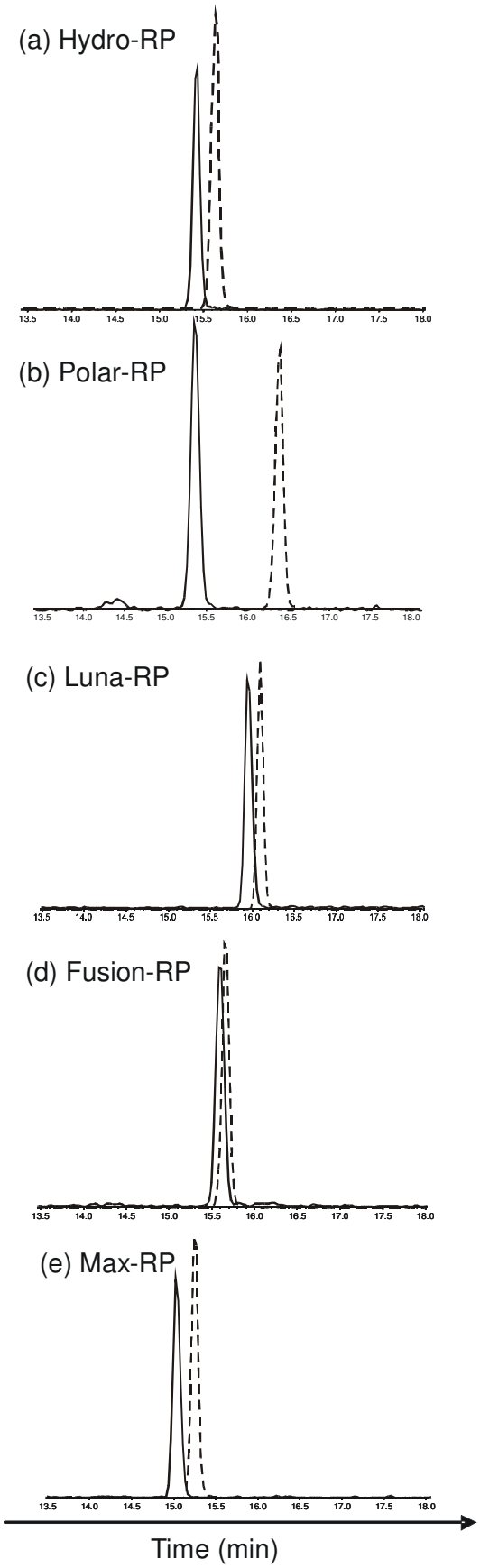


Fig. 1. Chromatographic separation of EE2 (continuous line) and E1 (discontinuous line) using different RP-columns.

Due to the required fractionation of a 100 µL sample aliquot in one step, a Synergi Polar-RP column with larger dimensions (250 x 4.6 mm) was used for fractionation of the total extracts. The eluate was fractionated into seven portions. To determine losses caused by the fractionation including subsequent laboratory procedures, recoveries experiments (*n*=3) were carried out by injecting 100 µL of a 0.5 ng μL^{-1} standard mixture (data not shown). For the estrogens sufficient recovery rates from 65 (genistein) up to 99% (E3) were achieved, whereas recoveries of 3 to 12% (4-*tert*-OP and NP, respectively) revealed significant losses of both alkylphenols. As these are more volatile losses can most probably be attributed to the procedure of reducing the fraction volume to dryness. However, results indicate that for field samples losses are less significant. Accompanying substances seem to function as a kind of keeper preventing the alkylphenols from volatilizing to a significant extent.

3.2 Measured estrogenicity in individual fractions

From seven fractions collected, three showed significant estrogenicity. The 2^{nd} fractions showed low estrogenic activities around 10% of the maximum response of the positive control E2. But the 3^{rd} and 4^{th} fractions showed responses higher than 80%. A comparison of estrogenic responses between the total extract of the in situ sample from the Inner Wismar Bay and its three active fractions is depicted in Fig. 2. In contrast to the response of the total extract, where occurring cell toxicity was leading to a decreasing response in the YES, when higher amounts of sample extracts were used (see Beck et al., 2005b), the three active fractions showed no significant toxicity at all. As a result, classical dose-response relationships for the 3^{rd} and 4^{th} fraction were obtained, with calculated EEQs of 0.28 and 0.17 ng L^{-1}, respectively. The sum of EEQ values for all active fractions is in good agreement with previously obtained results for the total extracts (Table 1).

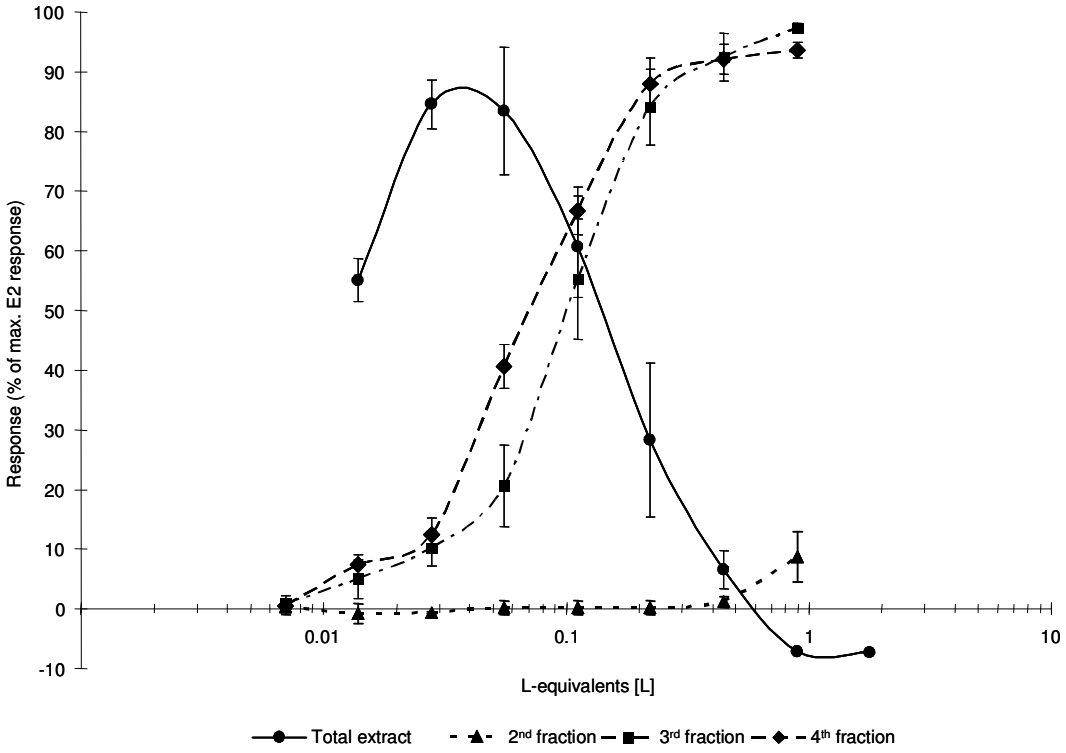


Fig. 2: Dose-response curves for the total extract of the in situ sample from Inner Wismar Bay and its three estrogenic fractions obtained by the YES. (Arithmetic means and standard deviations (*n*=3) of absorbance data (A540nm), corrected for turbidity (A640nm) and normalised to max. E2 response).

Table 1: Measured estradiol equivalents (EEQ) for seven fractions of four estrogenic samples taken in the German Baltic Sea (Inner Wismar Bay and Darss Peninsula) by in situ (isp) and container (C) experiments.

	Measured estradiol equivalents (ng L^{-1})			
	Inner Wismar Bay		Darss Peninsula	
Fractions	C	isp	C	isp
1st fraction	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
2nd fraction	0.01	< LOQ	< LOQ	< LOQ
3rd fraction	0.28	0.28	0.09	0.07
4th fraction	-[a]	0.17	0.04	0.07
5th fraction	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
6th fraction	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
7th fraction	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Sum fractions	-[a]	0.45	0.13	0.14
Total extract[b]	0.82	0.46	0.28	0.22

The LOQ in the YES is defined as estrogenic activity lower than 10% of the max. response of the positive control E2.

[a] The 4th fraction of sample C was lost during laboratory work.

[b] Results for the total extract were obtained previously (see Beck et al., 2005b).

3.3 Combining analytical concentrations of estrogenic compounds with measured estrogenicity in the YES

The concentrations shown in Table 2 are corrected for signal suppression. After fractionation BPA and EE2 could be quantified in the 2nd fraction. E2 and E3 were eluting in the 3rd and E1 in the 4th fraction. The alkylphenols NP and 4-*tert*-OP were detected in the 5th fraction. The phytoestrogens daidzein and genistein could not be identified at all. Concentrations determined in the individual fractions were in the range of 0.10 (4-*tert*-OP) to 16.7 ng L^{-1} (NP). These concentration data deviated from results for total extracts (see Beck et al., 2005a) by factors from 1 to 2, with the exception of NP showing higher deviations. The discrepancy for NP could be explained by possible contamination during the fractionation procedure and/or losses during the 4 to 5 hours lasting drying of the fraction volume. The fractionation allowed quantifying E2, which was not detectable in total extracts.

Table 2: Concentrations of analytes in seven fractions from four estrogenic samples taken in the German Baltic Sea.

		Concentrations (ng L^{-1})			
		Inner Wismar Bay		Darss Peninsula	
Fractions	Analytes	C	isp	C	isp
1st fraction	-	-	-	-	-
2nd fraction	BPA	6.0	4.8	0.91	1.7
	EE2	2.0	6.0	1.7	< MDL
3rd fraction	E2	0.19[a]	0.13[a]	0.16[a]	0.12[a]
	E3	0.33[a]	< MDL	< MDL	< MDL
4th fraction	E1	-[b]	0.37	0.16	0.18
5th fraction	NP	16.7	3.1	9.3	1.5
	4-*tert*-OP	0.37	0.10	0.14	< MDL
6th fraction	-	-	-	-	-
7th fraction	-	-	-	-	-

[a] Concentrations are between method detection limit (MDL) and method quantification limit (MQL).
[b] The 4th fraction of sample C was lost during laboratory work.

Chromatograms for a standard solution of E2, the 3rd fraction of field sample C from Inner Wismar Bay and its spiked aliquot is depicted in Figure 3.

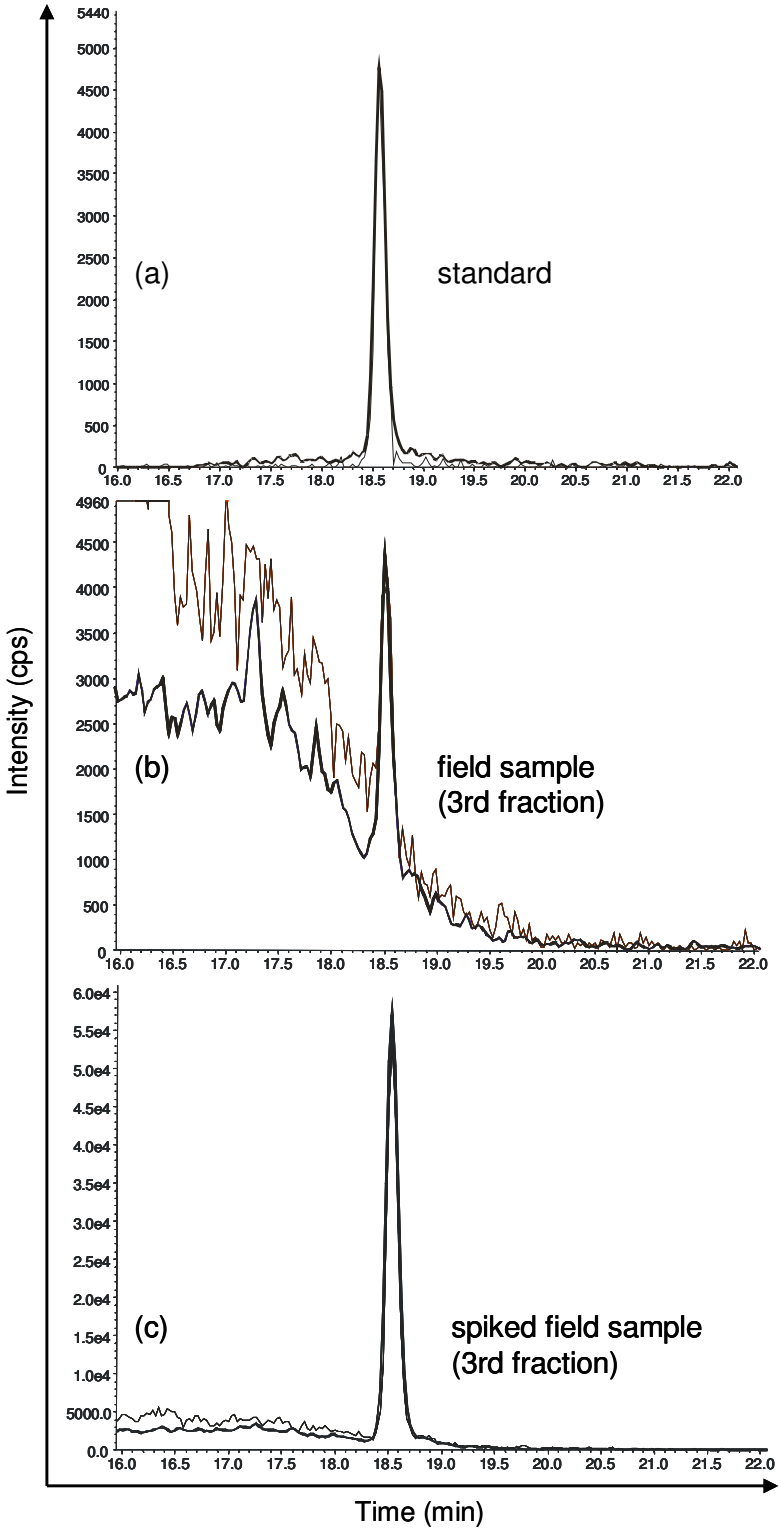


Fig. 3. Chromatograms of E2 showing quantifier (bold line) and qualifier of (a) a standard solution, (b) the 3rd fraction of the in situ sample from Inner Wismar Bay and (c) the corresponding spiked aliquot of the 3rd fraction.

To allow a comparison between calculated and measured EEQs, in some cases as in Fig. 3 (b) a semi-quantitative estimation was carried out for analyte concentrations between MDL and MQL. In the fraction shown in Fig. 3 (b), a concentration of 0.19 ng L^{-1} was determined. The signal suppression calculated for the measurement of individual fractions was much lower than occurring interferences during the analyses of total extracts. This additional benefit is responsible for the identification of E2 in 3rd fractions and allowed a more detailed clarification of measured estrogenicities. In contrast to concentration data from sewage treatment plant effluents (Aerni et al., 2004; Johnson et al., 2005) or receiving river waters (e.g. Cargouët et al., 2004), EE2 was quantified at significantly higher concentrations than the natural hormone E2 in the surface water samples of the Baltic Sea. To the authors' knowledge, there are no comparative data for marine environments from other authors. Possible explanations are the higher persistence of synthetic hormones as EE2 compared to natural hormones E2 (Ying et al., 2002) as well as analytical measurement uncertainties in quantifying EE2 (see Beck et al., 2005a).

In Fig. 4 a correlation between measured and calculated estradiol equivalent concentrations is done. Considering results without data for 2nd fractions (depicted as triangles) a good correlation (R^2=0.78) for measured and calculated EEQs was obtained. Comparing calculated with measured EEQs deviations up to a factor of 2 occurred, which is accounted as a rather good accordance. In 3rd fractions E2 and in 4th fractions E1 were identified as main contributors to the estrogenicity. In contrast to the analytical concentrations of EE2 measured in 2nd fractions in the range of 0.0 up to 6.0 ng L^{-1} (in situ samples from Darss Peninsula and Inner Wismar Bay, respectively) only low estrogenicity around 10% of the maximum response of the positive control E2 could be measured. Therefore, high deviations between calculated and measured EEQs became apparent. Possible reasons are the above-mentioned analytical measurement uncertainties in quantifying EE2 using LC-ESI-MS/MS caused by signal suppression and peak interferences, which may lead to a significant overestimation of EE2 concentrations. Additionally, the presence of anti-estrogenic compounds eluting in the same fraction could contribute to the observed lower activities.

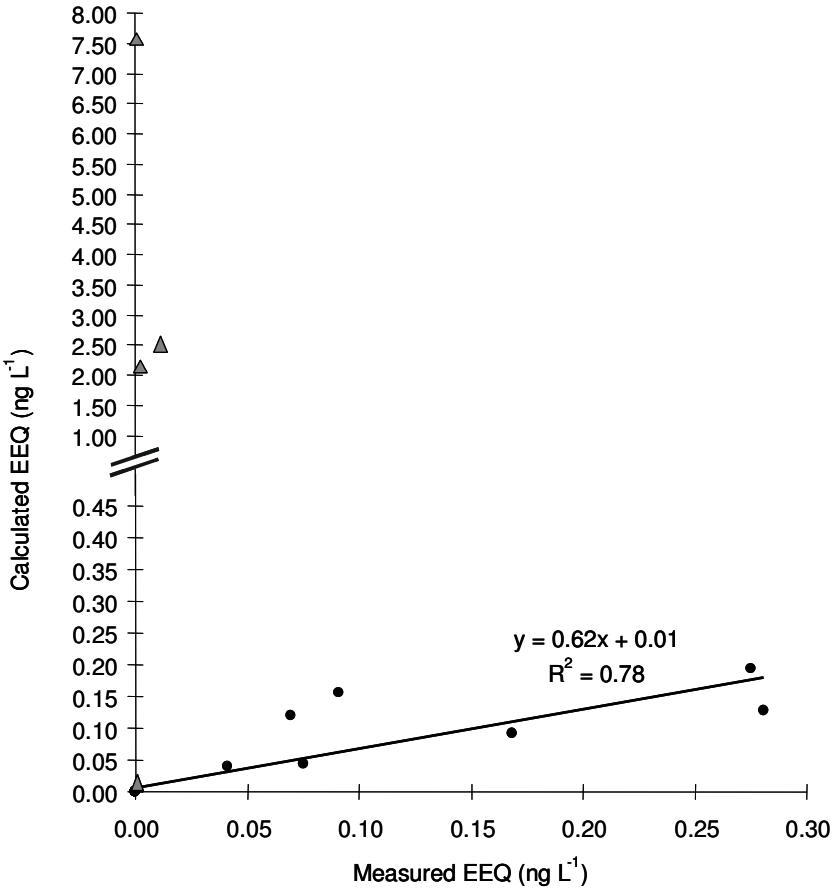


Fig. 4. Measured estradiol equivalents in relation to calculated estradiol equivalents for each individual estrogenic fraction. The linear regression function with the correlation coefficient (R^2) does not include results for the 2nd fractions. Data from 2nd fractions are shown in triangles.

4. Conclusions

A reversed-phase fractionation method was developed and successfully applied to estrogenic field samples from coastal surface waters of the German Baltic Sea. It provided knew results for identifying the estrogenic compounds mainly responsible for the observed estrogenicity. In comparison to the measurements of total extracts the fractionation lead to fractions of higher purity showing lower signal suppressions during LC-ESI-MS/MS analysis. Hence, the detection of the female steroid E2 in active fractions became possible, which could not be identified previously. After considering the results for fractions, not the synthetic hormone EE2, but the natural hormones E2 and E1 seem to be mainly responsible for the measured estrogenic activities. Not only the chemical analysis, but the bioassay (YES) as well benefits

from the purifying effect of the fractionation method. In contrast to significant acute toxicity observed prior for total extracts classical dose-response curves were obtained for the estrogenic fractions suggesting that the fractionation cut off toxic sample constituents. The benefits of fractionation for the chemical analyses as well as for the YES result in a much better accordance of measured and calculated EEQs.

Acknowledgements

We would like to thank Armando Caba for his assistance during the sampling campaigns and the staff of the research vessel “MS Ludwig Prandtl” for the realisation of sampling. The yeast strain was kindly provided by J.P. Sumpter (Brunel University, UK).

References

Aerni H-R, Kobler B, Rutishauser BV, Wettstein FE, Fischer R, Giger W, Hungerbühler A, Marazuela MD, Peter A, Schönenberger R, Vögeli AC, Suter MJ-F, Eggen RIL. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plants. Anal Bioanal Chem 2004; 378: 688-696.

Allen Y, Matthiessen P, Scott AP, Haworth S, Feist S, Thain JE. The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments - further surveys of flounder. Sci Total Environ 1999; 233: 5-20.

Atkinson S, Atkinson MJ, Tarrant AM. Estrogens from sewage in coastal marine environments. Environ Health Perspect 2003; 111: 531-535.

Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Saperi R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. Environ Sci Technol 2000; 34: 5059-5066.

Beck I-C, Bruhn R, Gandrass J, Ruck W. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. J Chromatogr A 2005a; 1090: 98-106.

Beck I-C, Bruhn R, Gandrass J. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. Chemosphere 2005b; in press.

Belfroid AC, Van der Horst A, Vethaak AD, Schäfer AJ, Ris GBJ, Wegener J, Cofino, WP. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands. Sci Total Environ 1999; 225: 101-108.

Cargouët M, Perdiz D, Mouatassim-Souali A, Tamisier-Karolak S, Levi Y. Assessment of river contaminants by estrogenic compounds in Paris area (France). Sci Total Environ 2004; 324: 55-66.

Colborn T. Neurodevelopment and endocrine disruption. Environ Health Perspect 2004; 112: 944-949.

Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* screening. Environ Sci Technol 1998; 32: 1549-1558.

Fossi MC, Casini S, Marsili L, Ancora S, Mori G, Neri G, Romeo T, Ausili A. Evaluation of ecotoxicological effects of endocrine disrupters during a four-year survey of the Mediterranean population of swordfish (*Xiphias gladius*). Mar Environ Res 2004; 58: 425-429.

Gercken J, Sordyl H. Intersex in feral marine and freshwater fish from northeastern Germany. Mar Environ Res 2002; 54: 651-655.

Houtman C, Van Oostveen AM, Brouwer A, Lamoree MH, Legler J. Identification of estrogenic compounds in fish bile using bioassay-directed fractionation. Environ Sci Technol 2004; 38: 6415-6423.

Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP. Widespread sexual disruption in wild fish. Environ Sci Technol 1998; 32: 2498-2506.

Johnson AC, Aerni H-R, Gerritsen A, Gibert M, Giger W, Hylland K, Jürgens M, Nakari T, Pickering A, Suter MJ-F, Svenson A, Wettstein FE. Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. Wat Res 2005; 39: 47-58.

Kirby MF, Allen YT, Dyer RA, Feist SW, Katsiadaki I, Matthiessen P, Scott AP, Smith A, Stentiford GD, Thain JE, Thomas KV, Tolhurst L, Waldock MJ. Surveys of plasma vitellogenin and intersex in male flounder (*Platichthys flesus*) as measures of endocrine disruption by estrogenic contamination in United Kingdom estuaries: Temporal Trends, 1996 to 2001. Environ Toxicol Chem 2004; 23: 748-758.

Kuch HM, Ballschmiter K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. Environ Sci Technol 2001; 35: 3201-3206.

Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. Chem Ecol 1994; 8: 275-285.

Routledge EJ, Sumpter JP. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environ Toxicol Chem 1996; 15: 241-248.

Ying G-G, Kookana RS, Ru Y-J. Occurence and fate of hormone steroids in the environment. Environ Int 2002; 28: 545-551.

7. Synthese und Ausblick

Zahlreiche Beispiele, vor allem aus aquatischen Lebensräumen, belegen nachteilige Effekte von estrogen wirksamen Substanzen auf Organismen. Aufgrund verschiedener Wirkmechanismen und unterschiedlicher Toxikokinetik sind dabei die in der Umwelt zu beobachtenden Effekte allerdings sehr komplex und ihre Beurteilung daher schwierig. Gegenstand von Untersuchungen sind in der Regel Flussläufe, die als anthropogen besonders belastet eingestuft werden. Im Vergleich dazu ist das Wissen zur biologischen Gesundheit der Meere und zum Vorkommen von umweltgefährdenden Substanzen in ihnen gering. Untersuchungen zur Reproduktionsgesundheit von Individuen der Fischspezies Aalmutter (*Zoarces viviparus*) in der Ostsee zeigten, dass auch hier Symptome von Reproduktionsstörungen auftreten (Gercken und Sordyl, 2002). In diesem Zusammenhang wurden Estrogene als verursachende Substanzen diskutiert.

Inhalt der vorliegenden Arbeit waren daher Untersuchungen zum Vorkommen von Estrogenen und die Bestimmung von estrogenem Wirkpotenzial in küstennahem Oberflächenwasser der Deutschen Ostsee.

Für den ersten Teil der Arbeit, die **Identifizierung und Quantifizierung von Estrogenen (Kapitel 4)**, wurde eine Extraktionsmethode für ausgewählte, umweltrelevante Estrogene entwickelt, mit der entgegen herkömmlichen Verfahren große Volumina (durchschnittlich 49 L) angereichert werden können. Die Methode beinhaltet neben der Probenanreicherung an dem Festphasenmaterial Oasis HLB auch eine Aufreinigung des Extrakts an Kieselgel. Die für die chemische Analytik ausgewählten Estrogene repräsentieren mit Estron (E1), 17β-Estradiol (E2) und Estriol (E3) die bedeutsamsten natürlichen Hormone. Mit 17α-Ethinylestradiol (EE2) als wichtigstes synthetisches Hormon, den phenolischen Xenoestrogenen Nonylphenol (NP), 4-*tert*-Octylphenol (4-*tert*-OP) und Bisphenol A (BPA) und zwei Vertretern aus der Gruppe der Phytoestrogene, Daidzein und Genistein, wurde die Gruppe der zu untersuchenden Substanzen komplettiert und damit die vermutlich wichtigsten umweltrelevanten Substanzen berücksichtigt. Im Rahmen der im Juli 2003 und Juli 2004 durchgeführten Probennahmekampagnen wurde das entwickelte Anreicherungsverfahren auf küstennahes Oberflächenwasser der Ostsee angewendet. Von den im östlichen Teil der Deutschen Ostsee gelegenen fünf Probennahmeorten (Kapitel 4, Abb. 1) sind die drei Standorte Innere Wismarer

Bucht, Eggers Wiek und Salzhaff im inneren Küstenbereich gelegen, wo Gercken und Sordyl (2002) Symptome von Intersex und histologische Veränderungen in Aalmuttern feststellen konnten. Die Probennahmestellen vor der Halbinsel Darß und in der Äußeren Wismarer Bucht wurden als wenig beeinflusste Referenzstationen angenommen. Um den für dieses Untersuchungsgebiet erforderlichen niedrigen Nachweisgrenzen gerecht zu werden, wurde neben einer großvolumigen Festphasenanreicherung leistungsstarke Analysetechnik, Hochleistungs-Flüssigchromatographie gekoppelt mit Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie, eingesetzt.

Die biologischen Untersuchungen zur Erfassung der Estrogenität der Oberflächenwasserextrakte erforderten eine möglichst universelle Probenaufarbeitung, was einer selektiveren Extraktion und Aufreinigung der Extrakte entgegenstand. Koeluierende Probenbestandteile führten während der analytischen Detektion mittels HPLC-ESI-MS/MS zu einem signifikanten Matrixeffekt, der im vorliegenden Fall zur Signalunterdrückung führte (Kapitel 3.4.4, Kapitel 4). Aus diesem Grund wurde für jede einzelne Probe die auftretende Signalunterdrückung quantifiziert und die Konzentrationen diesbezüglich korrigiert. Zur Erfassung der Signalsuppression wurden die Proben vor der Messung zweigeteilt und jeweils einem Probenaliquot vor der Messung eine definierte Konzentration einer Standardlösung zugegeben. Die Extraktionseffizienz wurde an den einzelnen Probennahmestationen mit Hilfe eines parallel durchgeführten Wiederfindungsexperiments überprüft. Eine Korrektur der Konzentrationen um die Wiederfindung der Extraktion erfolgte nicht, da diese nicht für jede Probe bestimmt werden konnte.

Die Ergebnisse der an den fünf Probennahmestandorten durchgeführten Wiederfindungsexperimente (Probennahmekampagne Juli 2004) lagen für die Wiederfindung des Gesamtverfahrens zwischen 10% (Genistein) und 81% (Nonylphenol). Die während der LC-ESI-MS/MS-Messungen auftretenden Matrixinterferenzen führten zu signifikanten Signalsuppressionen im Bereich zwischen 31% (NP) und 85% (E3). Die Wiederfindung der Extraktion („extraction recovery“) wurde aus der Wiederfindung des Gesamtverfahrens („overall method recovery“) und der Signalsuppression („signal suppression“) errechnet. Die Wiederfindung der Extraktion zeigte sich mit Werten zwischen 52% (4-*tert*-OP) bis 91% (NP) zufriedenstellend.

Die nachweisstarke optimierte Messtechnik in Kombination mit der entwickelten Extraktionsmethode macht die Identifizierung von Estrogenen im Oberflächenwasser der Ostsee in einem Konzentrationsbereich von pg bis ng L^{-1} möglich.

Die nachfolgende Tabelle 2 zeigt die für die Analyte erzielten instrumentellen Nachweisgrenzen in pg absolut. Die Bestimmung der Nachweisgrenzen aus dem Signal-Rausch-Verhältnis (S/N = 3) wurde anhand der mit 0,0025 ng μL^{-1} niedrigsten Standardlösung vorgenommen. Die Ermittlung der Nachweisgrenzen nach der Kalibriergeradenmethode basiert auf der viermaligen Messung von zehn Kalibrierstandards in einem Bereich von 0 bis 0,036 ng μL^{-1}.

Tabelle 2: Instrumentelle Nachweisgrenzen der Analyte.

Instrumentelle Nachweisgrenzen (pg abs.) der Analyte im Vergleich

	E1	E2	E3	EE2	Daidzein	Genistein	BPA	NP	4-*tert*-OP
S/N-Verhältnis	0,5	10	9	9	4	3	10	11	10
Kalibriergeraden-methode	17	19	9	18	2	2	7	13	13

Die absoluten instrumentellen Nachweisgrenzen liegen für die Analyte im Bereich weniger Picogramm und verdeutlichen damit die hohe Nachweisstärke der LC-MS/MS-Messungen. Wie ein Vergleich der Daten bestätigt, führt die Bestimmung der Nachweisgrenzen nach dem Signal-Rausch-Verhältnis und nach der Kalibriergeradenmethode zu ähnlichen Ergebnissen. Voraussetzungen hierfür sind, dass für die Ermittlung der Nachweisgrenzen nach dem S/N-Verhältnis Kalibrierstandards verwendet werden, die aufgrund ihrer geringen Signalintensität bei der Extrapolation auf ein S/N von 3 nicht zu große Umrechnungsfaktoren nach sich ziehen, und dass für die Anwendung der Kalibriergeradenmethode Standards aus dem unteren Kalibrierbereich ausgewählt werden.

Für die Beurteilung eines Verfahrens ist jedoch nicht die instrumentelle Nachweisstärke entscheidend, sondern die des Gesamtverfahrens. Neben der Leistungsfähigkeit des Messgerätes ist diese dabei stark von der Probenaufarbeitung (Anreicherung, Aufreinigung) abhängig. Die erzielten Nachweisgrenzen über das Gesamtverfahren werden im Folgenden diskutiert.

In Tabelle 3 sind die von verschiedenen Arbeitsgruppen erzielten methodischen Nachweisgrenzen für ausgewählte Estrogene dargestellt.

Tabelle 3: Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen von analytischen Methoden zur Bestimmung von Estrogenen in wässrigen Matrices.

	Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen chemischer Analysemethoden (ng L^{-1})*							
Analyte	Beck et al. (2005a)	Belfroid et al. (1999)	Ternes et al. (1999c)	Baronti et al. (2000)	Lagana et al. (2000)	Heemken et al. (2001)	Isobe et al. (2003)	Aerni et al. (2004)
	LOD[a]	LOD[b]	LOQ[c]	LOQ[b]	LOQ[b]	LOQ[d]	LOD[e]	LOQ[b]
E1	0,02	0,3-1		0,08	1,0		0,1	0,7-1,0
E2	0,30	0,5-2,4		0,2	0,5		0,3	0,5-0,9
E3	1,0			0,2	1,0		1,5	1,0-1,5
EE2	0,45	0,3-1,8		0,3	0,5		0,2	0,7-1,0
Daidzein	0,43		20					
Genistein	0,61		20					
BPA	0,04					0,05		
NP	0,12					0,5		90
4-*tert*-OP	0,14					0,05		

* Nachweisgrenzen („limit of detection“, LOD); Bestimmungsgrenzen („limit of quantification“, LOQ)
[a] Oberflächenwasser der Ostsee
[b] in geklärtem Abwasser
[c] Grundwasser
[d] instrumentell, bezogen auf Anreicherungsfaktor 10000
[e] Seewasser

Bei einer vergleichenden Betrachtung der hier zitierten analytischen Methoden ist zu berücksichtigen, dass einige der Analyseverfahren mit Hilfe der GC-MS nach vorheriger Derivatisierung durchgeführt wurden. Ferner beschränken sich die Methoden in der Regel auf weniger Analyte, was mit der Möglichkeit zur selektiveren Anreicherung und Bestimmung verbunden ist. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Nachweismethode zeigt demgegenüber eine vergleichbare Empfindlichkeit und kann aufgrund der großvolumigen Anreicherung nicht nur Extraktvolumen für die „target“-Analytik, sondern auch für die *in vitro*-Untersuchungen und anschließenden Fraktionierungsexperimente zur Verfügung stellen.

Im Rahmen der Messkampagnen 2003 und 2004 wurden mit Hilfe der entwickelten Anreicherungs- und Detektionsmethode im Oberflächenwasser der Ostsee das natürliche Hormon Estron (0,08-0,54 ng L^{-1}), das synthetische Hormon 17α-Ethinylestradiol (<MDL-17,9 ng L^{-1}) und die phenolischen Xenoestrogene Nonylphenol (1,3-21,3 ng L^{-1}), 4-*tert*-Octylphenol (0,04-1,1 ng L^{-1}) und Bisphenol A (<MDL-5,7 ng L^{-1}) erstmals nachgewiesen und quantifiziert.

Wie zu erwarten, waren die gemessenen Konzentrationen im inneren, von Einleitungen aus der Wismarer Kläranlage unmittelbar beeinflussten, Küstenbereich (Innere Wismarer Bucht, Eggers Wiek) im Vergleich zu den als Referenzstandorten angenommenen Stationen erhöht. Doch konnten die genannten Estrogene auch in der Äußeren Wismarer Bucht und vor der Halbinsel Darß quantifiziert werden, was auf einen parallel zur Küste verlaufenden Kontaminantentransport hindeutet. Eine vom StAUN Rostock (2004) aufgrund von Sedimenttransport-Daten bestätigte West-Ost-Strömung in diesem Küstenbereich unterstützt diese These.

Eine vergleichende Betrachtung von Analytkonzentrationen in verschiedenen wässrigen Matrices ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Konzentrationen von Estrogenen in Kläranlagenausläufen, Flusswasser und Oberflächenwasser der Ostsee im Vergleich.

	Konzentration (ng L^{-1})							Lit.*
	E1	E2	E3	EE2	NP	OP	BPA	
Kläranlagen-auslauf	<1,0-70	<1,0-3	-	<1,0-15	-	-	-	1
	<0,1-18	<0,15-5,2	-	<0,10-8,9	<0,05-770	<0,05-73	0,04-47	2
Flusswasser	<0,1-4,1	<0,15-3,6	-	<0,10-5,1	6,7-134	0,8-54	0,5-14	2
Küstenzone der Ostsee	0,08-0,54	<0,3	<1,0	<0,45-17,9[#]	1,3-21,3	0,04-1,1	<0,04-5,7	3

[*] Lit., Literaturnachweise: [1] Ternes et al. (1999a), [2] Kuch und Ballschmiter (2001), [3] Beck et al. (2005a)
[#] Aufgrund der Peakinterferenzen bei EE2 ist die Konzentrationsangabe als semi-quantitativ zu betrachten.

Die zu erwartenden geringeren Konzentrationen in der Abfolge Kläranlagenauslauf > Flusswasser > Meereswasser lassen sich hier insbesondere für E1 und die Xenoestrogene NP, 4-*tert*-OP und BPA bestätigen. Für E2 und EE2 ergibt sich ein nicht so eindeutiges Bild. Die im Kläranlagenauslauf und Flusswasser gemessenen E2-Konzentrationen der beiden beispielhaft ausgewählten deutschen Studien

unterscheiden sich nicht signifikant. In der Ostsee konnte E2 im Rahmen dieser Untersuchungen mit einer Nachweisgrenze von 0,3 ng L^{-1} nicht nachgewiesen werden. Auch die für EE2 angebenen Konzentrationen im Kläranlagenauslauf und Flusswasser unterscheiden sich kaum. Die Konzentrationen in der Ostsee sind mit einem Maximalwert von 17,9 ng L^{-1} wider Erwarten hoch und liegen im Bereich von Auslauf- und Flusswasserkonzentrationen. Im Vergleich zu Kläranlagenauslauf- und Flusswasserkonzentrationen sind die Messwerte der meisten Estrogene für das hier untersuchte Oberflächenwasser der Ostsee wie zu erwarten niedriger. Im Fall der natürlichen und synthetischen Hormone liegen sie aufgrund ihrer niedrigen Effektkonzentrationen von wenigen ng bzw. sub-ng pro Liter (Young et al., 2002) allerdings durchaus im umweltrelevanten Konzentrationsbereich.

Insbesondere die in der Ostsee für Estron und 17α-Ethinylestradiol gemessenen Konzentrationsbereiche sind von umweltrelevanter Bedeutung.

In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass die Konzentrationsangaben für EE2 als semi-quantitativ zu betrachten sind, denn neben der höheren Persistenz dieses synthetischen Estrogens tragen möglicherweise die bereits angesprochenen Messunsicherheiten zu den vergleichsweise hohen gemessenen Konzentrationen bei. Verursacht durch koeluierende Begleitstoffe sind bei EE2 Peakinterferenzen aufgetreten, die eine exakte Auswertung des Messsignals erschwerten. Die durch Signalinterferenzen hervorgerufene besondere Quantifizierungsproblematik im Fall von EE2 wird auch von anderen Autoren erwähnt (Ternes et al., 1999a; Huang und Sedlak, 2001; Anderson et al., 2004; Heisterkamp et al., 2004).

Im küstennahen Oberflächenwasser der Ostsee wurden an ausgewählten Standorten erstmals Estrogene nachgewiesen und Steroidhormone dabei in einem umweltrelevanten Konzentrationsbereich quantifiziert. Insbesondere in dem als ökologisch besonders sensibel geltenden Ökosystem Ostsee liefert das Grund zur Besorgnis.

Die sich an die chemische Analytik der Gesamtextrakte anschließenden biologischen Untersuchungen gaben Aufschluss über die umweltrelevante Gesamtestrogenität der Extrakte. Die **Untersuchungen zum estrogenen Wirkpotenzial von küstennahem Oberflächenwasser der Deutschen Ostsee (Kapitel 5)** wurden mit Hilfe des

estrogensensitiven Hefezelltestes („yeast estrogen screen“, YES) (Kapitel 3.2.2) durchgeführt.

Zunächst wurden für die einzelnen Analyte Dosis-Wirkungskurven erstellt und EC_{50}-Werte (Effektkonzentration; Konzentration, die die halbmaximale Wirkung erzeugt) kalkuliert. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von anderen Studien mit wenigen Ausnahmen nicht signifikant (Tabelle 5). Die Gründe für leicht differierende EC_{50}-Werte können sich zum einen aus abweichenden Arbeitsvorschriften und zum anderen aus der Variabilität des biologischen Testsystems ergeben.

Tabelle 5: Mit Hilfe des Hefetests ermittelte EC_{50}-Werte - ein Literaturvergleich.

Vergleich von EC_{50}-Werten (mol L^{-1}) ausgewählter Analyte im Hefetest

Analyte	Beck et al. (2005b)	Gaido et al. (1997)	Céspedes et al. (2004)*	Heisterkamp et al. (2004)	Rutishauser et al. (2004)
E2	$1{,}8\times10^{-10}$	$2{,}25\times10^{-10}$	$1{,}5\times10^{-10}$	$3{,}5\times10^{-10}$	$2{,}1\times10^{-10}$
EE2	$2{,}4\times10^{-10}$		$7{,}9\times10^{-10}$	$4{,}5\times10^{-10}$	$1{,}8\times10^{-10}$
E1	$9{,}0\times10^{-10}$		$7{,}8\times10^{-9}$	$1{,}4\times10^{-9}$	
E3	$2{,}2\times10^{-8}$	$6{,}16\times10^{-8}$	$4{,}0\times10^{-10}$	$5{,}6\times10^{-8}$	
Genistein	$1{,}0\times10^{-6}$				
BPA	$1{,}5\times10^{-6}$	$3{,}4\times10^{-6}$	$7{,}2\times10^{-6}$	$3{,}2\times10^{-6}$	$2{,}0\times10^{-6}$
NP	$7{,}0\times10^{-6}$	$1{,}1\times10^{-6}$	$3{,}6\times10^{-7}$	$6{,}0\times10^{-6}$	$8{,}4\times10^{-6}$
4-*tert*-OP	$3{,}1\times10^{-5}$		$9{,}1\times10^{-7}$		$2{,}7\times10^{-5}$
Daidzein	$6{,}0\times10^{-5}$				

* EC_{50}-Werte wurden für diese Darstellung von µg L^{-1}-Angaben in mol L^{-1} umgerechnet.

Wie die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, ist die im Hefezelltest gemessene relative Wirkstärke von EE2 der von E2, welches im Hefezelltest als Positivkontrolle verwendet wird, sehr ähnlich. Im Vergleich zeigt der E2-Hauptmetabolit E1 eine bis zu 25% schwächere estrogene Aktivität. Die Estrogenität von E3, den Phytoestrogenen und phenolischen Xenoestrogenen ist demgegenüber um mehrere Größenordnungen geringer. Die hohe relative Wirkstärke der natürlichen und synthetischen Hormone ist der Grund dafür, warum ihrem Nachweis in der Umwelt eine so hohe Bedeutung zukommt.

Bei der Untersuchung von Realproben zeigte sich, dass mit im Testsystem eingesetzter steigender Extraktkonzentration die messbare Estrogenität abnahm. Mit

Hilfe von Messungen der Zelldichte wurde nachgewiesen, dass der Einsatz steigender Extraktkonzentrationen eine zunehmende Hemmung des Hefezellenwachstums zur Folge hatte, die schließlich für eine absinkende Estrogenität verantwortlich zu sein scheint. Als Grund dafür kommen toxische Begleitstoffe in Betracht. Das Auftreten von akuter Toxizität im Zusammenhang mit der Anwendung des YES auf Realproben wurde auch in Studien von Céspedes et al. (2004), Petty et al. (2004) und Rutishauser et al. (2004) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden die estrogenen Wirkpotenziale auf Basis der estrogenen Aktivität von Verdünnungsstufen ermittelt, die unbeeinflusst von messbarer Toxizität waren. Die bei abnehmender Verdünnung der Extrakte aufgetretene Zelltoxizität hatte damit keinerlei Einfluss auf die Interpretation der hier dargestellten Ergebnisse zur Estrogenität der Extrakte.

Die Untersuchungen der während der Kampagnen 2003 und 2004 genommenen Realproben ergaben, dass 27 von den insgesamt 29 Proben im Biotest ein estrogenes Potenzial von über 10% zeigten und damit als signifikant estrogen eingestuft wurden. Die estrogene Aktivität wurde als gemessene Estradiol-Äquivalente („measured estradiol equivalents“, EEQs) ausgedrückt und deckte einen Konzentrationsbereich von <LOD (Äußere Wismarer Bucht) bis zu 0,82 ng EEQs L^{-1} (Innere Wismarer Bucht) ab.

Die Untersuchungen mit Hilfe des *in vitro*-Biotests bestätigten, dass die als Referenzstationen ausgewählten Standorte Halbinsel Darß und Äußere Wismarer Bucht vermutlich von einem Kontaminantentransport, verursacht durch West-Ost-Strömungen, beeinflusst sind. Dort entnommene Proben zeigten zwar im Vergleich zur Inneren Wismarer Bucht oder Eggers Wiek geringere EEQs, doch konnten vor der Halbinsel Darß noch bis zu 0,28 ng L^{-1} EEQs bestimmt werden. Die gemessenen EEQs bewegen sich damit im Bereich von Flusswasserkonzentrationen, wie sie zum Beispiel Aerni et al. (2004) und Céspedes et al. (2005) mit Werten meist zwischen <LOQ und 1 ng L^{-1} quantifiziert haben.

Um die Ergebnisse aus der chemischen Analytik mit denen der biologischen Untersuchungen vergleichen zu können, wurden die mittels LC-ESI-MS/MS gemessenen Analytkonzentrationen mit den entsprechenden relativen estrogenen Wirkstärken im Hefezelltest kombiniert und die so genannten kalkulierten Estradiol-Äquivalente ermittelt.

Auf Basis einer vergleichenden Betrachtung der Ergebnisse aus der chemischen Analytik mit denen des biologischen Testsystems konnte vermutet werden, dass die Steroidhormone 17α-Ethinylestradiol und Estron mit ihren hohen estrogenen Wirkpotenzialen und ihrem Vorkommen im ng L^{-1}-Bereich hauptverantwortlich für die Gesamtestrogenität der Extrakte sind.

Die exemplarische Gegenüberstellung von gemessenen und kalkulierten Estradiol-Äquivalenten zeigte für Proben von 2003 Abweichungen im Bereich von einer Größenordnung. Diese Abweichungen können verschiedene Ursachen haben. Die Variablilität von biologischen Testsystemen und die Messunsicherheiten in der Spurenanalytik sind dabei zwei wichtige Einflussfaktoren (Rutishauser et al., 2004). Auf der anderen Seite können höhere Werte im Biotest darauf hindeuten, dass estrogen wirksame Substanzen in den Proben enthalten sind, die mit der chemischen „target"-Analytik nicht erfasst wurden. Anti-Estrogene wiederum können für im Biotest geringere gemessene Estradiol-Äquivalente verantwortlich sein.

Die mit Hilfe des *in vitro*-Biotests durchgeführten Untersuchungen konnten zeigen, dass sich der ausgewählte Hefezelltest als ein geeignetes Testsystem zur Erfassung der Gesamt-Estrogenität in komplexen Proben einer marinen Umwelt erwiesen hat. Die Ergebnisse geben erste Hinweise auf estrogenes Wirkpotenzial im untersuchten Küstenbereich der Deutschen Ostsee.

Das Ziel einer **Biotest-geleiteten Fraktionierung der Gesamtextrakte (Kapitel 6)** unter Anwendung des Hefezelltestes und der chemischen Analyse war die eindeutige Zuordnung von Estrogenen und beobachteter Estrogenität.

Ausgewählte estrogene Gesamtextrakte der Probennahmekampagne im Juli 2003 (Stationen: Innere Wismarer Bucht, Halbinsel Darß) wurden jeweils in sieben Fraktionen aufgetrennt, von denen in je drei Fraktionen signifikante estrogene Aktivitäten gemessen wurden. Entgegen früheren Untersuchungen wurden hier klare Dosis-Wirkungsbeziehungen erzielt, was auf eine Abtrennung toxischer Begleitstoffe durch die Fraktionierung hinweist.

Obwohl mit Hilfe der LC-ESI-MS/MS-Messungen in den zweiten Fraktionen BPA und EE2 mit jeweils bis maximal 6 ng L^{-1} nachgewiesen wurden, zeigte sich im Hefezelltest eine nur schwache Estrogenität (im Vergleich zur max. Wirkung der Positivkontrolle E2). In den dritten Fraktionen, mit über 80% estrogener Aktivität,

wurden erstmalig die natürlichen Hormone E2 und E3 bestimmt. Die vierten Fraktionen zeigten aus der Gruppe der „target"-Analyte ausschließlich E1 und dies in Konzentrationen, die gut mit der über 80%igen Estrogenität dieser Fraktionen korrelierten.

Der mit der Fraktionierung einhergehende Aufreinigungseffekt führte zu einem verringerten Rauschen und damit zu niedrigeren Nachweisgrenzen. Erst dadurch wurde die Identifizierung von 17β-Estradiol und Estriol möglich. Insbesondere der Nachweis von 17β-Estradiol mit seiner hohen estrogenen Potenz eröffnete einen neuen Erklärungsansatz. Die Ergebnisse der Biotest-geleiteten chemischen Analyse weisen darauf hin, dass, neben dem synthetischen Hormon 17α-Ethinylestradiol, insbesondere die natürlichen Hormone 17β-Estradiol und Estron für die Estrogenität des Oberflächenwassers der Deutschen Ostsee hauptverantwortlich sind.

Mit Ausnahme der Datenpaare für die zweiten Fraktionen wurde eine Regressionsanalyse mit den für alle Einzelfraktionen gemessenen und kalkulierten Estradiol-Äquivalenten durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten mit $R^2 = 0{,}78$ eine gute Korrelation. Das in den Proben gemessene estrogene Wirkpotenzial konnte mit den ermittelten Konzentrationen der „target"-Analyte also weitgehend erklärt werden.

Die Quantifizierung von EE2 mit Konzentrationen bis zu 6 ng L^{-1} in den zweiten Fraktionen, und der demgegenüber nur schwachen Estrogenität im Biotest kann auf der einen Seite die für EE2 diskutierte Messunsicherheit bekräftigen, oder auch ein Hinweis auf vorhandene, signifikante Anti-Estrogenität sein. Wahrscheinlich ist, dass es sich hier um eine Kombination aus beiden Einflussgrößen handelt.

Die Extraktfraktionierung mit dem anschließenden Einsatz chemischer Analytik (LC-MS/MS), kombiniert mit einem *in vitro*-Biotest, ermöglichte weitgehend die Zuordnung von gemessener Estrogenität zu quantifizierten Analytkonzentrationen und bestätigt die Umweltrelevanz von Estrogenen, insbesondere von Steroidhormonen, im Küstenbereich der Deutschen Ostsee.

Ausblick

Obgleich die Umweltproblematik von Estrogenen schon seit Jahrzehnten bekannt ist, war das Thema „Estrogene in Küstengewässern“ nur selten Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen.

Die Ergebnisse, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielt wurden, zeigen, dass sich das umweltrelevante Vorkommen von Estrogenen nicht nur auf Kläranlagenausläufe und angrenzende Flüsse, sondern auch auf küstennahes Oberflächenwasser der Ostsee erstreckt. Das entwickelte Analyseverfahren lieferte für ausgewählte Estrogene, mit Ausnahme von EE2, belastbare quantitative Konzentrationsdaten. Die bei EE2 aufgetretenen Peakinterferenzen stellen eine besondere Problematik dar, die es im Hinblick auf eine Optimierung des Verfahrens zu lösen gilt. In einem ersten Schritt ist die Identität der mit EE2 interferierenden Substanz zu klären. An dieser Stelle ist anzumerken, dass auch die Fraktionierung der Extrakte nicht zu einer chromatographischen Trennung beider Substanzen führte und drei der vier für EE2 ausgewählten Massenübergänge ebenfalls bei der koeluierenden Substanz auftraten. Vor diesem Hintergrund könnte vermutet werden, dass sich hier um ein Stereoisomer von EE2 handelt. Das Umweltvorkommen von EE2-Stereoisomeren wird allerdings in der Literatur bisher nicht beschrieben, und die Vermutung kann damit nicht durch Angaben aus der Literatur gestützt werden. Für eine Abtrennung der interferierenden Substanz müssten andere Trennprinzipien, wie beispielsweise chirale Phasen, getestet werden.

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der „target“-Analytik liegt in einer selektiveren Anreicherung und der damit einhergehenden Reduktion unerwünschter Begleitsstoffe. Eine Verminderung der Signalunterdrückung während der Messung wäre verbunden mit niedrigeren Nachweisgrenzen, einer verbesserten Wiederfindung über das Gesamtverfahren und würde damit einer erhöhten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gerecht werden können. Die Erhöhung der Selektivität würde allerdings dem Ansatz einer Biotest-geleiteten chemischen Analyse entgegenstehen. Ein weiterer Ansatzpunkt zur Verbesserung des entwickelten Anreicherungsverfahrens ist die Vereinfachung der zeitintensiven Probennahme. Dabei gilt es zu überprüfen, inwieweit sich höhere Säulendurchflussraten negativ auf die Extraktionseffizienz auswirken könnten. Bei der ange-

wendeten großvolumigen Anreicherung würden höhere Durchflussraten den Zeitbedarf pro Probennahme stark verkürzen.

Mit Hilfe des Ansatzes der Biotest-geleiteten chemischen Analyse wurden mit E2, E1 und EE2 natürliche und synthetische Hormone als für die Estrogenität der Ostseewasserproben hauptverantwortliche Analyte identifiziert. Auf der Basis einer umfangreicheren, gesicherten Datenlage wäre es sinnvoll, Expositionsstudien mit Aalmuttern (*Zoarces viviparus*) durchzuführen, um eine Aussage treffen zu können, ob die vorkommenden Konzentrationen an Estrogenen für die in der Ostsee auftretenden Reproduktionsstörungen tatsächlich verantwortlich sein können. Wenn im Rahmen solcher Studien ein eindeutiger Kausalitätszusammenhang zwischen Exposition und Wirkung hergestellt werden kann, wäre Handlungsbedarf geboten. Da die als hauptverantwortliche Estrogene identifizierten Steroidhormone in erster Linie über Kläranlagenausläufe in die aquatische Umwelt gelangen, sei auf die zur Verfügung stehenden Verfahren zur weitergehenden Abtrennung von an Feststoffen adsorbierten Spurenstoffen und zur Eliminierung von gelösten Estrogenen in Kläranlagen hingewiesen. Der ergänzende Einsatz von Membrantrennstufen beziehungsweise nachgeschaltete Verfahren wie Ozonierung, Aktivkohlefiltration oder UV-Bestrahlung sind hier zu erwähnen (Schröder, 2003; Johnson et al., 2005). Der Einsatz solcher Technologien wäre angesichts eines Kausalitäts-zusammenhangs dann, trotz der damit verbundenen zusätzlichen Kosten, für die untersuchte Region begründet. In diesem Zusammenhang sollte auch diskutiert werden, ob es nicht aus Gründen des vorsorglichen Handelns generell zu empfehlen ist, die an ökologisch sensiblen oder gefährdeten Standorten gelegenen Kläranlagen mit den genannten Verfahren nachzurüsten.

Ferner haben Untersuchungen gezeigt, dass viele der bisher in der Umwelt beobachteten estrogenen Effekte nicht mit analytisch-chemischen „target“-Analysen erklärt werden konnten. Vor diesem Hintergrund ist es sinnvoll, im Rahmen der umweltbezogenen Estrogen-Analytik den Ansatz einer Biotest-geleiteten chemischen Analyse zu verfolgen und sich nicht auf hauptverdächtige Substanzen zu beschränken. Immer wieder wird die estrogene Wirksamkeit bei Substanzen entdeckt, die man vorher nicht als solche erkannt hatte. In jüngster Zeit wurden beispielsweise auch verschiedene UV-Filter als estrogen eingestuft (Schlumpf et al., 2004). Angesichts dieser Erkenntnisse gilt es, die Neuzulassung von Chemikalien und die an dieser Stelle zu erwähnende EU-Chemikalienpolitik mit der geplanten

REACH-Gesetzgebung (Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals) als Chance zu begreifen, mit einer geeigneten einheitlichen Teststrategie auch Endokrine Disruptoren zu identifizieren und ihr Gefährdungspotenzial abzuschätzen. Die große Anzahl zu überprüfender Substanzen und die Vielzahl möglicher Mechanismen, die bei der Störung hormoneller Regelkreise in Betracht kommen, machen diese Aufgabe zu einer großen Herausforderung.

8. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein spurenanalytisches Verfahren zur simultanen Identifizierung und Quantifizierung von Estrogenen in Küstengewässern entwickelt. Für die chemische „target"-Analyse wurden die natürlichen Steroide Estron, 17β-Estradiol, Estriol, das synthetische Hormon 17α-Ethinylestradiol, die Phytoestrogene Daidzein und Genistein sowie mit Nonylphenol, 4-*tert*-Octylphenol und Bisphenol A drei weit verbreitete Xenoestrogene ausgewählt. Das Verfahren beinhaltet eine großvolumige Festphasenextraktion von durchschnittlich 49 Litern Oberflächenwasser mit Hilfe des Copolymers Oasis HLB und eine sich anschließende Extraktaufreinigung an Kieselgel. Von 400 µL Extraktvolumen wurde ein 100 µL Aliquot für die chemisch-analytische Bestimmung der ausgewählten Analyte verwendet. Mit Hilfe der großvolumigen Anreicherung in Kombination mit leistungsstarker Messtechnik, Hochleistungs-Flüssigchromatographie in Kombination mit Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie, wurden Nachweisgrenzen im Bereich zwischen 0,02 (Estron) und 1 ng L^{-1} (Estriol) erreicht. Bei der Vermessung von Realproben auftretende Signalsuppressionen wurden für jede Probe ermittelt und die Ergebnisse diesbezüglich korrigiert. Die für die entwickelte Methode kalkulierten Wiederfindungen der Extraktion lagen zwischen 52 (4-*tert*-Octylphenol) and 91% (Nonylphenol).

Im Rahmen zweier Probennahmekampagnen im Jahr 2003 und 2004 wurde das entwickelte Verfahren auf küstennahes Oberflächenwasser der Ostsee angewendet. Die ausgewählten Standorte lagen mit den Stationen Innere Wismarer Bucht, Eggers Wiek und Salzhaff im inneren, stärker anthropogen beeinflussten Küstenbereich. Die Stationen Halbinsel Darß und Äußere Wismarer Bucht wurden als weniger belastete Probennahmeorte angenommen. Im küstennahen Oberflächenwasser der Ostsee konnten an den genannten Stationen sowohl steroide Hormone natürlichen und synthetischen Ursprungs (Estron bzw. 17α-Ethinylestradiol) als auch Xenoestrogene (Nonylphenol, 4-*tert*-Octylphenol und Bisphenol A) im unteren ng pro Liter-Bereich quantifiziert werden. Dabei kommt insbesondere den natürlichen und synthetischen Hormonen eine besondere Bedeutung zu, da sie im Vergleich zu Xenoestrogenen eine um Größenordnungen höhere estrogene Wirkstärke aufweisen und mit den ermittelten Konzentrationen durchaus im Bereich von Effektkonzentrationen für aquatische Organismen liegen. Die Probennahmestandorte des inneren Küsten-

bereiches wiesen im Allgemeinen höhere Konzentrationen auf, als die äußeren Stationen.

Die chemische Analytik wurde durch die Anwendung eines estrogen-sensitiven *in vitro*-Biotests zur Erfassung von estrogenem Wirkpotenzial ergänzt. 100 µL-Extrakt-Aliquote wurden im Hefezelltest eingesetzt und die Ergebnisse als prozentuale Aktivität im Vergleich zur maximalen Wirkung der Positivkontrolle 17β-Estradiol ausgedrückt. Basierend auf dem EC_{20}-Wert (Konzentration bei 20%iger Wirkung) wurden gemessene Estradiol-Äquivalente berechnet. Das Vorkommen von Estrogenen wurde durch die im Biotest gemessenen estrogenen Wirkpotenziale mit bis zu 0,82 ng L^{-1} Estradiol-Äquivalenten bestätigt. Von insgesamt 29 Proben, die an den fünf Probennahmestationen im Rahmen zweier Messkampagnen 2003 und 2004 genommen wurden, zeigten 27 Proben ein estrogenes Wirkpotenzial von > 10% und damit eine als signifikant eingestufte Estrogenität. Auch hier zeigte sich wie erwartet, dass die im inneren Küstenbereich gelegenen Standorte eine im Vergleich zur Äußeren Wismarer Bucht und der Halbinsel Darß erhöhte Estrogenität aufwiesen.

Um die für die Estrogenität verantwortlichen Substanzen zu identifizieren, wurde der Ansatz einer Biotest-geleiteten chemischen Analyse verfolgt. Dafür wurde eine Fraktionierung auf Basis der Umkehrphasen-Chromatographie entwickelt und 100 µL-Aliquote ausgewählter Gesamtextrakte in sieben Einzelfraktionen aufgetrennt. Im Biotest zeigten jeweils die zweiten, dritten und vierten Fraktionen signifikante Wirkpotenziale. Vor dem Hintergrund der im Biotest ermittelten relativen estrogenen Wirkstärken der Einzelanalyte, wurden mit der chemischen Analyse neben dem synthetischen Estrogen 17α-Ethinylestradiol insbesondere die natürlichen Hormone 17β-Estradiol und Estron als für die Estrogenität verantwortlichen Analyte identifiziert. Die mit der Fraktionierung einhergehende Aufreinigung der Extrakte machte im Rahmen dieser Untersuchungen erstmals die Identifizierung von 17β-Estradiol möglich. Damit waren Steroidhormone die maßgebliche Ursache für das im küstennahen Oberflächen-wasser der Ostsee gemessene estrogene Wirkpotenzial. Für die Einzelfraktionen wurden abschließend aus den Konzentrationsdaten der Analyte und den jeweiligen relativen estrogenen Wirkstärken kalkulierte Estradiol-Äquivalente berechnet. Die Gegenüberstellung gemessener und kalkulierter Estradiol-Äquivalente wurde in Form einer Regressionsanalyse durchgeführt und mit Ausnahme für die zweiten Fraktionen eine gute Korrelation der Wertepaare erzielt. Die für die „target“-Analyte ermittelten

Konzentrationen erklären damit weitgehend das für die Proben ermittelte estrogene Wirkpotenzial. Die in den zweiten Fraktionen gemessenen 17α-Ethinylestradiol-Konzentrationen stehen im Missverhältnis zu der nur schwach messbaren Estrogenität dieser Fraktionen. Die bei der Messung von 17α-Ethinylestradiol in Realproben aufgetretenen Peakinterferenzen erschwerten eine exakte Auswertung des Messsignals, was vermutlich zu einer signifikanten Überschätzung der Konzentrationen führte. Dies scheint, in Kombination mit dem möglichen Vorkommen anti-estrogener Substanzen für die Differenz der Ergebnisse aus chemischer Analytik und Biotest verantwortlich zu sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass nicht nur Kläranlagenausläufe und Flüsse vom Eintrag anthropogener Estrogene betroffen sind, sondern auch die Küstenzonen mariner Ökosysteme. Das Vorkommen von Estrogenen in einem umweltrelevanten Konzentrationsbereich und das damit verbundene estrogene Wirkpotenzial im küstennahen Oberflächenwasser der Deutschen Ostsee stellen eine mögliche Erklärung für die in dieser Küstenzone bei Fischen festgestellten Reproduktionsstörungen dar. Vor diesem Hintergrund sollten auch Küstenzonen zunehmend im Fokus wissenschaftlicher Studien zum Thema Endokrine Disruptoren stehen.

8. Summary

An analytical method has been developed for the determination of different estrogenic substances in coastal waters. For the target-analyses three natural steroids (estradiol, estriol, estrone), two phytoestrogens (genistein, daidzein) and three phenolic xenoestrogens (nonylphenol, 4-*tert*-octylphenol, bisphenol A) were chosen. The procedure includes a solid-phase extraction of approx. 49 litres using the copolymer Oasis HLB followed by a clean-up on silica. 100 µL of the total extract volume of 400 µL were used for the identification of the target-analytes using high performance liquid chromatography coupled with electrospray-ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). Method detection limits ranged from 0.02 (estrone) to 1 ng L^{-1} (estriol). Signal suppression occuring during electrospray ionisation was calculated for each field sample and quantitation results were corrected. For the method developed calculated extraction recoveries between 52 (4-*tert*-octylphenol) and 91% (nonylphenol) were obtained.

During two sampling campaigns in July 2003 and 2004, the method was applied to determine environmental estrogens in coastal waters of the Baltic Sea. The analyses showed the presence of the steroids estrone and ethinylestradiol, and the xenoestrogens nonylphenol, 4-*tert*-octylphenol and bisphenol A, all in the lower ng per litre range. Due to their high relative estrogenic potency, the concentrations of estrone and ethinylestradiol are of concern. In inner coastal waters generally higher concentrations of analytes could be observed.

The yeast estrogen screen (YES) was used for the subsequent biological analyses to assess the estrogenic activity in surface waters of a coastal region in the German Baltic Sea and was applied to 100 µL sample aliquots. Results were expressed as a percentage of the maximum response of the positive control 17β-estradiol and on the basis of a 20% response measured estradiol equivalents (EEQs) were calculated. The occurrence of estrogens in coastal waters of the Baltic Sea was confirmed by the YES showing measured estrogenic activities up to 0.82 ng L^{-1} EEQs. From 29 samples taken during two campaigns (2003 and 2004) at five different stations 27 samples showed an estrogenic response higher than 10%. Samples from inner coastal waters generally showed higher responses than samples from the Outer Wismar Bay or Darss Peninsula.

To determine the substances mainly responsible for the observed estrogenicity, the approach of the bioassay-directed chemical analysis was used. A reversed-phase fractionation method was developed and applied to 100 µL aliquots of estrogenic field samples. From seven individual fractions, three showed significant estrogenicity. Taking their relative estrogenic potencies into account, the chemical analysis identified the synthetic hormone 17α-ethinylestradiol, but particularly the natural steroids 17β-estradiol and estrone as main contributors to the overall estrogenicities. The fractionation of the total extracts lead to fractions of higher purity with lower signal suppression during LC-MS/MS measurements. Hence, the detection of the female steroid 17β-estradiol became possible. Thus, only steroidal hormones seem to be responsible for the observed estrogenicity in coastal surface waters of the German Baltic Sea. Based on concentration data and relative estrogenic potencies of analytes, calculated estradiol equivalents were determined for each individual fraction. Measured and calculated estradiol equivalents correlated well, when disregarding results for the second fractions, where high deviations occurred. The concentrations of 17α-ethinylestradiol determined in the second fractions didn't match the comparatively low estrogenic activities. Possible reasons are the analytical measurement uncertainties in quantifying 17α-ethinylestradiol in field samples. Peak interferences during the HPLC-ESI-MS/MS measurements may lead to a significant overestimation of 17α-ethinylestradiol concentrations. Additionally, the presence of anti-estrogenic compounds could contribute to the observed lower activities.

Results obtained within this work indicate, that not only sewage treatment plant effluents and river waters are significantly influenced by estrogenic substances, but also coastal areas of marine ecosystems. The occurrence of estrogens in the range of effect concentrations could be one possible explanation for reproductive disorders found in the German Baltic Sea. For this reason, coastal zones should be increasingly in focus of environmental research in the field of endocrine disruptors.

Literaturverzeichnis

Adler, P., Steger-Hartmann, T., Kalbfus, W., 2001. Vorkommen natürlicher und synthetischer östrogener Steroide in Wässern des süd- und mitteldeutschen Raumes. Acta hydrochim. hydrobiol. 29, 227-241.

Aerni, H.-R., Kobler, B., Rutishauser, B.V., Wettstein, F.E., Fischer, R., Giger, W., Hungerbühler, A., Marazuela, M.D., Peter, A., Schönenberger, R., Vögeli, A.C., Suter, M.J.-F., Eggen, R.I.L., 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plants. Anal. Bioanal. Chem. 378, 688-696.

Ahel, M., Giger, W., Koch, M., 1994. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment: I. Occurrence and transformation in sewage treatment. Water Res. 28, 1131-1142.

Ahel, M., Giger, W., 1993. Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. Chemosphere 26, 1471-1478.

Allen, E., Doisy, E.A., 1923. An ovarian hormone. J. Am. Med. Assoc. 81, 819-821.

Allen, Y., Matthiessen, P., Scott, A.P., Haworth, S., Feist, S., Thain, J.E., 1999. The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments - further surveys of flounder. Sci. Total. Environ. 233, 5-20.

Allner, B., 2005. Freilanduntersuchungen zur Geschlechterverteilung einheimischer Fischpopulationen. Abschlussbericht VCI-Forschungsprojekt, Verband der chemischen Industrie, Frankfurt a. Main.

Amad, M.H., Cech, N.B., Jackson, G.S., Enke, C.G., 2000. Importance of gas-phase proton affinities in determining the electrospray ionization response for analytes and solvents. J. Mass Spectrom. 35, 784-789.

Andersen, H.R., Andersson, A.-M., Arnold, S.F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N.A., Bjerregaard, P., Christiansen, L.B., Gissel, B., Hummel, R., Jørgensen, E.B., Korsgaard, B., Le Guevel, R., Leffers, H., McLachlan, J., Møller, A., Nielsen, J.B., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K.L., Perez, P., Skakkebœk, N.E., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Sumpter, J.P., Thorpe, S.M., Grandjean, P., 1999. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. Environ. Health Perspect. 107, 89-108.

Anderson, H., Siegrist, H., Halling-Sørensen, B., Ternes, T., 2003. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. Environ. Sci. Technol. 37, 4021-4026.

Anderson, P.D., D'Aco, V.J., Shanahan, P., Chapra, S.C., Buzby, M.E., Cunningham, V.L., Duplessie, B.M., Hayes, E.P., Mastrocco, F.J., Parke, N.J., Rader, J.C., Samuelian, J.H., Schwab, B.W., 2004. Screening analysis of human pharmaceutical compounds in U.S. surface waters. Environ. Sci. Technol. 38, 838-849.

Ankley, G.T., Burkhard, L.P., 1992. Identification of surfactants as toxicants in a primary effluent. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1235-1248.

Annesley, T.M., 2003. Ion suppression in mass spectrometry. Clin. Chem. 49, 1041-1044.

Applied Biosystems, 2002. Materialien zum API 3000 Operator Training Course, 02. bis 04. Juli 2002, Langen.

Arnold, S.F., Robinson, M.K., Notides, A.C., Guilette, L.J., McLachlan, J.A., 1996. A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens. Environ. Health Perspect. 104, 544-548.

Atkinson, S., Atkinson, M.J., Tarrant, A.M., 2003. Estrogens from sewage in coastal marine environments. Environ. Health Perspect. 111, 531-535.

Barkhem, T., 2002. Molecular mechanisms of estrogen and antiestrogen action. Dissertation, Stockholm.

Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Saperi, R., 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. Environ. Sci. Technol. 34, 5059-5066.

Beck, I.-C., Bruhn, R., Gandrass, J., Ruck, W., 2005a. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. J. Chromatogr. A 1090, 98-106.

Beck, I.-C., Bruhn, R., Gandrass, J., 2005b. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. Chemosphere, *in press*.

Belfroid, A.C., Van der Horst, A., Vethaak, A.D., Schaefer, A.J., Rijs, G.B.J., Wegener, J., Cofino, W.P., 1999. Analysis and occurence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. Sci. Total Environ. 225, 101-108.

Benijts, T., Dams, R., Guenther, W., Lambert, W., De Leenheer, A., 2002. Analysis of estrogenic contaminants in river water using liquid chromatography coupled to ion trap based mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 16, 1358-1364.

Benijts, T., Lambert, W., De Leenheer, A., 2004a. Analysis of multiple endocrine disruptors in environmental waters via wide-spectrum solid-phase extraction and dual-polarity ionization LC-Ion Trap-MS/MS. Anal. Chem. 76, 704-711.

Benijts, T., Dams, R., Lambert, W., De Leenheer, A., 2004b. Countering matrix effects in enviromental liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals. J. Chromatogr. A 1029, 153-159.

Bennetts, W.H., Underwood, E.J., Shier, F.L., 1946. A specific breeding problem of sheep on subterrranean clover pastures in Western Australia. Aust. Vet. J. 22, 2-12.

Bergeron, J.M., Crews, D., McLachlan, J.A., 1994. PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environment contamination. Environ. Health Perspect. 102, 780-781.

Blok, J., Wösten, M.A.D., 2000. Source and environmental fate of natural oestrogens. Report Association of River Waterworks - RIWA, Amsterdam.

Bolger, R., Wiese, T., Ervin, K., Nestich, S., Checovich, W., 1998. Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. Environ. Health Perspect. 106, 551-557.

Bolt, H.M., 1979. Metabolism of estrogens: natural and synthetic. Pharmacol. Ther. 4, 155-181.

Bolz, U., Koerner, W., Hagemeier, H., 2000. Development and validation of a GC/MS method for determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples. Chemosphere 40, 929-935.

Braga, O., Smythe, G.A., Schäfer, A.I., Feitz, A.J., 2005. Steroid estrogens in ocean sediments. Chemosphere 61, 827-833.

Brion, F., Tyler, C.R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J.M., Garric, J., Flammarion, J.M., 2004. Impacts of 17β-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). Aquat. Toxicol. 68, 193-217.

Brossa, L., Pocurull, E., Borrull, F., Marcé, R.M., 2004. Solid-phase extraction/high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry to determine endocrine disruptors in water samples. Chromatographia 59, 419-423.

Bruhn, T., Ludewig, S., Gülden, M., Seibert, H., 1999. Einstufung von Schadstoffen als endokrin wirksame Substanzen. UBA-Texte 65/99, Umweltbundesamt Berlin.

Bruins, A.P., 1998. Mechanistic aspects of electrospray ionization. J. Chromatogr. A 794, 345-357.

Brzezinski, A., Debi, A., 1999. Phytoestrogens: the ´natural´ selective estrogen receptor modulators? Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 85, 47-51.

Brzozowski, A.M., Pike, A.C.W., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engström, O., Öhman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.-A., Carlquist, M., 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. Nature 389, 753-758.

BUA, Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe, 1997. Stoffbericht Nr. 203: Bisphenol A. Hirzel Verlag, Stuttgart.

Bülbring, E., Burn, J.H., 1935. The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85, 320-333.

Cargouët, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., Levi, Y., 2004. Assessment of river contaminants by estrogenic compounds in Paris area (France). Sci. Total Environ. 324, 55-66.

Carson, R., 1962. Silent Spring. Houghton Mifflin, New York, USA.

Cassidy, A., Bingham, S., Setchell, K.D., 1994. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. Am. J. Clin. Nutr. 60, 333-340.

Céspedes, R., Petrovic, M., Raldúa, D., Saura, Ú., Piña, B., Lacorte, S., Viana, P., Barceló, D., 2004. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. Anal. Bioanal. Chem. 378, 697-708.

Céspedes, R., Lacorte, S., Raldúa, D., Ginebreda, A., Barceló, D., Piña, B., 2005. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain). Chemosphere 61, 1710-1719.

Cheskis, B.J., Karathanasis, S., Lyttle, C.R., 1997. Estrogen receptor ligands modulate its interaction with DNA. J. Biol. Chem. 272, 11384-11391.

Choi, B.K., Hercules, D.M., Gusev, A.I., 2001. Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal suppression. J. Chromatogr. A 907, 337-342.

Christiansen, T., Korsgaard, B., Jespersen, Å., 1998. Induction of vitellogenin synthesis by nonylphenol and 17β-estradiol and effects on the testicular structure in the elpout *Zoarces viviparous*. Mar. Environ. Res. 46, 141-144.

Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environ. Health Perspect. 101, 378-384.

Colborn, T., Dumanoski, D., Myers, J.P., 1996. Our stolen future – Are we threatening our fertility, intelligence and survival? – A scientific detective story. Penguin Books, New York.

Cole, R.B., 2000. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 35, 763-772.

Constantopoulos, T.L., Jackson, G.S., Enke, C.G., 2000. Challenges in achieving a fundamental model for ESI. Anal. Chim. Acta 406, 37-52.

Cook, J.W., Dodds, E.C, 1933. Sex hormones and cancer-producing compounds. Nature 131, 205-206.

Cook, J.W., Dodds, E.C., Hewett, C.L., Lawson, W., 1934. The estrogenic activity of some condensed-ring compounds in relation to their other biological activities. Proc. Roy. Soc. B 114, 272-286.

Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.A., and Korach, K.S., 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-α (ERα) and estrogen receptor-β (ERβ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERα-knockout mouse. Endocrinology 138, 4613-4621.

Dams, R., Huestis, M.A., Lambert, W.E., Murphy, C.M., 2003. Matrix effect in bio analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: Influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 14, 1290-1294.

D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., Samperi, R., 2003. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. Sci. Total Environ. 302, 199-209.

Daston, G.P., Gooch, J.W., Breslin, W.J., Shuey, D.L., Nikiforov, A.Y., Fico, T.A., Gorsuch, J.W., 1997. Environmental estrogens and reproductive health: A discussion of the human and environmental data. Reprod. Toxicol. 11, 465-481.

De la Mora, J.F., Van Berkel, G.J., Enke, C.G., Cole, R.B., Martinez-Sanchez, M., Fenn, J.B., 2000. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 35, 939-952.

De Metrio, G., Corriero, A., Desantis, S., Zubani, D., Cirillo, F., Deflorio, M., Bridges, C.R., Eicker, J., De la Serna, J.M., Megalofono, P., Kime, D.E., 2003. Evidence of a high percentage of intersex in the Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius L.*). Mar. Pollut. Bull. 46, 358-361.

Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* screening. Environ. Sci. Technol. 32, 1549-1558.

Dijkman, E., Mooibroek, D., Hoogerbrugge, R., Hogendoorn, E., Sancho, J.-V., Pozo, O., Hernandez, F., 2001. Study of matrix effects on the direct trace analysis of acidic pesticides in water using various liquid chromatographic modes coupled to tandem mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A 926, 113-125.

Dodds, E.C., Goldberg, L., Lawson, W., Robinson, R., 1938. Estrogenic activity of certain synthetic compounds. Nature 141, 247-248.

Dorfman, R.I., Dorfman, A.S., 1953. The assay of estrogens in the chick by oral administration. Endocrinology 53, 301-305.

Dorn, P.B., Chou, C.S., Gentempo, J.J., 1987. Degradation of bisphenol A in natural waters. Chemosphere 16, 1501-1507.

Ekelund, R., Bergman, A., Granmo, A., Berggren, M., 1990. Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals - a re-evaluation. Environ. Pollut. 64, 107-120.

Ekelund, R., Granmo, A., Magnusson, K., Berggren, A., Bergman, A., 1993. Biodegradation of 4-nonylphenol in seawater and sediment. Environ. Pollut. 79, 59-61.

Enke, C.G., 1997. A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes. Anal. Chem. 69, 4885-4893.

Europäisches Parlament. Richtlinie 2000/60/EG („Wasserrahmenrichtlinie“).

Europäisches Parlament. Richtlinie 2003/53/EG.

Fang, H., Tong, W., Perkins, R., Soto, A.M., Prechtl, N., Sheehan, D.M., 2000. Quantitative comparisons of *in vitro* assays for estrogenic activities. Environ. Health Perspect. 108, 723-729.

Fawell, J.K., Sheahan, D., James, H.A., Hurst, M., Scott, S., 2001. Oestrogens and oestrogenic activity in raw and treated water in Severn Trent Water. Water Res. 35, 1240-1244.

Fenet, H., Gomez, E., Pillon, A., Rosain, D., Nicolas, J.-C., Casellas, C., Balaguer, P., 2003. Estrogenic activity in water and sediments of a French river: Contribution of alkylphenols. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 44, 1-6.

Fenn, J.B., Rosell, J., Meng, C.K., 1997. In electrospray ionization, how much pull does an ion need to escape its droplet prison? J. Am. Soc. Mass Spectrom. 8, 1147-1157.

Ferguson, P.L., Iden, C.R., McElroy, A.E., Brownawell, B.J., 2001a. Determination of steroid estrogens in wastewater by immunoaffinity extraction coupled with HPLC Electrospray-MS. Anal. Chem. 73, 3890-3895.

Ferguson, P.L., Iden, C.R., Brownawell, B.J., 2001b. Analysis of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in environmental samples by mixed-mode high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. J. Chromatogr. A 938, 79-91.

Ferreira-Leach, A.M.R., Hill, E.M., 2001. Bioconcentration and distribution of 4-*tert*-octylphenol residues in tissues of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Marine Environ. Res. 51, 75-89.

Field, J.A., Reed, R.L., 1996. Nonylphenol polyethoxy carboxylate metabolites of non-ionic surfactants in U.S. paper mill effluents, municipal sewage treatment lant effluents, and river waters. Environ. Sci. Technol. 30, 3544-3550.

Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J., Guillette, L.J., 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. Environ. Health Perspect. 104, 1096-1101.

Folmar, L.C., Hemmer, M.J., Denslow, N.D., Kroll, K., Chen, J., Cheek, A., Richman, H., Meredith, H., Grau, E.G., 2002. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor *in vivo* and *in vitro*. Aquat. Toxicol. 60, 101-110.

Fry, D.M., Toone, C.K., 1981. DDT-induced feminization of gull embryos. Science 231, 919-924.

Furuichi, T., Kannan, K., Giesy, J.P., Masunaga, S., 2004. Contribution of known endocrine disrupting substances to the estrogenic activity in Tama River water samples from Japan using instrumental analysis and *in vitro* reporter gene assay. Water Res. 38, 4491-4501.

Gaido, K.W., Leonard, L.S., Lovell, S., Gould, J.C., Babai, D., Portier, C., McDonnell, D.P., 1997. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. Toxicol. Appl. Pharmacol. 143, 205-212.

Gangl, E.T., Annan, M., Spooner, N., Vouros, P., 2001. Reduction of signal suppression effects in ESI-MS using a nanosplitting device. Anal. Chem. 73, 5635-5644.

García-Reyero, N., Grau, E., Castillo, M., López de Alda, M.J., Barceló, D., Piña, B., 2001. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. Environ. Toxicol. Chem. 20, 1152-1158.

Gasc, J.-M., Baulieu, E.-E., 1986. Steroid hormone receptors: intracellular distribution. Biology of the Cell 56, 1-6.

Gaskell, S.J., 1997. Electrospray: Principles and practice. J. Mass Spectrom. 32, 677-688.

Gellert, R.J., Heinrichs, W.L., Swerdloff, R., 1974. Effects of neonatally-administered DDT homologs on reproductive function in male and female rats. Neuroendocrinol. 16, 84-94.

Gercken, J., Sordyl, H., 2002. Intersex in feral marine and freshwater fish from northeastern Germany. Mar. Environ. Res. 54, 651-655.

Gibson, R., Smith, M.D., Spary, C.J., Tyler, C.R., Hill, E.M., 2005. Mixtures of estrogenic contaminants in bile of fish exposed to wastewater treatment works effluents. Environ. Sci. Technol. 39, 2461-2471.

Gomes, R.L., Avcioglu, E., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2004. Steroid estrogen determination in sediment and sewage sludge: a critique of sample preparation and chromatographic/mass spectrometry considerations, incorporating a case study in method development. Trends Anal. Chem. 23, 737-744.

Gray, J.L.E., Kelce, W.R., Wiese, T., Tyl, R., Gaido, K., Cook, J., Klinefelter, G., Desaulniers, D., Wilson, E., Zacharewski, T., Waller, C., Foster, P., Laskey, J., Reel, J., Giesy, J., Laws, S., McLachlan, J., Breslin, W., Cooper, R., DiGuilio, R., Johnson, R., Purdy, R., Mihaich, E., Safe, S., Sonnenschein, C., Welshons, W., Miller, R., McMaster, S., Colborn, T., 1997. Endocrine screening methods workshop report: Detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. Reprod. Toxicol. 11, 719-750.

Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., Huber, J.C., 2002. Production and actions of estrogens. N. Engl. J. Med. 346, 340-352.

Gülden, M., Turan, A., Seibert, H., 1997. Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. UBA-Texte 46/97, Umweltbundesamt Berlin.

Gutendorf, B., Westendorf, J., 2001. Comparison of an array of *in vitro* assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. Toxicol. 166, 79-89.

Heemken, O.P., Reincke, H., Stachel, B., Theobald, N., 2001. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. Chemosphere 45, 245-259.

Heisterkamp, I., Gandrass, J., Ruck, W., 2004. Bioassay-directed chemical analysis utilizing LC–MS: a tool for identifying estrogenic compounds in water samples? Anal. Bioanal. Chem. 378, 709-715.

Helsinki Commission, 2003. The Baltic Marine Environment 1999-2002. Baltic Sea Environment Proceedings No. 87.

Heppell, S.A., Denslow, N.D., Folmar, L.C., Sullivan, C.V., 1995. Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. Environ. Health Perspect. 103, 9-15.

Hock, S., Seifert, M., 1998. Monitoring-Strategien für östrogene Wirkstoffe. Bioforum 11, 690-696.

Hogenboom, A.C., Niessen, W.M.A., Brinkman, U.A.T., 2001. The role of column liquid chromatography-mass spectrometry in environmental trace-level analysis. J. Sep. Sci. 24, 331-354.

Holmes, P., Humphrey, C., Scullion, M., 2001. Appraisal of test methods for sex hormone disrupting chemicals. OECD Environment Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 21: http://www.oecd.org/dataoecd/39/54/2350501.pdf

Houtman, C., Van Oostveen, A.M., Brouwer, A., Lamoree, M.H., Legler, J., 2004. Identification of estrogenic compounds in fish bile using bioassay-directed fractionation. Environ. Sci. Technol. 38, 6415-6423.

Hsieh, C.Y., Santell, R.C., Haslam, S.Z., Helferich, W.G., 1998. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells *in vitro* and *in vivo*. Cancer Res. 58, 3833-3838.

Hu, Y.F., Russo, I.H., Russo, J., 2002. Estrogen and human breast cancer. In: Metzler, M., (Ed.). Endocrine disruptors, Part II. Handb. Environ. Chem. 3 M, 1-25.

Hu, J., Zhang, H., Chang, H., 2005. Improved method for analyzing estrogens in water by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1070, 221-224.

Huang, C.-H., Sedlak, D.L., 2001. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. Environ. Toxicol. Chem. 20, 133-139.

Ingrand, V., Herry, G., Beausse, J., De Roubin, M.-R., 2003. Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1020, 99-104.

Isobe, T., Shiraishi, H., Yasuda, M., Shinoda, A., Suzuki, H., Morita, M., 2003. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 984, 195-202.

Iwasaki, S., Kato, S., Takahashi, M., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K., Matsuda, T., Matsui, S., 2004. Analysis of estrogen-like compounds in the environment by high performance liquid chromatography bioassay. J. Biosci. Bioeng. 97, 216-218.

Jahnke, A., Gandrass, J., Ruck, W., 2004. Simultaneous determination of alkylphenol ethoxylates and their biotransformation products by liquid chromatography /electrospray ionisation tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1035, 115-122.

Jensen, E., Jacobsen, H., 1962. Basic guides to the mechanism of estrogen action. Rec. Prog. Horm. Res. 18, 387-414.

Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G., Sumpter, J.P., 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. Environ. Health Perspect. 103, 581-587.

Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P., Sumpter, J.P., 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. Environ. Toxicol. Chem. 15, 194-202.

Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. Environ. Sci. Technol. 32, 2498-2506.

Johnson, A.C., Belfroid, A., Di Corcia, A., 2000a. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. Sci. Total Environ. 256, 163-173.

Johnson, A.C., White, C., Bhardwaj, L., Jurgens, M.D., 2000b. Potential for octylphenol to biodegrade in some English rivers. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2486-2492.

Johnson, A.C., Aerni, H.-R., Gerritsen, A., Gibert, M., Giger, W., Hylland, K., Jürgens, M., Nakari, T., Pickering, A., Suter, M.J.-F., Svenson, A., Wettstein, F.E., 2005. Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. Wat. Res. 39, 47-58.

Jonkers, N., Knepper, T., de Voogt, P., 2001. Aerobic biodegradation of nonylphenol ethoxylates in river water using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Environ. Sci. Technol. 35, 335-340.

Juberg, D.L., 2000. An evaluation of endocrine modulators: Implications for human health. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 93-105.

Jürgens, M.D., Holthaus, K.I.E., Johnson, A.C., Smith, J.J.L., Hetheridge, M., Williams, R.J., 2002. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in english rivers. Environ. Toxicol. Chem. 21, 480-488.

Kang, J.-H., Kondo, F., 2002. Effects of bacterial counts and temperature on the biodegradation of bisphenol A in river water. Chemosphere 49, 493-498.

Kawanishi, M., Takamura-Enya, T., Ermawati, R., Shimohara, C., Sakamoto, M., Matsukawa, K., Matsuda, T., Murahashi, T., Matsui, S., Wakabayashi, K., Watanabe, T., Tashiro, Y., Yagi, T., 2004. Detection of genistein as an estrogenic contaminant of river water in Osaka. Environ. Sci. Technol. 38, 6424-6429.

Kebarle, P., Tang, L., 1993. From ions in solution to ions in the gas phase. Anal. Chem. 65, 972A-986A.

Kebarle, P., 2000. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 35, 804-817.

Kelly, C., 2000. Analysis of steroids in environmental water samples using solid-phase extraction and ion-trap gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 872, 309-314.

King, W.J., Greene, G.L., 1984. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in nuclei of target cells. Nature 307, 745-747.

King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., Olah, T., 2000. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11, 942-950.

Kiparissis, Y., Hughes, R., Metcalfe, C., 2001. Identification of the isoflavonoid genistein in bleached kraft mill effluent. Environ. Sci. Technol. 35, 2423-2427.

Klecka, G.M., Gonsior, S.J., West, R.J., Goodwin, P.A., Markham, D.A., 2001. Biodegradation of bisphenol A in aquatic environments: river die-away. Environ. Toxicol. Chem. 20, 2725-2735.

Klein, K.O., Baron, J., Colli, M.J., McDonnell, D.P., Cutler, G.B., 1994. Estrogen levels in childhood determined by an ultrasensitive recombinant cell bioassay. J. Clin. Invest. 94, 2475-2480.

Klein, K.O., Demers, L.M., Santner, S.J., Baron, J., Cutler, G.B., Santen, R.J., 1995. Use of ultrasensitive recombinant cell bioassay to measure estrogen levels in women with breast cancer receiving the aromatase inhibitor. J. Clin. Endocrin. Metab. 80, 2658-2660.

Klinge, C.M., 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. Nucleic Acids Res. 29, 2905-2919.

Kloas, W., Levy, G., Opitz, R., Bögi, C., Würtz, S., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Van Ballegoy, C., Urbatzka, R., Jagnytsch, O., Lutz, I., 2003. Wirkungen endokrin wirksamer Substanzen auf aquatische Tiere. In: Track, T., Kreysa, G., (Hrsg.). Spurenstoffe in Gewässern. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 185-196.

Kloepfer, A., Quintana, J.B., Reemtsma, T., 2005. Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. J. Chromatogr. A 1067, 153-160.

Klotz, D.M., Beckman, B.S., Hill, S.M., McLachlan, J.A., Walters, M.R., Arnold, S.F., 1996. Identification of environmental chemicals with estrogenic activity using a combination of *in vitro* assays. Environ. Health Perspect. 104, 1084-1089.

Körner, W., Bolz, U., Süßmuth, W., Hiller, G., Schuller, W., Hanf, V., Hagenmaier, H., 2000. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage treatment plant in Germany. Chemosphere 40, 1131-1142.

Körner, W., Bolz, U., Triebskorn, R., Schwaiger, J., Negele, R.-D., Marx, A., Hagenmaier, H., 2001. Steroid analysis and xenosteroid potentials in two small streams in southwest Germany. J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov. 8, 215-229.

K_{OW} Win, 1999. Log K_{OW} program, Environmental Science Centre, Syracuse Research Corporation, New York, http://esc.syrres .com

Kuch, H.M., Ballschmiter, K., 2001. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. Environ. Sci. Technol. 35, 3201-3206.

Kuiper, G.G.J.M., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.-Å., 1996. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5925-5930.

Kuiper, G.G.J.M., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.-Å., 1997a. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β. Endocrinology 138, 863-870.

Kuiper, G.G.J.M., Gustafsson, J.-Å., 1997b. The novel estrogen receptor-β subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. FEBS Letters 410, 87-90.

Kuiper, G.G.J.M., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., Van der Saag, P.T., Van der Burg, B., Gustafsson, J.-Å., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β. Endocrinology 139, 4252-4263.

Kuster, M., López de Alda, M.J., Barceló, D., 2004. Analysis and distribution of estrogens and progesterons in sewage sludge, soils and sediments. Trends Anal. Chem. 23, 790-798.

Lagana, A., Bacaloni, A., Fago, G., Marino, A., 2000. Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 14, 401-407.

Lagana, A., Bacaloni, A., De Leva, I., Faberi, A., Fago, G., Marino, A., 2004. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. Anal. Chim. Acta 501, 79-88.

Lai, K.M., Johnson, K.L., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2000. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. Environ. Sci. Technol. 34, 3890-3894.

Lai, K.M., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2002a. Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. Sci. Total Environ. 289, 159-168.

Lai, K.M., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2002b. Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by *Chlorella vulgaris*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 859-864.

Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.-E., Förlin, L., 1999. Ethinylestradiol - an undesired fish contraceptive? Aquat. Toxicol. 45, 91-97.

Lee, H.B., Liu, D., 2002. Degradation of 17β-estradiol and its metabolites by sewage bacteria. Water Air Soil Poll. 134, 353-368.

Legler, J., Jonas, A., Lahr, J., Vethaak, A.D., Brouwer, A., Murk, A.J., 2002. Biological measurement of estrogenic activity in urine and bile conjugates with the *in vitro* ER-CALUX reporter gene assay. Environ. Toxicol. Chem. 21, 473-479.

Leinonen, A., Kuuranne, T., Kostiainen, R., 2002. Liquid chromatography / mass spectrometry in anabolic steroid analysis-optimization and comparison of three ionization techniques: electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization. J. Mass Spectrom. 37, 693-698.

Leisewitz, A., Schwarz, W., 1997. Stoffströme wichtiger endokrin wirksamer Industriechemikalien Bisphenol A; Dibutylphthalat/Benzylphthalat; Nonylphenol/ Alkylphenolethoxylate. Umweltbundesamt-Forschungsbericht 106 01 076.

Liang, H.R., Foltz, R.L., Meng, M., Bennett, P., 2003. Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable isotopelabeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 17, 2815-2821.

Lobos, J.H., Leib, T.K., Su, T.-M., 1992. Biodegradation of bisphenol A and other bisphenols by a gramnegative aerobic bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1823-1831.

López de Alda, M., Barceló, D., 2001a. Review of analytical methods for the determination of estrogens and progesterons in waste waters. Fresenius J. Anal. Chem. 371, 437-447.

López de Alda, M., Barceló, D., 2001b. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disruptors in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection. J. Chromatogr. A 911, 203-210.

López de Alda, M., Díaz-Cruz, S., Petrovic, M., Barceló, D., 2003. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. J. Chromatogr. A 1000, 503-526.

Mackay, D., Fraser, A., 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. Environ. Pollut. 110, 375-391.

Maguire, R.J., 1999. Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments. Water Qual. Res. J. Can. 34, 37-38.

Matthäus, W., 1996. Ozeanographische Besonderheiten. In: Lozán, J.L., Lampe, R., Matthäus, W., Rachor, E., Rumohr, H., Von Westernhagen, H., (Hrsg.): Warnsignale aus der Ostsee. Parey Buchverlag Berlin, 17-24.

Matthiessen, P., 2003. Historical perspective on endocrine disruption in wildlife. Pure Appl. Chem. 75, 2197-2206.

Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M., 2003. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Anal. Chem. 75, 3019-3030.

Mazur, W., 1998. Phytoestrogen content in foods. Baillieres Clin. Endocrinol. Metab. 12, 729-742.

Mosselmann, S., Polman, J., Dijkema, R., 1996. ER beta: identification and characterization of an novel human estrogen receptor. FEBS Lett. 392, 49-53.

Motoyama, A., Suzuki, A., Shirota, O., Namba, R., 1999. Direct determination of Bisphenol A and Nonylphenol in river water by column-switching semi-microcolumn liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 13, 2204-2208.

Mueller, S.O., 2004. Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods. Anal. Bioanal. Chem. 378, 582-587.

Nasu, M., Goto, M., Kato, H., Oshima, Y., Tanaka, H., 2001. Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants. Water Sci. Technol. 43, 101-108.

Nakada, N., Nyunoya, H., Nakamura, M., Hara, A., Iguchi, T., Takada, H., 2004. Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. Environ. Toxicol. Chem. 23, 2807-2815.

Nelson, J.A., 1974. Effects of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) analogs and polychlorinated biphenyl (PCB) mixtures on 17β-[^{3}H] estradiol binding to rat uterine receptor. Biochem. Pharmacol. 23, 447-451.

Newbold, R.R., 2002. Effects of perinatal estrogen exposure on fertility and cancer in mice. In: Metzler, M., (Ed.): Endocrine disruptors, Part II. Handb. Environ. Chem. 3 M, 171-186.

Niessen, W.M.A., 1998. Advances in instrumentation in liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques. J. Chromatogr. A 794, 407-435.

Norberg-King, T.J., Durhan, E.J., Ankley, G.T., 1991. Application of toxicity identification evaluation procedures to the ambient waters of the Colusa basin drain, California. Environ. Toxicol. Chem. 10, 891-900.

Oberdörster, E., Cheek, A.O., 2000. Gender benders at the beach: Endocrine disruption in marine and estuarine organisms. Environ. Toxicol. Chem. 20, 23-36.

Oosterkamp, A.J., Hock, B., Irth, H., 1997. Novel monitoring strategies for xenoestrogens. Trends Anal. Chem. 16, 544-553.

Orlando, E.F., Guilette, L.J.J., 2002. Developmental and reproductive abnormalities associated with endocrine disruptors in wildlife. In: Metzler, M., (Ed.): Endocrine disruptors, Part II. Handb. Environ. Chem. 3 M, 251-270.

Ososki, A.L., Kennelly, E.J., 2003. Phytoestrogens: a review of the present state of research. Phytother. Res. 17, 845-869.

Panter, G.H., Thompson, R.S., Sumpter, J.P., 1998. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. Aquat. Toxicol. 42, 243-253.

Parmigiani, S., Vom Saal, F., Palanza, P., 1998. Social and individual behaviour in mice prenatally exposed to endocrine disrupting chemicals. In: Umweltbundesamt Berlin, (Hrsg.): Effects of endocrine disruptors in the environment on neuronal development and behaviour. UBA-Texte 50/98, 6-15.

Pascoe, R., Foley, J.P., Gusev, A.I., 2001. Reduction in matrix-related signal suppression effects in electrospray ionization mass spectrometry using on-line two-dimensional liquid chromatography. Anal. Chem. 73, 6014-6023.

Pawlowski, S., Ternes, T., Bonerz, M., Kluczka, T., Van der Burg, B., Nau, H., Erdinger, L., Braunbeck, T., 2003. Combined in situ and *in vitro* assessment of the estrogenic activity of sewage and surface water samples. Toxicol. Sci. 75, 57-65.

Pawlowski, S., Ternes, T.A., Bonerz, M., Rastall, A.C., Erdinger, L., Braunbeck, T., 2004. Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. Toxicol. In Vitro 18, 129-138.

Pedersen, S.N., Lindholst, C., 1999. Quantification of the xenoestrogens 4-*tert*.-octylphenol and bisphenol A in water and in fish tissue based on microwave assisted extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A 864, 17-24.

Pedersen, R.T., Hill, E.M., 2002. Tissue distribution and depuration of 4-*tert*-octylphenol residues in the cyprinid fish, *Scardinius erythrophthalmus*. Environ. Sci. Technol. 36, 3275-3283.

Pelissero, C., Flouriot, G., Foucher, J.L., Bennetau, J.L., Dunogues, J., LeGac, F., Sumpter, J.P., 1993. Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes: an *in vitro* test for the estrogenic potency of chemicals. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 44, 263-272.

Petrovic, M., Solé, M., López de Alda, M.J., Barceló, D., 2002. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. Environ. Toxicol. Chem. 21, 2146-2156.

Petrovic, M., Eljarrat, E., López de Alda, M.J., Barceló, D., 2004. Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurence data. Anal. Bioanal. Chem. 378, 549-562.

Petty, J.D., Huckins, J.N., Alvarez, D.A., Brumbaugh, W.G., Cranor, W.L., Gale, R.W., Rastall, A.C., Jones-Lepp, T.L., Leiker, T.J., Rostad, C.E., Furlong, E.T., 2004. A holistic passive integrative sampling approach for assessing the presence and potential impacts of waterborne environmental contaminants. Chemosphere 54, 695-705.

Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. Chem. Ecol. 8, 275-285.

Quintana, J.B., Carpinteiro, J., Rodríguez, I., Lorenzo, R.A., Carro, A.M., Cela, R., 2004. Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A 1024, 177-185.

Quirós, L., Céspedes, R., Lacorte, S., Viana, P., Raldúa, D., Barceló, D., Piña, B., 2005. Detection and evaluation of endocrine-disrupting activity in water samples from Portuguese rivers. Environ. Toxicol. Chem. 24, 389-395.

Reel, J.R., Lamb, J.C., Neal, B.H., 1996. Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34, 288-305.

Reemtsma, T., 2001. The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in water analysis - Part I: Achievements. Trends Anal. Chem. 20, 500-517.

Renner, R., 1997. European bans on surfactant trigger transatlantic debate. Environ. Sci. Technol. 31, 316A-320A.

Rodriguez-Mozaz, S., López de Alda, M., Barceló, D., 2004. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1045, 85-92.

Routledge, E.D., Sumpter, J.P., 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environ. Toxicol. Chem. 15, 241-248.

Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M., Sumpter, J.P., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *In vivo* responses in trout and roach. Environ. Sci. Technol. 32, 1559-1565.

Rutishauser, B.V., Pesonen, M., Escher, B., Ackermann, G.E., Aerni, H.-P., Suter, M.J.-F., Eggen, R.I.L., 2004. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three *in vitro* assays and chemical analysis of steroids. Environ. Toxicol. Chem. 23, 857-864

Safe, S., 1995. Environmental and dietary estrogens and human health: Is there a problem? Environ. Health Perspect. 103, 346-351.

Safe, S., 2004. Endocrine disruptors and human health: is there a problem. Toxicology 205, 3-10.

Schäfer, W.R., Zahradnik, H.P., Frijus-Plessen, N., Schneider, K., 1996. Anthropogene Substanzen mit unerwünschter Östrogenwirkung. Auswahl von expositionsrelevanten Stoffen. Umweltmed. Forsch. Prax. 1, 35-42.

Schlumpf, M., Schmid, P., Durrer, S., Conscience, M., Maerkel, K., Henseler, M., Gruetter, M., Herzog, I., Reolon, S., Ceccatelli, R., Faass, O., Stutz, E., Jarry, H., Wuttke, W., Lichtensteiger, W., 2004. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters - an update. Toxicology 205, 113-122.

Schröder, H.F., 2003. Abwasserreinigungsverfahren zur verbesserten Elimination pharmazeutischer und endokrin wirksamer Reststoffe. In: Track, T., Kreysa, G., (Hrsg.). Spurenstoffe in Gewässern. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 153-172.

Schuetzle, D., Lewtas, J., 1986. Bioassay-directed chemical analysis in environmental research. Anal. Chem. 58, 1060A-1075A.

Schultis, T., 2005. Erfassung der estrogenen Wirksamkeit von Umweltproben und Reinsubstanzen durch biologische Testsysteme – Entwicklung und Vergleich von *in vitro*-Assays. Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft Band 181. Oldenbourg Industrieverlag GmbH, München.

Scott, A.P., Katsiadaki, I.,Witthames, P.R., Hylland, K., Davies, I.M., McIntosh, A.D., Thain, J., 2005. Vitellogenin in the blood plasma of male cod (*Gadus morhua*): A sign of oestrogenic endocrine disruption in the open sea? Mar. Environ. Res., *in press*.

Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2004. *In-vitro* assays for determination of oestrogenic activity. Anal. Bioanal. Chem. 378, 576-581.

Seibert, B., 1996. Data from animal experiments and epidemiological data on tumorigenicity of estradiol valerate and ethinyl estradiol. In: Umweltbundesamt Berlin, (Hrsg.): Endocrinically active chemicals in the environment. UBA-Texte 3/96, 63-68.

Snyder, S.A., Keith, T.L., Verbrugge, D.A., Snyder, E.M., Gross, T.S., Kannan, K., Giesy, J.P., 1999. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. Environ. Sci. Technol. 33, 2814-2820.

Soto, A.M., Lin, T.M., Justicia, H., Silva, R.M., Sonnenschein, C., 1992. An „in culture“ bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics. In: Colborn, T., Clement, C., (Eds.): Chemically induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection. Princeton Scientific Publishing, New York, 295-309.

Souverain, S., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., 2004. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. J. Chromatogr. A 1058, 61-66.

Spengler, P., Koerner, W., Metzger, J.W., 1999. Hardly degradable substances with estrogenic activity in effluents of municipal and industrial sewage treatment plants. Vom Wasser 92, 141-157.

Spengler, P., Koerner, W., Metzger, J.W., 2001. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical analysis. Environ. Toxicol. Chem. 20, 2133-2141.

Staples, C.A., Dorn, P.B., Klecka, G.M., O'Block, S.T., Harris, L.R., 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. Chemosphere 36, 2149-2173.

StAUN Rostock, mündliche Mitteilung, 2004.

Steen, R.J.A., Hogenboom, A.C., Leonards, P.E.G., Peerboom, R.A.L., Cofino, W.P., Brinkman, U.A.T., 1999. Ultra-trace-level determination of polar pesticides and their transformation products in surface and estuarine water samples using column liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 857, 157-166.

Sumpter, J.P., Jobling, S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environ. Health Perspect. 103, 173-178.

Sweeting, R.A., 1981. Internal Report. Thames Water, Lea Division, Herts, U.K.

Syhre, M., Hanschmann, G., Heber, R., 1996. Derivatisierungstechniken in der Rückstandsanalytik. GIT-Labor-Fachzeitschrift, 1121-1128.

Tabata, A., Kashiwa, S., Ohnishi, Y., Ishikawa, H., Miyamoto, N., Itoh, M., Magara, Y., 2001. Estrogenic influence of estradiol-17b, p-nonylphenol and bis-phenol-A on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations. Water Sci. Technol. 43, 109-116.

Takasu, T., Iles, A., Hasebe, K., 2002. Determination of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates by reversed-phase high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction. Anal. Bioanal. Chem. 372, 554-561.

Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.-D., Servos, M., 1999a. Behaviour and occurence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. Sci. Total Environ. 225, 81-90.

Ternes, T.A., Kreckel, P., Mueller, J., 1999b. Behaviour and occurence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. Sci. Total Environ. 225, 91-99.

Ternes, T.A., Brenner-Weiß, G., Eggert, T., Kirschhoefer, F., Nusser, M., Wilken, R.-D., Obst, U., 1999c. Analysis of phytoestrogens and mycoestrogens in water using liquid chromatography-electrospray ionization/tandem mass spectrometry (LC-MSMS). Vom Wasser 93, 255-263.

Ternes, T., Bonerz, M., Schmidt, T., 2001. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 938, 175-185.

Thiele, B., Günther, K., Schwuger, M.J., 1997. Alkylphenol ethoxylates: Trace analysis and environmental behavior. Chem. Rev. 97, 3247-3272.

Thomas, K.V., Hurst, M.R., Matthiessen, P., Waldock, M.J., 2001. Characterization of estrogenic compounds in water samples collected from United Kingdom estuaries. Environ. Toxicol. Chem. 20, 2165-2170.

Tölgyessy, P., Liska, I., 1999. Study of applicability of various solid-phase extraction materials for sample handling in screening analysis of organic micropollutants in water. J. Chromatogr. A 857, 247-254.

Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L.J., Jensen, T.K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J.A., Meyer, O., Müller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J., Skakkebæk, N.E., 1996. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. Environ. Health Perspect. 104, 741-803.

Turan, A., 1995. Exkretion natürlicher und synthetischer Östrogene und ihrer Metabolite: Vorkommen und Verhalten im Wasser. In: Umweltbundesamt Berlin, (Hrsg.): Fachgespräch Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung. UBA-Texte 65/95, 16-21.

Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: A critical review of evidence. Crit. Rev. Toxicol. 28, 319-361.

Vanderford, B.J., Pearson, R.A., Rexing, D.J., Snyder, S.A., 2003. Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Anal. Chem. 75, 6265-6274.

Vermeirssen, E.L.M., Körner, O., Schönenberger, R., Suter, M.J.-F., Burkhardt-Holm, P., 2005. Characterization of environmental estrogens in river water using a three pronged approach: Active and passive water sampling and the analysis of accumulated estrogens in the bile of caged fish. Environ. Sci. Technol. 39, 8191-8198.

Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, A., Lambré, C., Tarazona, J.V., Brandt, I., Vethaak, A.D., 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. Crit. Rev. Toxicol. 30, 71-133.

Wheeler, T.F., Heim, J.R., LaTorre, M.R., Blair Janes, A., 1997. Mass spectral characterization of p-nonylphenol isomers using high resolution capillary GC-MS. J. Chromatogr. Sci. 35, 19-30.

White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P., Parker, M.G., 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. Endocrinology 135, 175-182.

Wibbels, T., Crews, D., 1992. Specificity of steroid hormone-induced sex determination in turtle. J. Endocrin. 133, 121-129.

Williams, R.J., Johnson, A.C., Smith, J.J.L., Kanda, R., 2003. Steroid estrogens profiles along river stretches arising from sewage treatment works discharges. Environ. Sci. Technol. 37, 1744-1750.

WWF-World Wildlife Fund, 1997. Umweltgifte mit hormoneller Wirkung. Umweltstiftung WWF-Deutschland.

Xie, Z., Lakaschus, S., Ebinghaus, R., Caba, A., Ruck, W., 2005. Atmospheric concentrations and air-sea exchanges of nonylphenol, tertiary octylphenol and nonylphenol monoethoxylate in the North Sea. Environ. Pollut., *in press*.

Ying, G.-G., Kookana, R.S., Ru, Y.-J., 2002a. Occurence and fate of hormone steroids in the environment. Environ. Int. 28, 545-551.

Ying, G.-G., Williams, B., Kookana, R., 2002b. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review. Environ. Int. 28, 215-226.

Ying, G.-G., Kookana, R.S., Dillon, P., 2003. Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material. Water Res. 37, 3785-3791.

Young, W.F., Whitehouse, P., Johnson, I., Sorokin, N., 2002. Proposed predicted-no-effect-concentrations (PNECs) for natural and synthetic steroid oestrogens in surface waters. Technical Report P2-T04/1, Environment Agency, Bristol.

Zacharewski, T., 1997. *In vitro* bioassays for assessing estrogenic substances. Environ. Sci. Technol. 31, 613-623.

Zöllner, P., Leitner, A., Berner, D., Kleinova, M., Jodlbauer, J., Mayer, B.X., Lindner, W., 2003. Improving LC-MS analysis in complex food matrix. LC GC Europe March, 2-8.

Zrostlíková, J., Hajslová, J., Poustka, J., Begany, P., 2002. Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography-electrospray ionisation tandem. J. Chromatogr. A 973, 13-26.

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die eingereichte Dissertation „Estrogene in Küstengewässern - Untersuchungen in der Ostsee mittels chemischer Analytik und einem *in vitro*-Biotest“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel verfasst habe. Anderer als der von mir angegebenen Hilfsmittel und Schriften habe ich mich nicht bedient. Alle wörtlich oder sinngemäß den Schriften anderer Autorinnen oder Autoren entnommenen Stellen habe ich kenntlich gemacht.
Die vorliegende Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zwecke der Promotion oder eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Iris-Constanze Beck

Hamburg, 28.04.2006