

Zum Carry over von Toxaphen in Legehennen und Eiern

**Beitrag zur Etablierung eines Höchstwertes für Toxaphenrückstände in Futtermitteln
für Legehennen auf Basis einer indikatorspezifischen Analytik**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der
Bergischen Universität-Gesamthochschule Wuppertal

vorgelegt von
Martin Kaltenecker

Wuppertal 2001

Abstract

A feeding study with 87 laying hens subdivided into 5 test groups was carried out. The addition of technical toxaphene to the hens' diet was 0, 0.1, 0.5, 1.0, or 5.0 mg/kg, respectively. The feeding was continued for 38 weeks. The accumulation and depletion behaviour was investigated in eggs, muscle tissue, liver, kidney, blood, and faeces.

Similar as in fish, some typical toxaphene congeners could be identified in laying hens and were present in higher concentration levels, when the feed was contaminated with toxaphene. Because of this fact, toxaphene residues can be quantified on the basis of these main congeners.

This study demonstrated that toxaphene congeners accumulate only in adipose tissues. The congeners Parlar No. 26, 41, 42, 44, 50, 62 and 63 had the highest accumulation potential of all 22 tested toxaphene congeners. In adipose tissue, the carry over factors of these congeners were calculated to give values between 8 and 14. The carry over factors in yolk ranged between 1.4 and 2.6 and in liver between 0.9 and 2.0. No accumulation could be found in the hens' muscle tissue, kidney, blood, or faeces, with carry over factors all being below 1.

The obtained data allowed to set up dose/tissue concentration diagrams which could be used to calculate the toxaphene concentration in the tissue when the amount of the toxaphene contamination of the diet is known.

For the most abundant congeners the biological half life periods were determined. These were between 25 and 49 days in matrices with high fat content (depot fat, yolk, kidney). In tissues with lower fat content (muscle tissues, blood, faeces) toxaphene was depleted much quicker. For those congeners with the highest accumulation potential, the half life period in muscle meat gave values between 15 and 22 days.

Balancing the fate of ingested toxaphene it can be stated that 5-10 % were trapped in the animals' bodies. Only 2-4 % were identified as unmetabolised congeners in the faeces. The main route of excretion was the egg. 22 % or 37 % of unmetabolised toxaphene was depleted via egg or egg yolk, respectively.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1995 bis Oktober 1998 am Institut für Physik und Chemie der Bundesanstalt für Fleischforschung in Kulmbach, unter Anleitung von Prof. Dr. Karl O. Honikel, angefertigt.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Michael Petz, möchte ich für die Betreuung der vorliegenden Arbeit herzlich danken. Seine wohlwollende Förderung und Unterstützung haben sehr zum Gelingen beigetragen.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Dir. und Prof. Dr. Karl O. Honikel, für die Überlassung des Themas und der Bereitstellung des Arbeitsplatzes an der Bundesanstalt für Fleischforschung in Kulmbach.

Herrn Dr. Karl-Heinz Schwind und Herrn Dr. Hermann Hecht vom Institut für Physik und Chemie an der Bundesanstalt für Fleischforschung in Kulmbach gilt mein ganz besonderer Dank. Durch Ihr Interesse und Ihre Ideen haben sie sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Beiden Herren danke ich für die freundliche und äußerst gute Zusammenarbeit und Herrn Dr. Karl-Heinz Schwind im Besonderen für die sehr gute Einführung in die hochauflösende Massenspektrometrie.

Für die finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, möchte ich mich bei der H. Wilhelm Schaumann Stiftung in Hamburg, namentlich bei Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Hans O. Gravert, bedanken.

Für die Aufarbeitung der zahlreichen Proben möchte ich Herrn Wiedera und Frau Mundil von der Bundesanstalt für Fleischforschung in Kulmbach herzlich danken.

Ebenfalls möchte ich mich bei den Damen der Radiologie der Bundesanstalt für das freundliche Arbeitsklima bedanken.

Mein Dank gilt auch der EDV-Abteilung, besonders Herrn Siegfried Ehrhardt, für die Programmierung der statistischen Berechnungen und die Datenverwaltung.

Dem Jung-Wissenschaftler Team der Fleischforschung Kulmbach gilt mein herzlicher Dank für die freundliche Aufnahme und stetige Diskussionsbereitschaft.

Ferner danke ich allen Angehörigen der Bundesanstalt für Fleischforschung, die in irgendeiner Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Wohl der wichtigste Dank gilt meinen Eltern, Schwiegereltern und Geschwistern die mich auf meinem Weg stets unterstützt haben und meiner Frau Bärbel, ohne deren Hilfe, Verständnis und Liebe diese Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können.

Meiner Frau Bärbel
gewidmet

Meinen Eltern und meinem Bruder Raphael
in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Theoretischer Teil

1. Einleitung	1
1.1 Einsatzgebiete, insektizide Eigenschaften und Produktionsdaten von Toxaphen	4
1.2 Synthese von technischem Toxaphen	6
1.3 Chemische und physikalische Eigenschaften von technischem Toxaphen	7
1.4 Isolierung und Nomenklatur von Einzelkomponenten	8
1.5 Analytik von Toxaphen	12
2. Zielsetzung	15

Praktischer Teil

3. Material und Methoden	
3.1 Geräte und Chemikalien	18
3.1.1 Chemikalien	18
3.1.2 Standardverbindungen für die Analytik	19
3.1.3 Geräte	22
3.1.3.1 Glasgeräte	22
3.1.3.2 Analytische und Labor Geräte	23
3.2 Arbeitsvorschriften zur Bestimmung von Toxaphen	23
<i>Extraktion von Toxaphen aus den Proben</i>	23
<i>Clean-up der Proben</i>	25
<i>Messung und Quantifizierung der Proben mittels GC/HRMS</i>	26
3.3 Fütterungsversuch	28
4. Analytisches Verfahren zur Bestimmung von Toxaphenrückständen in tierischen Lebensmitteln	31
4.1 Ionisierung und Ionendetektion der Toxaphenverbindungen	31
4.2 Chromatographische Trennung von Toxaphen	36
4.3 Responseverhalten von Toxaphen nach Elektronenionisation	37

4.4	Linearität des Detektors	40
4.5	Nachweisgrenzen für das Verfahren	43
4.6	Wiederfindung	45
4.7	Wiederholbarkeit	46
5	Ergebnisse des Fütterungsversuches an Legehennen	49
5.1	Verhalten der Toxaphenkongenerere	49
	5.1.1 während des Transfers aus dem Futter in Legehennen und Eier	49
	5.1.2 in Legehennen und Eiern während der Abklingphase	55
5.2	Ergebnisse des Anfütterungsversuches	61
	5.2.1 Gleichgewichtseinstellung der Toxaphenkontamination in den verschiedenen Geweben und im Ei von Legehennen	61
	5.2.2 Carry over Faktoren	68
	5.2.2.1 im Depotfett von Legehennen	70
	5.2.2.2 im Muskelfleisch von Legehennen	72
	5.2.2.3 in Leber und Niere von Legehennen	75
	5.2.2.4 in Eidotter von Legehennen	78
	5.2.3 Bilanzierung zum Verbleib des aufgenommenen Toxaphens in der Legehenne	80
	5.2.4 Dosis-Gewebekonzentrationskurven	84
5.3	Abklingverhalten und biologische Halbwertszeiten von Toxaphenkongeneren	89
	5.3.1 im Depotfett von Legehennen	90
	5.3.2 in den Nieren von Legehennen	100
	5.3.3 in den Lebern von Legehennen	104
	5.3.4 im Muskelgewebe von Legehennen	106
	5.3.5 im Eidotter von Legehennen	109
	5.3.6 Abschließende Betrachtung des Abbauverhaltens von Toxaphenkongeneren in Geweben von Legehennen sowie deren Eier	112
5.4	Metabolisierung von Toxaphenkongeneren in Leber und Nieren von Legehennen	114

6.	Weitere Untersuchungen	117
6.1	Vorstellung einer alternativen Technik zur Soxhlet-Extraktion	117
6.1.1	Vorstellung des Extraktionsgerät ASE 200	117
6.1.2	Methodenentwicklung für die Extraktion von tierischen Proben	119
6.1.3	Extraktion von Toxaphen mit dem ASE 200	122
6.2	Untersuchung der Toxaphene auf verschiedenen GC-Säulen	128
6.2.1	Messung der Toxaphene auf einer Trennsäule des Typs XLB der Firma J+W	129
6.2.2	Messung der Toxaphene auf einer Optima 17 GC-Säule der Firma Machery - Nagel	132
6.3	Messungen von Toxaphenkongeneren auf weitere Fragmentationenspuren nach Elektronenionisation	134
6.3.1	Untersuchung von Fragmentionen im Massenbereich über m/z 300	134
6.3.1.1	Messung des $[M-Cl]^+$ - Fragmentions	136
6.3.1.2	Messung weiterer Fragmente	137
6.3.2	Messung des Molekülions der chlorierten Camphene	141
6.3.3	Bestimmung von Toxaphenkongeneren über die Fragmentionen m/z 195 und 231	143
6.4	Untersuchungen von weiterem tierischen Probenmaterial	145
7.	Diskussion	149
7.1	Extraktion von Toxaphenrückständen mittels ASE 200	149
7.2	Analytik von Toxaphenrückständen	150
7.3	Auswahl von geeigneten Fragmentionen zur Messung von Toxaphenrückständen	152
7.4	Diskussion der Ergebnisse aus der Fütterungsstudie	153
8.	Literatur	163
9.	Zusammenfassung	169

Anhang

I	Zeichenerklärung für die Darstellung der Werte in Box-Whiskers-Plots
II	Bestimmung der Nachweisgrenzen und des Vertrauensbereichs

1. Einleitung

Lebensmittel gehören zu den am intensivsten auf Schadstoffe und Rückstände untersuchten Gegenständen. Durch diese Untersuchungen bekam der Verbraucher in den letzten Jahren immer mehr Informationen über die Höhe von Rückständen in der Nahrung. Besonders bei den Medien aber standen meist negative Aussagen über die betreffenden Lebensmittel im Vordergrund. Insbesondere Belastungen von Lebensmitteln mit Pestizidrückständen und Umweltkontaminanten, wie Organochlorverbindungen, waren immer wieder in den Schlagzeilen. Namen, wie DDT, Lindan, Dioxin, PCB und PCP, wurden so auch für den Laien zum Begriff.

Durch das gestiegene Interesse bei Bevölkerung, Politik und Wissenschaft für diese Schadstoffe wurde die Entwicklung von analytischen Methoden zur Bestimmung solcher Substanzen stark vorangetrieben. Dabei zeigte sich, dass trotz der seit Jahren bestehenden Anwendungsverbote infolge der Persistenz dieser Substanzklassen, die Schadstoffe noch immer in unseren Lebensmitteln nachzuweisen sind. Das Verhalten dieser Schadstoffe in der Umwelt, in Lebensmitteln und die daraus resultierende toxikologische Bedeutung waren daher in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung.

Trotz des erheblichen Forschungsaufwandes gibt es noch immer Substanzklassen aus der Gruppe der Organochlorverbindungen, über die trotz des Vorkommens in der Umwelt und in Lebensmitteln nicht genügend Datenmaterial existiert, um ihr Risikopotential für den Verbraucher zuverlässig abschätzen zu können. Als Gründe hierfür können vor allem Schwierigkeiten bei der Analytik von bestimmten Schadstoffklassen benannt werden. Zu diesen Substanzklassen gehören beispielsweise die Chlorparaffine und das in dieser Dissertation behandelte Toxaphen.

Toxaphen gehörte bis Ende der siebziger Jahre mit zu den am stärksten verbreiteten Pflanzenschutzmitteln [1,2]. Es ist ein nicht-systemisches, als Kontakt- und Fraßgift wirkendes Insektizid [3]. Der vermehrte Einsatz von Toxaphen kann auf das Anwendungsverbot von althergebrachten chlorierten Pflanzenschutzmitteln, wie beispielsweise DDT, zurückgeführt werden [1]. Toxaphen weist ein sehr breites Wirkungsspektrum auf und war deshalb sehr gut als DDT-Ersatz geeignet.

Toxaphen stellt, chemisch gesehen, ein sehr komplexes Gemisch dar, welches aus ca. 76 % polychlorierten Bornanen, 18 % polychlorierten Bornenen, 2 % polychlorierten Bornandienen,

1% anderen chlorierten Kohlenwasserstoffen, sowie 3 % nicht chlorierten Verbindungen besteht [4]. Die Vielzahl an Verbindungen und das Fehlen geeigneter Vergleichssubstanzen für die Quantifizierung von Rückständen machten die Analytik von Toxaphen in der Vergangenheit extrem schwierig [5].

Die Anzahl an Einzelverbindungen im technischen Toxaphen wird in der Literatur mit 175 bzw. 177 [6,7], 202 [4], über 300 [8] und sogar auf über 600 [9] beziffert.

Um Toxaphenrückstände quantifizieren zu können, wurden seit 1973 mehrere Kongenere isoliert und charakterisiert [1]. Diese Verbindungen waren aber nicht allgemein zugänglich, so daß für die Quantifizierung von Rückständen als Standard technisches Toxaphen eingesetzt wurde. Hierbei ergaben sich weitere Probleme bei der Analytik. Bei der Messung von verschiedenen Proben technischen Toxaphens wurden unterschiedliche Gehalte an Hepta- und Nonachlorverbindungen quantifiziert [10], zudem ergaben sich durch andere Organochlorverbindungen, wie PCB, Interferenzen mit den Toxaphen-Rückständen. Da PCB deutlich empfindlicher mit einem ECD gemessen werden können als die Verbindungen des Toxaphens, führen diese Interferenzen zu großen Fehlern [11]. Durch eine Photodehalogenierung [11,12] und eine Nitrierung [13] konnten solche Interferenzen stark minimiert werden. Durch die beiden genannten Verfahren wurden PCB-Rückstände abgebaut.

Aber auch die Toxaphenrückstände wurden bei dieser Probenbehandlung teilweise abgebaut [10]. Neben den Interferenzen mit anderen chlorierten Verbindungen ergab sich bei der Integration von Rückständen ein weiteres analytisches Problem [14]. Realproben von verschiedenen Tieren wiesen aufgrund von Metabolisierung, d.h. zuvor abgelaufener biotischer und abiotischer Reaktionen des Toxaphens, signifikante Abweichungen im Chromatogrammmuster untereinander als auch von den eingesetzten Standards auf [11]. Dies führt bei Integration über die ganze Fläche der nicht aufgelösten Chromatogrammpeaks der Kontamination unweigerlich zu Fehlern [14]. Um Toxaphen-Rückstände besser quantifizieren zu können, wurde versucht, durch UV-Bestrahlung von technischem Toxaphen [15] einen Standard darzustellen, der nun ein ähnliches Muster von Toxaphenkongeneren aufwies, wie es bei den untersuchten Tierproben anzutreffen war. Aber auch dieser Standard war nur begrenzt für die Quantifizierung von Toxaphenrückständen anzuwenden.

Erst mit der Isolierung von Einzelsubstanzen aus dem technischen Toxaphen und aus Umweltproben konnten wichtige Fortschritte in der Quantifizierung von Toxaphenrückständen erzielt werden [16,17]. Zweiundzwanzig dieser Einzelverbindungen des

technischen Toxaphens sind seit 1995 als Standard käuflich zu erwerben, so dass es nun für viele Laboratorien möglich ist, Toxaphenrückstände genauer zu quantifizieren.

Die Belastungssituation von Lebensmitteln mit definierten Einzelkomponenten des technischen Toxaphens konnte seit der kommerziellen Einführung des 22- Komponentenstandards so intensiver untersucht werden, wobei besonders viele Rückstands-untersuchungen in aquatischen Lebensformen vorgenommen wurden. Mit der kongenerenspezifischen Analytik wurde festgestellt, dass in vielen marinen Organismen drei Kongenere des Toxaphens vorherrschen. Die Kongenere 26, 50 und 62 (Nummerierung nach Parlar) wurden daher als Indikatorkongenere für die Ermittlung von Toxaphenrückständen in Fischen herangezogen [18], da sie den größten Teil der gefundenen Toxaphenrückstände repräsentieren und zudem ein hohes Anreicherungsvermögen, vor allem in Lebewesen aus aquatischen Systemen besitzen. Da diese Verbindungen sich aus analytischer Sicht für Grenzwertvorschläge eignen, wurden sie in einer validierten Studie untersucht [19].

Aufgrund einer Vielzahl von Untersuchungen konnte für die Toxaphenkontamination in Fischen ein Grenzwert in der Rückstands-Höchstmengenverordnung für diese drei sogenannten „Indikatorverbindungen“ festgelegt werden. Durch die Änderung der Dritten Verordnung der Rückstands-Höchstmengenverordnung vom 07.10.1997 wurde in Fisch ein Grenzwert für die drei Indikatorverbindungen Parlar 26, 50 und 62 von 0,1 mg / kg [ppm], bezogen auf das Frischgewicht, festgelegt [20], wobei die Gehalte der drei Kongenere aufsummiert werden.

Für andere Lebensmittel tierischer Herkunft (Fleisch, Fleischerzeugnisse, tierische Speisefette, Milch und Milcherzeugnisse) und Futtermittel existiert ein solcher Grenzwert basierend auf Indikatorverbindungen noch nicht. Hier gilt als Höchstwert noch immer der Gesamt-Toxaphengehalt von 0,1 mg / kg bezogen auf den Fettanteil [21].

Um aber auch Rückstände für diese Lebensmittel rechtlich beurteilen zu können, existierte der Vorschlag, diese drei Indikatorverbindungen für Fisch auch auf andere Lebensmittel und Futtermittel zu übertragen [22]. Um jedoch einen Grenzwert für tierische Lebensmittel vorschlagen zu können, sind zuvor grundlegende Arbeiten nötig [23].

Neben der toxikologischen Bedeutung ist vor allem die Höhe des Toxaphenrückstandes in Lebensmitteln von entscheidender Wichtigkeit [24]. Sie wird in tierischen Lebensmitteln vor allem über die Futtermittel beeinflusst. Von ebenso großer Bedeutung ist die Frage, welche Kongenere in tierischen Lebensmitteln vorherrschen.

Durch einen Fütterungsversuch, bei dem Legehennen gezielt Futter erhielten, welches mit technischem Toxaphen kontaminiert war, sollte nun eine gesicherte Datengrundlage für den Vorschlag eines Grenzwertes erarbeitet werden.

1.1 Einsatzgebiete, insektizide Eigenschaften und Produktionsdaten von Toxaphen

Toxaphen wurde im Jahre 1945 von der Hercules Powder Cooperation im Wilmington U.S.A. entwickelt und 1947 als US-Patent 2565471 angemeldet. Neben der Hercules Cooperation wurde Toxaphen noch an drei Standorten in den USA produziert [25,26].

Durch die Verbotswelle von DDT und weiteren Organochlorverbindungen und ein Auftreten von Resistenzen einiger Insekten (die gerade Baumwollkulturen extrem schädigten) gegen DDT und Aldrin, wurde der Einsatz von Toxaphen als Ersatzpestizid begünstigt. So nahm z. B. der Gesamtanteil der Organochlorpestizide an allen verbrauchten Insektiziden in den USA von 60% im Jahre 1966 (89.293 pounds) auf 41% im Jahre 1971 (69.873 pounds) ab, während der Toxaphenverbrauch in diesen Jahren leicht zunahm (von 34.605 pounds 1966 auf 37.464 pounds im Jahre 1971). Toxaphen war zu diesem Zeitpunkt in den USA das am meisten gebrauchte Insektizid [28].

Die jährliche Produktion an Toxaphen in den USA lag bis 1977 zwischen 22.700 t und 48.000 t pro Jahr, danach ging der Verbrauch rapide zurück. Im Jahre seines Produktionsverbotes 1982 (Anwendungsverbot 1986) wurden nur noch 5.400 t verbraucht [3]. Neben den USA wurde in der ehemaligen DDR Toxaphen (Handelsname: Melipax) in erheblichen Mengen produziert. Die Zahlen für die Produktion bei Fahlberg-List in Magdeburg beliefen sich für die Jahre 1955 bis 1990 auf ca. 50.000 t. Als weitere Produzenten von Toxaphen oder ähnlichen Produkten werden noch Bulgarien und die Sowjetunion genannt, in denen es wohl noch immer produziert wird; hier liegen jedoch keine Produktionszahlen vor [26]. Desweiteren gehörten Länder wie Frankreich, Südafrika und Israel zu den Produzenten von Toxaphen und toxaphenähnlichen Produkten [25]. Der weltweite Verbrauch von Toxaphen wurde seit dem Jahr seiner Einführung 1946 bis 1974 in der Literatur mit über 409.000 t angegeben [25]. Für den gleichen Zeitraum wurde in anderen Quellen der Gebrauch von

Toxaphen auf 450.000 t geschätzt [27]. Die gesamte Produktion von Toxaphen in den USA von 1945 bis 1983 wird auf ca. 500.000 t geschätzt [2].

Die Zahlen für die weltweite Produktion in den Jahren 1950 bis 1993 wird mit 1.330.000 t angegeben [30,31].

1987 wurde noch in Südamerika, Afrika, Mexiko, Rumänien, Ungarn, Polen, der UDSSR und der Deutschen Demokratischen Republik Toxaphen verwendet, wobei aber in gewissen Ländern schon ein Teilverbot vorlag. 1991 wurde noch in Mexiko, Rumänien, Ungarn, Polen, Indien, einigen Staaten in Afrika, der UDSSR und Ost-Deutschland Toxaphen produziert und eingesetzt [25].

Dass in einigen dieser Länder bis heute noch Toxaphen produziert und eingesetzt wird, kann nicht ausgeschlossen werden. Desweiteren sollen noch größere Mengen an Toxaphen in Lagern vorhanden sein; hier ist es jedoch sehr schwer, Daten zu erhalten [31].

Zu den Hauptanwendern von Toxaphen gehörten die USA, die Sowjetunion, Mexiko, Brasilien, einige Staaten in Afrika, Rumänien, Ungarn, Ost- und Westdeutschland und Polen [30]. Das in der DDR produzierte Melipax ging zu 2/3 in den Export, wobei zu den Hauptabnehmerländern vor allem Kolumbien und Brasilien zählten [26].

Toxaphen zeigt ein sehr breites Wirkungsspektrum, so dass es in den USA für 277 Erzeugnisse aus landwirtschaftlicher Herkunft zur Vernichtung von 167 Insektenarten zugelassen wurde.

Haupteinsatzgebiet war aber vor allem der Baumwollanbau mit 80-90% (USA) des gesamten eingesetzten Toxaphens. Dementsprechend wurde am meisten im Süden und Südosten der USA Toxaphen ausgebracht, da hier die großen Baumwollfelder zu finden sind. Auch in Ländern wie Indien und Nicaragua wurde Toxaphen ebenfalls zu diesem Zwecke eingesetzt. Eine weitere extensive Anwendung fand Toxaphen im Soja - und Erdnußanbau [25].

Bei Viehbeständen wurde es als Ektoparasitikum eingesetzt. Hierfür wurde Toxaphen von Kenia und Tansania aus der ehemaligen DDR bezogen [26].

In den USA wurden 1971 ca. 12 % des gesamten eingesetzten Toxaphens in der Viehhaltung verwendet, wobei der größte Anteil in die Rinderhaltung ging. Auch in diesem Bereich der Anwendung gehörte Toxaphen somit in den USA zu den am meisten gebrauchten Insektiziden [28].

In den USA wurde es auch im Forstschutz und der Veterinärhygiene eingesetzt [27]. Nur in der DDR wurde es als Rodentizid in größeren Mengen eingesetzt [26]. Aufgrund seiner starken Fischtoxizität wurde es in Canada und den USA auch gegen unerwünschte Fische in Flüssen verwendet, um später dort Karpfen und Forellen einzusetzen. Diese Anwendung wurde jedoch wieder aufgegeben, da eine Wiederbesetzung der behandelten Flüsse mit Fischen aufgrund der Persistenz und der Toxizität von Toxaphen nicht mehr möglich war [32]. Dadurch, daß sich Honigbienen gegenüber Toxaphen als resistent erwiesen, konnte Toxaphen auch bei blühenden Kulturen eingesetzt werden, besonders in der DDR war diese Anwendung weitverbreitet [26].

Toxaphen oder toxaphenähnliche Produkte wurden unter folgenden Handelsnamen vertrieben: Agricide Maggot Killer (F), Alltex, Phenatox, Toxakill, Melipax, Chlor Chem T-590, Geniphene, Dark, Huileux, Synthetic 3956, Strobane-T, Toxon 63, Camphechlor, Octachlorocamphene, Polychlorcamphene, Chem-Phene, Cristoxo-90, Motox, Phenacide, Vapotone, Chlorter und Chlorinated Camphene [33,34].

1.2 Synthese von technischem Toxaphen

Ausgangsstoff für die Produktion von Toxaphen ist das α - Pinen, welches aus Kiefernbäumen isoliert wurde. Die Kiefernstämme wurden gewaschen und gehäckselt, anschließend erfolgte die Extraktion des α - Pinen aus den Kiefernchnipseln unter Druck und Hitze mittels Methylisobutylketon. Das Rohharz wurde einer Destillation zur Verfeinerung unterzogen. Das erhaltene α - Pinen wurde nun durch eine katalytische Isomerisierungsreaktion zu Camphen umgewandelt. Als Nebenprodukte entstanden auch Bornylene und einige α - Terpeneole. Die Darstellung des Toxaphens erfolgte durch achtstündiges Einleiten von Chlor in eine 20 %ige Camphenlösung in Tetrachlorkohlenwasserstoff unter UV-Bestrahlung.

Das direkte Einleiten von Chlor in α - Pinen ist ebenfalls bekannt, diese Produktionstechnik wurde von der Tenneco Chemical Inc. in New Jersey angewandt. Das so erhaltene Produkt kam unter der Bezeichnung Stroban in den Handel und war in seiner Zusammensetzung der des Toxaphen sehr ähnlich.

Die nach beiden Verfahren erhaltenen Produkte gelangten ohne weitere Reinigung in den Handel. Toxaphenprodukte waren in vier Formulierungen und als Kombinationspräparat erhältlich [25]. In 817 registrierten Produkten war Toxaphen enthalten [35].

Toxaphen ist ein Gemisch von verschiedenen chlorierten Verbindungen, die in die Reihe der C₁₀-Terpene gehören. Die Einfachheit der Produktion und das Fehlen einer Fraktionierung des Gemisches begünstigte so eine hohe Anzahl an Einzelverbindungen.

1.3 Chemische und physikalische Eigenschaften von technischem Toxaphen

Toxaphen besteht aus einer Vielzahl an verschiedenen Verbindungen. Das mittlere Molekulargewicht von 414 g/mol errechnet sich nach der empirischen Summenformel C₁₀H₁₀Cl₈ für Toxaphen [36]. Toxaphen ist ein wachsartiger Feststoff mit gelbem bis bernsteinfarbenem Aussehen.

Im folgenden sollen einige physikalisch-chemische Eigenschaften des Toxaphens angeführt werden.

Chlorgehalt:	67-69 %	[25]
Dichte:	1,65 g / cm ³	[34,37]
Dampfdruck:	8,92 * 10 ⁻⁴ Pa	[38]
Schmelzbereich:	70-90°C	[25,34]
Wasserlöslichkeit:	0,3 / 0,55 mg / l	[27,39]
	0,4-3,0 mg / l	[3]
n-Octanol / Wasser -Verteilungskoeffizient:	3,3-6,4 (log K _{ow})	[40]
Henry-Konstante:	0,67 Pa * m ³ / mol	[39]

Toxaphen ist in Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Petroläther, Aceton und Hexan gut löslich [7]. In aromatischen Kohlenwasserstoffen ist Toxaphen besser löslich als in aliphatischen [25]. Desweiteren ist Toxaphen gegen Säuren und schwache Basen stabil, auch die Bestrahlung mit UV-Licht oberhalb von 260 nm Wellenlänge zeigt keinen nennenswerten Abbau.

Eine HCl- Eliminierung aus den chlorierten Bornanen ist mit starken Basen, wie KOH oder n-Propylamin, möglich; dabei entstehen Bornene. Eine Reduktion bis hin zu den unchlorierten Bornanen kann mit Triphenylzinnhydrid unter Belichtung (3 Stunden bei 55°C mit einer herkömmlichen Sonnenlampe) vorgenommen werden [7].

Bei Temperaturen im Bereich von 120°C-155°C findet teilweise Zersetzung unter Eliminierung von Chlorkohlenwasserstoff statt [34].

1.4 Isolierung und Nomenklatur von Einzelkomponenten

Einzelverbindungen zur Analytik von Toxaphen sind auf folgenden Wegen zugänglich:

- Isolierung von Einzelkomponenten aus dem technischen Gemisch
- Isolierung von Einzelkomponenten aus Umweltproben
- Gezielte Synthese von Einzelkomponenten

Die in diesem Abschnitt genannten Kongenere (Nummerierung nach Parlar) wurden als Standardverbindungen für die Quantifizierung eingesetzt.

Seit 1973 wurde an der Isolierung und Identifizierung von Einzelkomponenten gearbeitet; mittlerweile liegt die Zahl an isolierten und charakterisierten Verbindungen bei über 60 Kongeneren. Schätzungen zufolge machen diese isolierten Verbindungen einen Anteil von fast 50 % am gesamten technischen Gemisch aus [33].

Der entscheidende Durchbruch für die quantitative Analytik von Toxaphen-Rückständen gelang erst durch die Isolierung und Charakterisierung von 32 Einzelverbindungen aus zwei unterschiedlichen Verfahren, von denen 22 Kongenere nun seit 1995 als Standard kommerziell erhältlich sind.

Auf dem ersten Weg wurden durch photolytische Chlorierung von 2-exo, 10- Dichlorbornan mit variierenden Chlormengen sechs Gemische erhalten, die weiter aufgearbeitet wurden. Aus zwei dieser Gemische konnten mit der Säulenchromatographie fünf Verbindungen abgetrennt und isoliert werden. Hierzu gehören auch die Kongenere Parlar 32, 62 und 69.

Parlar 50 konnte durch Anreicherung auf einer Säule mit einer anschließenden photochemischen Zersetzung von störenden coeluierten Substanzen rein gewonnen werden [41,42,45]. Beim zweiten Syntheseweg wurde ein Standardgemisch eingesetzt, das aus der photochemischen Bestrahlung von technischem Toxaphen entsteht [15]. Aus diesem Gemisch konnten 25 Einzelverbindungen nach einem Flüssigchromatographie-Trennverfahren isoliert werden.

Das photolytierte Gemisch wurde zuerst an einer Kieselgelsäule in 23 Fraktionen vorgetrennt, diese wurden dann an einer präparativen HPLC in weitere 96 Fraktionen getrennt. Durch Auskristallisation aus Petrolether konnten so die Verbindungen die unter Punkt 3.1.2 aufgeführt sind (Ausnahme Parlar 50), rein isoliert werden [44,45].

Neben der Arbeitsgruppe Parlar gelang auch der Gruppe Nikiforov die Isolierung und Identifizierung von mehreren Kongeneren. Neben den zweiundzwanzig Verbindungen wurden in diesen beiden Arbeitsgruppen auch noch zahlreiche weitere Verbindungen isoliert [17,46].

Neben der gezielten Isolierung und Darstellung von Kongeneren wurden aus Umweltproben Verbindungen isoliert und charakterisiert. Die als Indikatorverbindungen vorgeschlagenen Kongenere Parlar 26 und 50 konnten auf diesem Wege aus mehreren Umweltproben isoliert werden.

So konnten diese Verbindungen z.B. aus Walfett isoliert werden [47]. In der Matrix Walfett treten auch andere chlorierte Schadstoffverbindungen auf, die dann noch abgetrennt werden müssen. Die Isolierung der beiden Komponenten gelang auch aus dem Fett einer Robbe, die in der Kieler Bucht tot aufgefunden wurde [48,49]. Durch die Isolierung von Kongeneren des technischen Toxaphens aus Tiermatrix konnte immer wieder gezeigt werden, daß die Verbindungen Parlar 26 und 50 in großen Mengen im Gewebe der Tiere vorkommen [49,50]. Neben den drei Indikatorverbindungen wurden aber auch andere Kongenere sowohl aus Tieren als auch aus dem technischen Produkt Melipax isoliert [51].

Die Isolierung und Identifizierung unterschiedlicher Kongenere ist der Literatur [6,12, 52-62] beschrieben.

Für Toxaphenkongenere wurden in der Vergangenheit keine einheitlichen Nomenklaturen verwendet. Grund hierfür war die uneinheitliche Bezifferung der Kohlenstoffatome des Bornangrundgerüsts durch einige Autoren. Vor allem die Frage, über welchem C-Atom die Kohlenstoffatome mit der Bezeichnung C₈ bzw. C₉ Atome liegen sollten, wurde

unterschiedlich geführt [63]. Nach IUPAC-Nomenklatur soll das C₈-Atom über dem C₅-Atom liegen. Nach [63,64] erfolgt die Durchzählung der Kohlenstoff-Atome der in Abbildung 1 aufgeführten Weise.

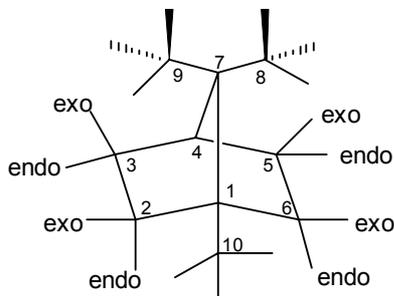


Abbildung 1: Struktur der Bornangrundgerüsts mit Nummerierung nach IUPAC

Für die Toxaphenkongenerere ergeben sich aufgrund der IUPAC – Nomenklatur sehr lange, unhandliche Bezeichnungen. Um aber Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurden Abkürzungen für jedes Kongenerere manifestiert. Durch die Vielzahl an Arbeitsgruppen ergaben sich jedoch mehrere Kürzel, so daß dieses Verfahren mehr zur Verwirrung als zur Vereinfachung beigetragen hat.

Die in dieser Arbeit verwendeten Kürzel basieren auf der Durchzählung von Peaks des CB-Standards (bestrahltes Toxaphen) [65, 78].

Für eine andere Vereinfachung der IUPAC- Nomenklatur anstelle der Durchnummerierung, die nach der Arbeitsgruppe von Prof. Parlar benannt ist, sprechen sich aber weitere Autoren aus. Mit verschiedenen Kürzeln soll auch die Möglichkeit bestehen, neu isolierte Verbindungen in das bestehende System mit aufzunehmen.

An dem Kongener Parlar 50 (\pm)-2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8b,8c,9c,10a,10c-Nonachlorbornan sollen beispielhaft verschiedene Kurzbezeichnungen aufgeführt werden.

Die von Nikiforov kreierte Bezeichnung für dieses Kongener lautet NCB 4925. Die Ermittlung dieser Bezeichnung basiert auf einem binären Code, welcher auf durchgezählte substituierbaren Wasserstoffatomen basiert. Wird ein Wasserstoffatom durch ein Chloratom

ersetzt, wird die 1 vergeben, bei Nicht- Substitution wird eine 0 vergeben. Da in dem Bornangerüst 13 Wasserstoffatom theoretisch substituiert werden können, ergibt sich ein 13 stelliger Code, der dann in ein dezimales System umgewandelt wird [46]. Mit dieser Methode können jedoch zur Zeit nur Bornane erfaßt werden.

Die Arbeitsgruppe um Vetter vergibt für das Kongener Parlar 50 die Bezeichnung B9-1679 [66]. Die Abkürzungen basieren auf einem Computerprogramm, das beim Autor oder über das Internet bezogen werden kann. Der Buchstabe gibt das Grundgerüst des betreffenden Moleküls wieder, B steht z.B für Bornan, die erste Nummer in der Bezeichnung nennt den Chlorierungsgrad, während die anderen Nummern die exakte Positionierung der Chloratome widerspiegeln.

Um die Arbeitsgruppe von Wester existiert eine weitere Form der Abkürzung [63,67]. Für das Kongener Parlar 50 wird das Kürzel B [12012]-(212) verwendet. Grundlage der Codierung sind Kohlenstoffatome. Da nur 8 Kohlenstoffatome mit Chlor substituiert werden, ergibt sich somit eine achtstelliger Code. Für die Positionierung der Chloratome werden entsprechende Codes von 0-3 vergeben. Beispiel: Cl in endo- Stellung, kein Cl in exo-Stellung ergibt den Code 1.

Jede vorgestellte Abkürzung bietet Vor- und Nachteile. Da in dieser Arbeit mit dem 22 Komponenten-Standard (Nummerierung nach Parlar) gearbeitet wurde, soll auch deren Abkürzung weiter verwandt werden.

1.5 Analytik von Toxaphen

Für eine deutliche Verbesserung der Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Toxaphenanalytik waren vor allem zwei Entwicklungen verantwortlich.

Die erste Verbesserung war der enorme Fortschritt in der modernen Gaschromatographie durch die Entwicklung von leistungsfähigen Kapillarsäulen. Anfang der 50er Jahre wurde Toxaphen noch über seinen Chlorgehalt bestimmt. In einigen frühen Fütterungsstudien wurde so z.B. der anorganische Chloridgehalt der untersuchten Proben mit Silberionen titrimetrisch bestimmt [69,70]. Eine colorimetrische Bestimmungstechnik, in der Toxaphen mit Diphenylamin in Anwesenheit von $ZnCl_2$ ein grünblaues Reaktionsprodukt lieferte, welches dann spektralphotometrisch bestimmt wurde [71], konnte sich wegen häufiger Anwesenheit von Interferenzen nicht durchsetzen [41]. Erst durch die Entwicklungen in der Gaschromatographie konnten Toxaphenrückstände besser verifiziert werden, aber das Fehlen von definierten Einzelverbindungen als Standardsubstanzen bereitete einer exakten Quantifizierung weiterhin enorme Schwierigkeiten. Die seit 1995 kommerziell erhältlichen Standardverbindungen definierter Struktur bildeten den zweiten Durchbruch in der Toxaphenanalytik.

Ein häufig für Pestizidrückstände und auch speziell für die Toxaphenanalytik eingesetzter Detektor ist der ECD (Electron Capture Detektor). Vor der Detektion sind für eine Analytik mittels ECD aufwendige Reinigungs- und Separationsschritte zur Abtrennung von Interferenzen notwendig. Für alle GC-Detektionmethoden ist eine Abtrennung der Matrix notwendig. Da aber der ECD kein sehr selektiver Detektor ist, neben Halogenatomen, wie Chlor, Brom, Jod und Fluor, besitzen Nitroverbindungen oder Phthalate einen guten Response, müssen Substanzen, die bei der Detektion ebenfalls ein Signal liefern, abgetrennt werden. Eine Minimierung der Interferenzen durch Photodehalogenierung und Nitrierung in der Toxaphenanalytik hat sich nicht durchsetzen können [10]. Für die Abtrennung von Störsubstanzen, insbesondere anderer Organochlorverbindungen wie den PCB, hat sich in der analytischen Praxis besonders die Mini-Kieselgelsäule etabliert [72,73]. Sie beruht auf der Methode von Specht und Tilkes [74] und hat auch in der amtlichen Lebensmittelüberwachung als §35-Methode Einzug gefunden [75]. Bei der Abtrennung des Toxaphens von den PCB mit der Mini-Kieselgelsäule ergeben sich zwei Fraktionen, die beide analysiert werden müssen. Das Kongener Parlar 26 findet sich in beiden Fraktionen, so daß beide Eluate im Rahmen einer Toxaphenbestimmung untersucht

werden müssen, wodurch sich ein erheblicher zeitlicher Mehrbedarf ergibt. Um alle Toxaphenkongeneren in einer Fraktion analysieren zu können und die besprochenen Interferenzen auszuschließen, wurde eine deutlich größere Kieselgelsäule entwickelt [76].

Neben der Detektion mittels ECD werden in der Analytik von Toxaphen Massenspektrometer (MS) als Detektoren eingesetzt, wobei die Negative Chemische Ionisationstechnik (NCI) zur Bildung von Ionen zu der am weitesten verbreiteten MS-Methode gehört [77]. Bei der massenspektrometrischen Bestimmung werden meist nur ausgewählte charakteristische Fragmente beobachtet und quantifiziert. Im Falle der Ionenbildung durch NCI sind dies Ionen mit der Masse m/z 340, 341, 342, 343, 375, 377, 411, 413, 447 und 449 [77, 78,79]. Nachteil der chemischen Ionisation sind schwankende und stark unterschiedliche Responsefaktoren der einzelnen Toxaphenkongeneren [43]. Zudem können bei Anwesenheit von Sauerstoff in der Ionenquelle $[M-Cl+O]$ - Fragmente aus PCB-Kongeneren entstehen, die eine massenspektrometrische Analytik der Toxaphenverbindungen stören können [80]. Desweiteren können einige Kongeneren, so z.B. Parlar 62, nach Negative Chemischer Ionisation nicht mit ausreichender Empfindlichkeit für eine quantitative Bestimmung gemessen werden [77, 81]. Durch eine Splitless-Druckpuls-Injektion lassen sich die Responseeigenschaften am MS-Detektor dieses Kongeners jedoch verbessern [82,83]. Ein genereller Vorteil der chemischen Ionisation ist aber, dass starke Fragmentierungen vermieden werden können [84] und somit Substanzen mit deutlich besseren Nachweisgrenzen für das Molekülion und damit sicheren Informationen über das Molekulargewicht detektiert werden können.

Neben der chemischen Ionisation wird die Elektronenionisation (EI) in Verbindung mit einem hochauflösenden Massenspektrometer häufig in der Toxaphenanalytik eingesetzt. Vorteil dieser Methode ist, dass bei der Auswahl eines geeigneten Fragmentions die Toxaphenrückstände auf einer Fragmentionenspur zu detektieren sind. Vorteil der Hochauflösung ist eine sehr selektive Messung der Toxaphenverbindungen und damit eine weitgehend interferenzfreie Analytik [77, 85, 86]. Neben der Bestimmung mit hochauflösender Massenspektrometrie kann noch die Bestimmung von Toxaphen mittels Iontrap MS/MS als sehr selektive Methode genannt werden [87].

Aber auch beim Einsatz der hochauflösenden Massenspektrometrie können Interferenzen von ausgewählten Toxaphenkongeneren mit unbekanntem Toxaphenkongeneren nicht ausgeschlossen werden, da für eine Trennung der Substanzgemische der

Gaschromatograph zuständig ist. Zur Minimierung von Coelutionen bzw. zur Charakterisierung von Coelutionen kann daher die multidimensionale Gaschromatographie herangezogen werden.

Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von De Boer und De Geus zeigten, dass für verschiedene Kongenere bei Anwendung der multidimensionalen Gaschromatographie einige Verbindungen coeluiieren; so wurden z. B. für das Kongener Parlar 69 in technischem Toxaphen 4 bis 12 coeluiierende Peaks nachgewiesen. In Umweltproben wurden für die drei Indikatorverbindungen Parlar 26, 50 und 62 je nach Säulenkombination drei bis zehn unbekannte Peaks unter dem jeweiligen identifizierten Kongener nachgewiesen [88,89,90]. Hierzu ist aber anzumerken, dass es sich bei den coeluiierenden Substanzen nicht unbedingt nur um Toxaphenkongenere handeln muss, da die coeluiierenden Peaks nicht weiter untersucht wurden und ein ECD zur Bestimmung verwendet wurde.

Neuerdings rückt in der Toxaphenanalytik immer mehr die enantioselektive Bestimmung von Toxaphenkongeneren in den Vordergrund. Ein Review über diese Analyse ist unter [91] erschienen. Um hier jedoch eindeutige Aussagen treffen zu können, sind toxikologische Daten über Enantiomere notwendig. Da diese wohl sehr lange noch nicht in ausreichendem Maß zur Verfügung stehen werden, soll an dieser Stelle auf den Informationsgehalt dieser Analytik nicht näher eingegangen werden.

Abschließend ist noch anzumerken, daß für die Extraktion von Toxaphen neben den bewährten Standardmethoden auch eine neue Extraktionstechnik (Accelerated Solvent Extraktion ASE) eingesetzt werden kann [92]. Hierüber wird in einem späteren Punkt noch eingegangen (Punkt 6.1.1)

2. Zielsetzung

Vor der Isolierung von Toxapheneinzelsubstanzen wurde in der Rückstands-Höchstmengenverordnung vom 01.09.1994 die zulässige Höchstmenge an Toxaphen als Gesamt-Toxaphen festgelegt. Die zulässige Rückstands-Höchstmenge wurde auf 0,1 mg / kg bezogen auf Fett in allen tierischen Lebensmitteln (Fleisch, Fleischerzeugnisse, tierische Speisefette, Milch und Milcherzeugnisse) limitiert [93].

Wegen der geringen Sicherheit der quantitativen Toxaphenanalytik sah die Praxis der Lebensmittelüberwachung auch bei starker Belastung der Lebensmittel keine Beanstandung vor [94].

Mit Hilfe der neuen Standardverbindungen wurde die Belastungssituation der Lebensmittel mit Toxaphen ab 1995 deutlicher, wobei besonders viele Untersuchungen an lebensmittel-liefernden Tieren aus der aquatischen Nahrungskette vorgenommen wurden. Aufgrund der nun ausreichend genauen Kenntnisse über die Höhe der Rückstände an diesen Verbindungen in den marinen Organismen wurde die Rückstands-Höchstmengenverordnung geändert. Durch die Dritte Verordnung zur Änderung der Rückstands-Höchstmengenverordnung vom 07.10.1997 wurde für Fisch und Fischerzeugnisse ein Höchstwert von 0,1 mg / kg Frischmasse als Summe für die drei Indikator-Toxaphenkongere (Parlar 26, 50 und 62) festgelegt [20].

Für andere Lebensmittel tierischer Herkunft (Fleisch, Fleischerzeugnisse, tierische Speisefette, Milch und Milcherzeugnisse) und Futtermittel existiert ein solcher Grenzwert, basierend auf Indikatorverbindungen, noch nicht; hier gilt noch immer ein Höchstgehalt von 0,1 mg Gesamt-Toxaphen / kg Fett.

Aussagefähige Untersuchungsprojekte über die Belastung der terrestrischen Nahrungskette mit Einzelverbindungen des technischen Toxaphens fehlten bislang.

Gerade dieses fehlende Datenmaterial macht es äußerst schwierig, Toxaphen-Höchstwerte für Lebensmittel tierischer Herkunft auf Basis von Indikatorverbindungen festzulegen.

Desweiteren fehlen wichtige Daten zum Übergang (Carry over) von Toxaphen aus dem Futter in den Tierkörper. Gerade solche Untersuchungen sind es jedoch, die zur Festlegung eines Grenzwertes für Lebensmittel und Futtermittel unverzichtbar sind.

Neben der toxikologischen Risikoabschätzung ist vor allem die Höhe des Toxaphenrückstandes in Lebensmitteln von entscheidender Wichtigkeit [95]. Sie wird in den vom Tier stammenden Lebensmitteln entscheidend über die Futtermittel beeinflusst,

da deren Bestandteile, wie beispielsweise Fischmehl und Fischöl, mit Toxaphen verunreinigt sein können. Zudem können andere Komponenten des Futtermittels mit technischem Toxaphen verunreinigt sein, wenn diese aus Ländern stammen, die Toxaphen noch immer zur Schädlingsbekämpfung einsetzen.

Mit der vorliegenden Arbeit sollen nun grundlegende Daten zum Übergang von Toxaphen aus dem Futter in den Tierkörper erarbeitet werden. Diese Daten sollen helfen, einen Höchstwert für einzelne Toxaphenkongenere im Futtermittel und im vom Tier stammenden Lebensmittel festlegen zu können.

Zu diesem Zweck wurde in Zusammenarbeit mit der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft im Institut für Kleintierzucht in Celle ein Fütterungsversuch mit Legehennen durchgeführt. Mit dieser Studie sollten folgende Punkte geklärt werden:

- Welche Kongenere des technischen Toxaphens reichern sich am stärksten in den Hühnern und Eiern an (Qualitative und quantitative Analysen sollen unter Zuhilfenahme eines Standardgemisches mit 22 Einzelverbindungen durchgeführt werden)
- Wie hoch ist das Anreicherungspotential dieser Verbindungen in verschiedenen Geweben der Hühner sowie im Ei
- Welche Gewebekonzentrationskurven ergeben sich für die anreicherungsfähigen Kongenere im Gewebe
- Erstellung einer Stoff-Bilanzierung zum Verbleib des unmetabolisierten Toxaphens
- Ermittlung der biologischen Halbwertszeiten für die anreicherungsfähigen Kongenere
- Ableitung eines Vorschlags für einen Höchstwert in Hühnerfutter, in Hühnern sowie deren Eiern.
- Ableitung eines Vorschlags zu einem tolerierbaren Toxaphengehalt im Alleinfutter für Legehennen

Neben der Fütterungsstudie sollen zahlreiche Proben von landwirtschaftlichen Nutztieren, sowie Proben von frei lebenden Tieren auf Toxaphen untersucht werden. Hintergrund hierfür ist eine erste Einschätzung einer möglichen Belastung vom Tier stammender Lebensmittel.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte und Chemikalien

3.1.1 Chemikalien

Die im Folgenden angeführten und für diese Arbeit eingesetzten Chemikalien besaßen unterschiedliche Reihungsgrade und Qualitäten. Da teilweise von den Herstellern unterschiedliche Bezeichnungen für analoge Qualitätsstufen verwendet werden, wurden nachfolgend die herstellerspezifischen Qualitätsbezeichnungen mit angegeben.

n-Hexan nanograd (für die Rückstandsanalyse), Fa. Promochem

Dichlormethan Pestanal, Fa. Riedel de Haën

Aceton reinst (für Reinigungszwecke), Fa. Merck

Hexan reinst (für Reinigungszwecke), Fa. Merck

Toluol nanograd (für die Rückstandsanalyse), Fa. Promochem

Isooktan SupraSolv, Fa. Merck

Natriumsulfat wasserfrei p.a., Fa. Merck

(Vor der Verwendung 5 Stunden lang bei 650°C erhitzt, anschließende Aufbewahrung im Exsikkator.)

Seesand mit Säure gereinigt p.a., Fa. Merck

(Vor der Verwendung 5 Stunden bei 600°C erhitzt, anschließende Aufbewahrung im Exsikkator.)

Florisil 60-100 mesh ASTM, Fa. Riedel de Haën

(Vor der Verwendung über Nacht auf 550°C erhitzt, anschließende Aufbewahrung im Exsikkator.

Vor dem Gebrauch wurde das Florisil 5 Stunden auf 130°C erhitzt. Nach Abkühlung mit 3 Gew % dest. Wasser versetzt, 20 Minuten geschüttelt und 10-12 Stunden verschlossen aufbewahrt.)

Kieselgel 60, 70-230 mesh, Fa Merck

(Vor der Verwendung 5 Stunden auf 130°C erhitzt und danach im Exsikkator aufbewahrt. Für die weitere Verwendung wurde das Kieselgel anschließend tropfenweise mit 1,5 Gew.% dest. Wasser versetzt, 5 Minuten intensiv und danach

2 Stunden auf einer Schüttelmaschine geschüttelt. Die Aufbewahrung erfolgt in einem verschlossenen Behälter im Exsikkator.)

Faltenfilter Blauband, Ø 24cm 612 ¼, Fa. Machery Nagel

Tickopur R 36, (Reinigungskonzentrat für Glasgeräte im Ultraschallbad) Fa. Stamm

3.1.2 Standardverbindungen für die Analytik

Standard Mix mit 22 Toxaphenkongeneren der Fa. Dr. Ehrenstorfer. Er beinhaltet folgende Einzelverbindungen.

Parlar Nr.	IUPAC Name
11	(±)-2,2,3-exo-Trichlor,5,5-bis(chlormethyl),6-(E)-chlormethylen-8,9,10-trinorbornan
12	(±)-5-exo,6-endo-Dichlor,2-endo-chlormethyl,3-(E)-chlormethylen-8,9,10-trinorbornan
15	(±)-5-exo,6-endo,7-anti-Trichlor,2.2-bis(chlormethyl),3-(E)-chlormethylen-8,9,10-trinorbornan
21	(±)-2,2,5,5,9c,10a,10b-Heptachlorbornan
25	(±)-2,2,3-exo,Trichlor,5-endo-chlormethyl,6-(E)-chlormethylen-5-dichlormethyl,8,9,10-trinorbornan
26	(±)-2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8b,8c,10a,10c-Octachlorbornan
31	(±)-2,2,3-exo-Trichlor,6-(E)-chlormethylen,5,5-bis(dichlormethyl),8,9,10-trinorbornan
32	(±)-2,2,5-endo,6-exo,8c,9b,10a-Heptachlorbornan
38	(±)-2,2,5,5,9b,9c,10a,10b-Octachlorbornan
39	(±)-2,2,3-exo,5-endo,6-exo,8c,9b,10a-Octachlorbornan
40	(±)-2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8b,9c,10a,10c-Octachlorbornan
41	(±)-2-exo,3-endo,5-exo,8c,9b,9c,10a,10b-Octachlorbornan
42a	(±)-2,2,5-endo,6-exo,8b,8c,9c,10a-Octachlorbornan
42b	(±)-2,2,5-endo,6-exo,8c,9b,9c,10a-Octachlorbornan

44	(±)-2-exo,5,5,8c,9b,9c,10a,10b-Octachlorbornan
50	(±)-2-endo,3-exo,5-endo,6-exo,8b,8c,9c,10a,10c-Nonachlorbornan
51	(±)-2,2,5,5,8c,9b,10a,10b-Octachlorbornan
56	(±)-2,2,5-endo,6-exo,8b,8c,9c,10a,10b-Nonachlorbornan
58	(±)-2,2,3-exo,5,5,8c,9b,10a,10b-Nonachlorcamphen
59	(±)-2,2,5-endo,6-exo,8c,9b,9c,10a,10b-Nonachlorbornan
62	(±)-2,2,5,5,8c,9b,9c,10a,10b-Nonachlorbornan
63	(±)-2-exo,3-endo,5-exo,6-exo,8b,8c,9c,10a,10c-Nonachlorbornan
69	(±)-2,2,5,5,6-exo,8c,9b,9c,10a,10b-Decachlorbornan

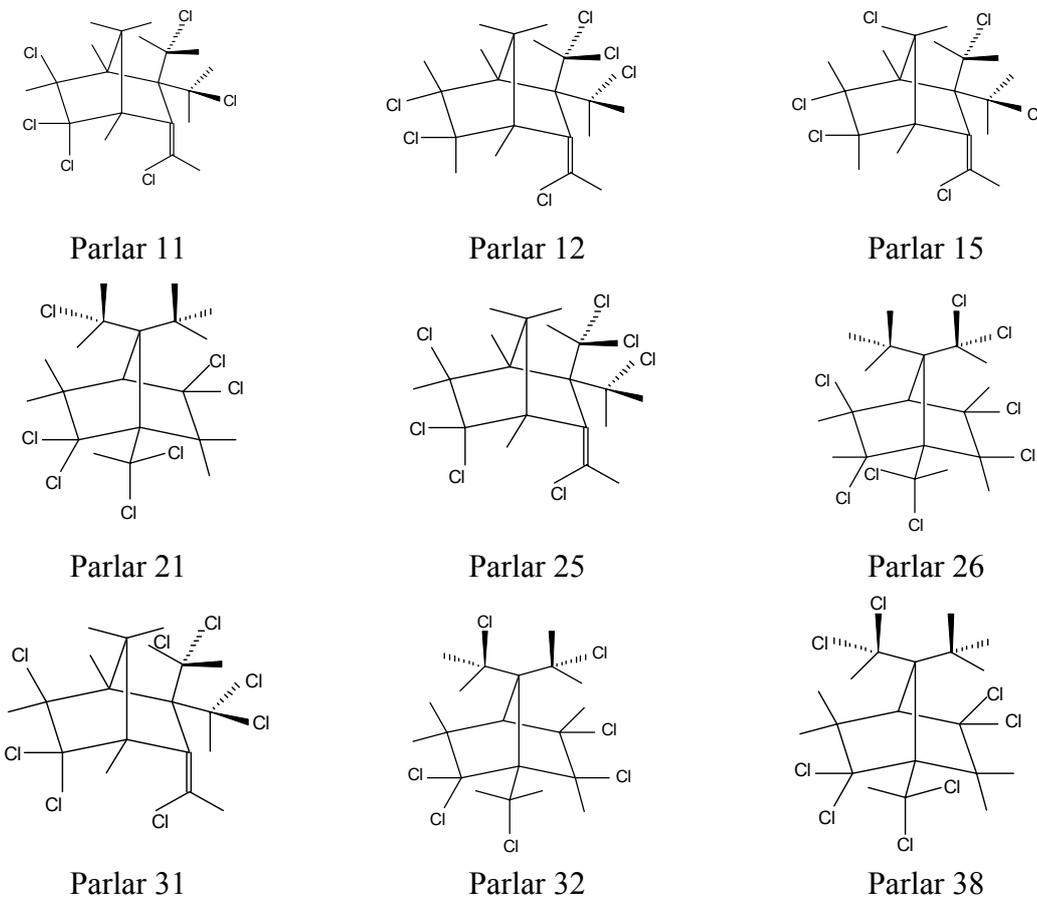


Abbildung 2: Strukturen der im Standardmix enthaltenen Kongeneren

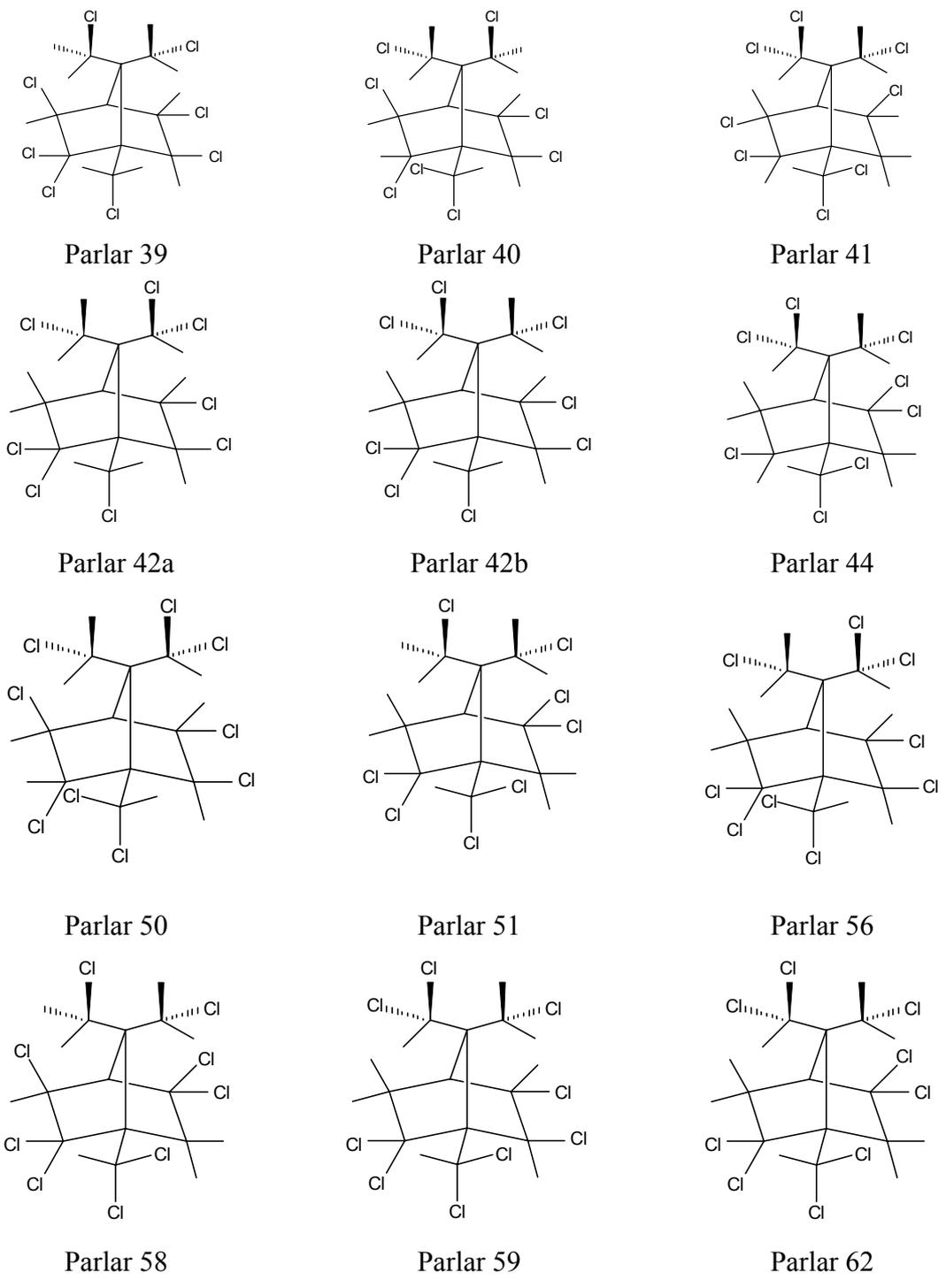


Abbildung 2 Fortsetzung: Strukturen der im Standardmix enthaltenen Kongeneren

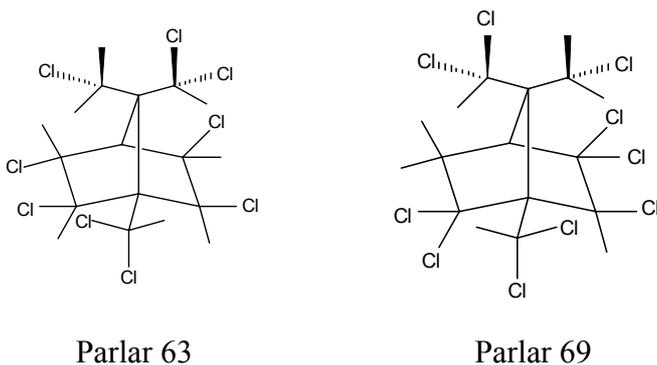


Abbildung 2 Fortsetzung: Strukturen der im Standardmix enthaltenen Kongeneren

Interne und Externe Quantifizierungsstandards:

$^{13}\text{C}_{12}$ - markiertes PCB 77 Fa. Promochem (3,3',4,4'-Tetrachlorbiphenyl)

$^{13}\text{C}_{12}$ - markiertes PCB 81 Fa. Promochem (3,4,4',5-Tetrachlorbiphenyl)

$^{13}\text{C}_{12}$ - markiertes PCB 169 Fa. Promochem (3,3',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl)

3.1.3 Geräte

3.1.3.1 Glasgeräte

Extraktionsapparatur nach Soxhlet: bestehend aus Rundkolben (250ml), Extraktionsaufsatz (100 ml), Rückflusskühler und Wasserbad (Heizquelle)

Rundkolben 500 ml, 250 ml und 100 ml

Chromatographiesäule, 22 mm i.D, 25 cm lang mit 250 ml Reservoir, mit Teflonküken

Chromatographiesäule, 7 mm i.D., Länge 23 cm mit ausgezogenem Auslauf

Becherglas 250 ml mit Glasstab

Pasteurpipetten

Enzympipetten 1ml

Pipetten 10ml

Vor dem erstmaligen Gebrauch und nach routinemäßigen Einsatz wurden die Glasgeräte nach einer Handwäsche einem zusätzlichen Reinigungsschritt im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 1050 CH, Fa. Bandelin) bei 70°C mit einem Reinigungskonzentrat Tickopur 36 unterzogen. Danach erfolgte eine Spülung mit Aceton reinst und n-Hexan reinst. Anschließend wurden die Glasgeräte im Trockenschrank über Nacht auf 300°C erhitzt.

3.1.3.2 Analytische und Labor-Geräte

Stickstoffabblasgerät:	TCS-Trockentemperier-System, Fa. Barkey
Rotationsverdampfer:	Rotavapor EL 131, Fa. Büchi, mit Vakuumpumpe und Kühlung (Typus Paralaqua), Fa. Van der Heijden
Gaschromatograph:	HP 5890 Series II; Säule DB 5 (30m x 0,25 mm x 0,25µm) von Fa. J+W, (die Parameter der im Versuchsteil Nr. 6 verwendeten Säulen werden dort mitaufgeführt)
Massenspektrometer:	VG Autospec, Software: Session V2. 1C

3.2 Arbeitsvorschriften zur Bestimmung von Toxaphen

Extraktion von Toxaphen aus den Proben

Die Extraktion des Toxaphens aus den Proben erfolgte mit der Soxhlet-Methode. In einen 250 ml Rundkolben wurden mehrere Siedeperlen gegeben. Anschließend wurde der Rundkolben gewogen und mit 150 ml n-Hexan nanograd (zur Rückstandsanalyse) befüllt. Alle Proben aus dem Fütterungsversuch und diverse Umweltproben wurden jeweils in ein 250 ml Becherglas eingewogen und mit Seesand und Natriumsulfat intensiv vermischt. Dabei wurden folgende Mengen (in Tabelle 1 zusammengestellt) für die Soxhletextraktion eingewogen.

Tabelle 1: Einwaage von Probenmaterialien mit Zusatz an wasserfreiem Natriumsulfat und Seesand für die sich anschließende Soxhletextraktion

Probe	Probeneinwaage [g]	Natriumsulfat (wasserfrei) [g]	Seesand [g]
Unterhautfett	0,5	Ca. 15	10
Muskelfleisch	5-7	Ca. 40	10
Eidotter	3	Ca. 25	10
Eiklar	10	Ca. 50	10
Niere, Leber	3-5	ca. 30	10
Kot	5-7	ca. 40	10
Haut	3-5	ca. 20	10
Magere Fleischproben	10	ca. 50	10
Fette Fleischproben	2-4	ca. 30	10
Fettproben	1-2	ca. 15	10

Die Zugabe an wasserfreiem Natriumsulfat erfolgt zur Bindung des Wassers in den verschiedenen Probenmatrizes. Die angeführten Einwaagen für Natriumsulfat haben also weitgehend Richtwertcharakter und werden deshalb mit ca.- Angaben versehen. Exaktere Werte sind nicht anzugeben, da der Wassergehalt in den unterschiedlichen Probenmatrizes in gewissen Grenzen variieren kann. Die Zugabe an Natriumsulfat erfolgte deshalb solange, bis sich bei Verreiben ein trockenes, rieselfähiges Mahlgutpulver ergab.

Dieses Pulver wurde dann quantitativ in einen Faltenfilter, der als Soxhlet-Extraktionshülse fungierte, überführt. Becherglas und Glasstab wurden mit einem Wattebausch sorgfältig abgewischt. Dieser Glaswattebausch wurde dann zur Mitextraktion in den Faltenfilter gegeben. Anschließend wurde der Faltenfilter in den Soxhlet-Aufsatz überführt. Abschließend wurde 1 ml $^{13}\text{C}_{12}$ -markiertes PCB 77 (12,18 ng / ml) als interner Standard dazugegeben und die Proben sechs Stunden im Wasserbad unter Rückfluß des Hexans extrahiert. Nach der Extraktion wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer vorsichtig abgezogen (T_{Bed} 50°C, ca. 400 mbar). Die Rundkolben wurden über Nacht im Exsikkator aufbewahrt und am nächsten Morgen zurückgewogen, um die extrahierte „Fettmenge“ zu bestimmen.

Clean-up der Proben

Aus dem nach der Soxhlet-Extraktion erhaltenen Rückstand wurde das Fett mit Hilfe einer Florisil-Säule abgetrennt. Die Proben aus dem Carry over Legehennenversuch konnten ohne weiteres Clean-up direkt vermessen werden, während andere Umweltproben, die zusätzlich mit einem GC/ECD System vermessen wurden, hauptsächlich deswegen einer Nachreinigung mit Kieselgel bedurften.

Florisil-Säule: In eine Chromatographiesäule (22 mm i.D, am Ende mit Glaswatte verschlossen) wurden 100 ml n-Hexan gefüllt. Anschließend wurden 25 g desaktiviertes Florisil eingeschlämmt. Nach dem Absetzen der Säulenfüllung wurde das Lösungsmittel bis auf 1 cm Überstand abgelassen. Der aus der Soxhlet-Extraktion erhaltene Rückstand (bis ca. 1g) wurde in 10 ml n-Hexan aufgenommen und quantitativ auf die Florisil-Säule aufgebracht. Der Rundkolben wurde dabei mehrmals mit kleinen Portionen n-Hexan (3 x 2 ml) gespült, wobei das Hexan aus den Spülschritten ebenfalls auf die Florisil-Säule gegeben wurde. Anschließend wurde mit 300 ml eines n-Hexan / Dichlormethan-Gemisches (v,v 80+20) eluiert. Die Tropfgeschwindigkeit betrug dabei ca. 5 ml / min. Das Eluat wurde in einem 500ml Rundkolben aufgefangen.

Nach der Elution wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer bei 50°C und ca. 400 mbar bis auf etwa 1ml eingengt. Bei den Proben aus dem Fütterungsversuch wurde der Rundkolben unverschlossen im Abzug bei Raumtemperatur stengelassen, bis der letzte ml verdunstet war. Danach wurde 1ml einer Standardlösung mit ¹³C₁₂- markiertem PCB 81 (in Isooktan 11,94 ng / ml) in den Rundkolben gegeben. Die hierin gelösten Rückstände wurden mit einer Pasteurpipette in Probengläschen überführt und waren dann messbereit. Zur quantitativen Bestimmung, je nach zu erwartendem Toxaphengehalt, wurden einige Proben noch mit Stickstoff (Qualität 4,8) in dem TCS-Trockentemperier-System aufkonzentriert.

Für die Umweltproben wurde noch eine Nachreinigung mit einer Mini-Kieselgelsäule durchgeführt. Dies war erforderlich, da diese Proben auch mittels GC / ECD gemessen wurden und es ohne diese Nachreinigung mit weiterer Abtrennung von Störsubstanzen zu Interferenzen in den Gaschromatogrammen kommt, die eine zuverlässige Quantifizierung unmöglich machen.

Mini-Kieselgelsäule: In die Chromatographiesäule (i.D. 7 mm) wurden 1 g desaktiviertes Kieselgel und dann eine Spatelspitze trockenes Natriumsulfat gegeben und mit 5 ml n-Hexan gewaschen. Anschließend wurde der nach der Florisil-Säule auf 1 ml eingeeengte Extrakt auf die Mini-Kieselgelsäule gegeben, wobei der Rundkolben noch einmal mit 1 ml n-Hexan nachgespült wurde. Diese Spüllösung wurde ebenfalls auf die Säule aufgegeben. Nachdem der Hexan-Flüssigkeitsspiegel das Niveau der Säulenfüllung erreicht hatte, wurde das Eluat in einem 100 ml Rundkolben aufgefangen. Anschließend wurde mit 8 ml eines Hexan / Toluol-Gemisches (v,v / 63+35) eluiert, wobei mit den ersten 2 ml der 500 ml Rundkolben nochmals gespült wurde. Dann wurden die zu untersuchenden Komponenten mit 8 ml Toluol von der Säule eluiert.

In Abweichung zur Analysenvorschrift von [72] wurden beide Elutionsvolumina nicht getrennt aufgefangen, sondern gleich vereint.

Das Eluat wurde im Rotationsverdampfer bei 50°C und ca.300 mbar bis auf 1ml eingeeengt, und blieb dann im unverschlossenen Rundkolben bei Raumtemperatur im Abzug stehen. Der trockene Rückstand wurde anschließend mit 1 ml des ¹³C₁₂- markierten PCB 81 in Isooktan aufgenommen. Die Probenextrakte konnten dann mit einer Pasteurpipette in ein Probenvial überführt werden. Die GC/ECD-Bestimmungen erfolgten aus diesen Meßlösungen.

Für die massenspektrometrische Bestimmung wurden alle Proben zur Verbesserung der Nachweisgrenzen im Stickstoffstrom weiter eingeeengt.

Messung und Quantifizierung der Proben mittels GC/ HRMS

GC:

Trägergas:	Helium
Injektor:	240°C
Injektion:	1-2 µl, 1,0 min splitlos
Trennsäule:	DB 5 von J+W, (30m x 0,25 mm x 0,25µm)
Temperaturprogramm:	70°C (2min) - 225°C (22,5°C/min) - 230°C (1°C/min, 5 min) - 320°C (20°C/min, 1,5min) aus [96]

HRMS:

Ionenquellen Temperatur:	250°C
Interface Temperatur:	250°C
Ionisierung:	Elektronenstoßionisation (EI)
Electron Energy, Trap Current:	35 eV, 300µA
Eichsubstanz:	FC 43, Perfluorotributylamine, (Ultra Scientific)
Fokussierung:	manuell
Auflösung:	ca. 10.000
Modus:	Single Ion Registration (SIR)

Tabelle 2: Registrierte Fragmentationen und Beobachtungszeiten für das verwendetet HRMS (VG-Autospec)

Masse [lfd. Nr.]	Fragmention [m/z]	Beobachtungszeit ms	Delaytime Ms
1	158.9769	120	20
2	160.9739	120	10
3	162.0872	120	10
4	168.9888	50	10
5	168.9888	40	10

Masse 1 aus Tabelle 2 diene zur Quantifizierung

Masse 2 dient mit Masse 1 der Identifizierung, d.h. der Absicherung des richtigen Isotopenverhältnisses im Fragmentioncluster. Für eine positive Detektion von Toxaphenrückständen muss sich hier das Isotopenverhältnis der beiden Ionen aus dem Fragmention des Dichlortropyliumions in einem Verhältnis von 100 % [m/z 158.9769] zu 64 % [m/z 160,9739] widerspiegeln. Treten bei den Peakflächen von Rückständen Abweichungen von mehr als $\pm 15\%$ zu diesem Verhältnis auf, können diese Peaks nicht als positiv nachgewiesenes Toxaphenkongener betrachtet werden und wurden deshalb auch nicht quantifiziert.

Masse 3 aus Tabelle 2: Fragmentionsspur des internen Standards zur Ermittlung der Responsefaktoren

Masse 4 und 5: Fragmentionspur FC 43 zur analytischen Qualitätssicherung (Kontrolle der Masseneichung)

3.3 Fütterungsversuch

Der Fütterungsversuch wurde mit insgesamt 87 Legehennen der Herkunft LSL an der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) im Institut für Kleintierzucht in Celle unter der Leitung von Dr. Karl-Heinz Ueberschär durchgeführt.

Zu Beginn des Versuches am 06.05.1996 hatten alle Hennen ein Lebensalter von 22 Wochen erreicht. Ab dem 06.05.96 erhielten die Tiere Futter, das mit 0,1 / 0,5 / 1,0 bzw. 5,0 mg / kg technischem Toxaphen kontaminiert war. Zudem wurden zwei Kontrollgruppen mit toxaphenfreiem Futter gefüttert.

Der Fütterungsversuch gliederte sich in eine Anfütterungs - und Abklingphase. Die Anfütterungsphase erstreckte sich über einen Zeitraum von 38 Wochen (266 Tage) und endete am 28.01.1997. Die Gruppen für den Anfütterungsversuch wurden in A, B, C und D1 unterteilt (Tabelle 3). Ab der 39. Woche begann der Abklingversuch, die dazugehörige Gruppe wurde mit D2 bezeichnet. Die D2-Gruppe wurde bis zum Beginn des Abklingversuches mit Futter gefüttert, welches 5 mg / kg Toxaphen enthielt, danach bekam diese Gruppe nur noch unkontaminiertes Futter. Der Abklingversuch wurde nach 16 Wochen (in der 54. Versuchswoche nach 378 Versuchstagen am 20.05.97) abgebrochen, da die Legehennen mit einem Lebensalter von etwa 80 Wochen in die „Mauser“ kommen und durch die dann sich einstellenden Stoffwechsellumstellungen im Tier keine einheitlichen Versuchsbedingungen mehr vorliegen.

Tabelle 3: Tierversuchsgruppen und Toxaphengehalt in deren Futter

Gruppeneinteilung	Zugabe an Toxaphen	Anzahl der Tiere in der Gruppe
Gruppe A	0,1 mg / kg Toxaphen	9 Tiere
Gruppe B	0,5 mg / kg Toxaphen	9 Tiere
Gruppe C	1,0 mg / kg Toxaphen	9 Tiere
Gruppe D1	5,0 mg / kg Toxaphen	9 Tiere
Gruppe D2*	5,0 mg / kg Toxaphen	21 Tiere
Kontrollgruppe für A-D1	nicht kontaminiertes Futter	9 Tiere
Kontrollgruppe für D2	nicht kontaminiertes Futter	18 Tiere

* ab dem 28.01.1997 bekam diese Gruppe nur noch unkontaminiertes Futter

Die Anfütterungsphase beinhaltete 3, der Abklingversuch insgesamt 7 Schlachttermine. Bei jedem Schlachttermin wurden aus jeder Gruppe 3 Tiere geschlachtet. Dabei wurden von jeweils 3 Tieren aus den Geweben Abdominalfett, Muskelfleisch, Leber, Niere, Haut und Blut Poolproben für jede Matrix hergestellt. Zur Ermittlung der Toxaphenlevel zu Versuchsbeginn wurden ebenfalls Poolproben von 3 Tieren für jede Matrix herangezogen. Die genauen Schlachttermine sind in Tabelle 4 und 5 aufgelistet.

Tabelle 4: Schlachttermine für den Carry over Versuch (Anfütterungsphase)

Termin	Versuchswochen	Schlachtdatum	Versuchsdauer [d]
1	18. Woche	09.09.1996	126
2	28. Woche	18.11.1996	196
3	38. Woche	27.01.1997	266

Tabelle 5: Schlachtermine für den Carry over Versuch (Abklingphase)

Termin	Versuchswoche	Schlachtdatum	Dauer des Abklingversuches	Dauer des Abklingversuches
4	39. Woche	04.02.1997	1. Woche	7 Tage
5	40. Woche	11.02.1997	2. Woche	14 Tage
6	41. Woche	18.02.1997	3. Woche	21 Tage
7	43. Woche	04.03.1997	5. Woche	35 Tage
8	46. Woche	25.03.1997	8. Woche	56 Tage
9	50. Woche	22.04.1997	12. Woche	84 Tage
10	54. Woche	20.05.1997	16. Woche	112 Tage

Neben den Gewebeproben wurde das Futter nach jeder Neumischung, jedoch mindestens einmal im Monat auf seinen Toxaphengehalt hin analysiert. Während der gesamten Versuchsdauer wurden Eier der Tiere aus allen Versuchsgruppen untersucht. Die Eier wurden in Eiklar und Eidotter getrennt. Jeweils 5 Eidotter von 5 verschiedenen Tieren wurden dann zu einer Poolprobe vereinigt und homogenisiert. Bei den Eiklarproben wurde analog vorgegangen. Die Probennahme bei den Eiern erfolgte alle zwei Wochen, gegen Ende der Anfütterungsphase und zu Beginn des Abklingversuches sogar wöchentlich.

Darüberhinaus wurden in jeder Gruppe in etwa vierwöchigem Abstand Kotproben (gepoolte Ausscheidung von jeweils 3 Tieren über einen Zeitraum von 24 Stunden) genommen und diese ebenfalls auf ihren Toxaphengehalt hin untersucht.

4. Analytisches Verfahren zur Bestimmung von Toxaphenrückständen in tierischen Lebensmitteln

Für die quantitative Bestimmung von Toxaphen in Proben aus dem Carry over Versuch und in weiteren Proben zur Erfassung einer möglichen Belastung von tierischen Lebensmitteln mit Toxaphen wurde ein Gaschromatograph gekoppelt mit einem hochauflösenden Massenspektrometer eingesetzt.

Im folgenden soll die Auswahl der analytischen Parameter erläutert werden, sowie die Validierung der Analytik vorgestellt werden.

4.1 Ionisierung und Ionendetektion der Toxaphenverbindungen

Für die Ionisierung der Toxaphenverbindungen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Elektronenionisationstechnik gewählt. Dieses Verfahren gilt aufgrund der dabei vermehrt auftretenden größeren Fragmentierungsreaktionen bei Toxaphenkongeneren gegenüber der weitverbreiteten chemischen Ionisation zwar als deutlich unempfindlicher, jedoch zeigte sich, dass die mit diesem Verfahren erzielten Nachweisgrenzen für die vorliegende Arbeit weit mehr als ausreichend waren. Die Vorteile der Elektronenionisationstechnik liegen im Vergleich zur chemischen Ionisation in einer geringeren Verschmutzung der Ionenquelle und den daraus resultierenden längeren Gerätestandzeiten.

Bei der chemischen Ionisation können Selektivitätsprobleme auftreten, denn bei dieser Ionisierungstechnik fragmentieren die Toxaphene vor allem in höheren Ionenmassen im Bereich der Molekülionen. Bei der Registrierung dieser Ionenmassen im Single-Ion-Registration-Betrieb (SIR-Modus), d.h. nur wenige ausgewählte Fragmentationen aus dem Massenspektrum der zu untersuchenden Substanz werden mit dem Detektor registriert, können strukturell verwandte Verbindungen, wie Chlordan, Heptachlor, Aldrin und PCB-Verbindungen, Störsignale liefern, die zu falsch positiven Befunden führen können [97].

Nach der Elektronenionisation liefern die Toxaphenkongeneren jedoch eine ausreichende Anzahl an charakteristischen Fragmenten im unteren Ionenmassenbereich, die für eine MS-Analytik noch mit guter Intensität gebildet und nachgewiesen werden können. Bei der Registrierung dieser Ionen in Verbindung mit einer hohen Auflösung des Massenbereiches

($R = 10.000$) kann die Selektivität der Analytik erhöht werden. Neben der chromatographischen Trennung können coeluiierende Substanzen durch Beobachtung unterschiedlicher charakteristischer Fragmentionenmassen sehr oft dennoch getrennt detektiert werden, wenn die Auflösung des Massenspektrometers dies zulässt. Mit dem Auflösungsvermögen A kann berechnet werden, welche Massen voneinander getrennt werden können.

$$A = m / \Delta m$$

wobei m eine Ionenmasse darstellt und Δm die bei dieser Ionenmasse trennbare Massendifferenz ist.

Bei einer Auflösung von 10.000 und bei einer registrierten Masse von $m = 160u$ können Substanzen, die eine Massendifferenz von $\Delta m = 0,016u$ besitzen, unterschieden und somit getrennt werden.

Mit dieser hohen Auflösung können Interferenzen durch strukturell verwandte Verbindungen weitgehend vermieden werden. Einzige Ausnahme hiervon sind Verbindungen, die das zur Quantifizierung verwandte Fragmention ebenfalls bilden. Mit ausreichender Erfahrung können diese Verbindungen aufgrund ihrer GC- Retentionszeiten aber zweifelsfrei erkannt werden, so dass bei der Aufarbeitung der Proben eine Abtrennung dieser Verbindungen nicht in jedem Fall vorgenommen werden muss. Dies erleichtert die Probenaufarbeitung und verkürzt die Gesamtanalysenzeit deutlich.

Für die Detektion von Toxaphenrückständen wurden keine kompletten Massenspektren der zu untersuchenden Verbindungen aufgenommen. Zum analytischen Nachweis wurden zwei Massenspuren des für alle Toxaphenverbindungen charakteristischen Fragmentions ausgewählt [4,77], die im SIR-Modus registriert wurden. Durch Auswahl einer geringen Zahl an zu beobachtenden Ionen innerhalb eines Messzyklus kann eine längere Messzeit gewählt werden, wodurch sich eine Verbesserung der Nachweisgrenze um den Faktor 10 bis 100 gegenüber einem Full-Scan ergibt [98].

Als selektives Ion für die Detektion der Toxaphene im SIR-Modus wurde das Dichlortropylium-Ion ($C_7 H_7 Cl_2$) mit der Masse 159 gewählt. Es wird von allen

Toxaphenkongeneren gebildet und weist in den Massenspektren der einzelnen Kongenere ein Ionenverteilungsmuster mit akzeptablen Ionen-Intensitäten auf (in Abschnitt 6.4 werden weitere Fragmentationen zum Nachweis von Toxaphenverbindungen untersucht). Die Bildung des detektierten Ions erklärt sich auf folgende Weise [4]:

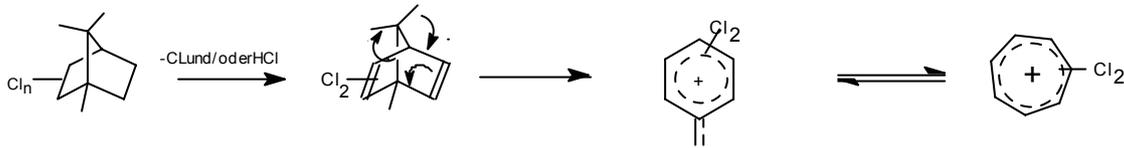


Abbildung 3: Bildung des Dichlortropylium-Ions [4]

Das Dichlortropylium-Ion weist folgendes berechnetes Isotopenverteilungsmuster auf (Tabelle 6):

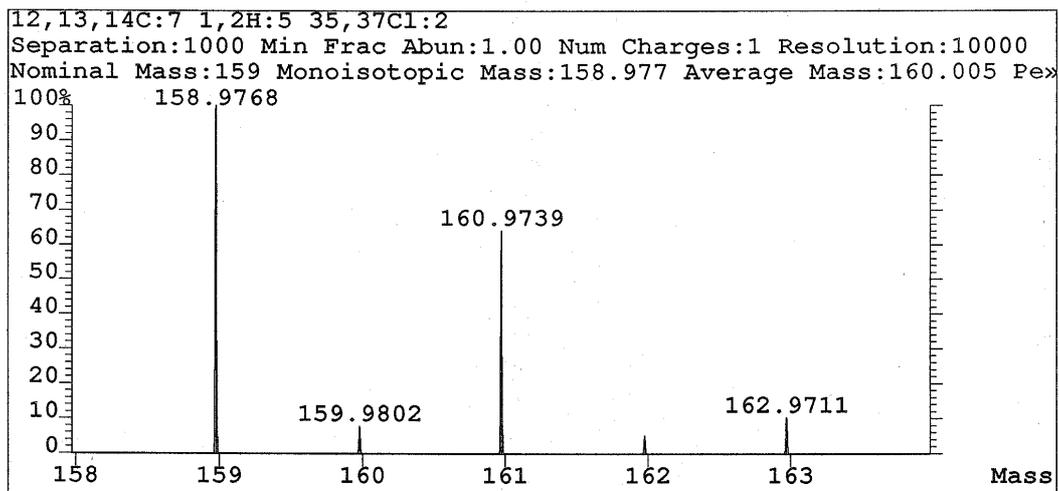


Abbildung 4: Isotopenverteilung des Dichlortropylium-Ions

Tabelle 6: Berechnete Isotopenverteilung des Dichlortropylium-Ions

m/z	Peakintensität in [%]	Peakintensität normiert; in [%]	Isotopenkombination
158,9768	53,09	100,00	7 ¹² C; 5 H; 2 ³⁵ Cl
159,9802	4,17	7,86	6 ¹² C; ¹³ C; 5 H; 2 ³⁵ Cl
160,9739	34,10	64,22	7 ¹² C; 5 H; ³⁵ Cl; ³⁷ Cl
161,9772	2,67	5,03	6 ¹² C; ¹³ C; 5 H; ³⁵ Cl; ³⁷ Cl
162,9711	5,52	10,40	7 ¹² C; 5 H; 2 ³⁷ Cl

Für die Quantifizierung der Toxaphene wurde der Isotopenpeak mit der Masse m/z 158,9768 aus dieser Verteilung gewählt. Zusätzlich zu dieser Masse wurde ein zweiter Peak aus dem Cluster mit der Masse m/z 160,9739 registriert. Diese zweite Ionenmasse wurde dabei zur Absicherung des positiven Nachweises von Toxaphenkongeneren eingesetzt.

Das Intensitätsverhältnis der Peaks mit den Massen m/z 158,9768 zu 160,9739 ergibt sich aus der natürlichen Isotopenverteilung der Chlorisotope ³⁵Cl und ³⁷Cl mit den natürlichen Häufigkeiten von 3:1 und beträgt 100 % zu 64 % (siehe Tabelle 6).

Wird anhand seiner Retentionszeiten ein Peak als Toxaphenkongener identifiziert, so muss sich auch in den beiden Massenspuren (159 und 161) dieses Verhältnis in einer Schwankungsbreite von ca. ± 15 % widerspiegeln, damit er als positiv nachgewiesen gelten kann.

Neben den für Toxaphenkongeneren charakteristischen Ionen wurde noch ein Fragmention der verwendeten Injektionsstandards in das Messprogramm aufgenommen. Derzeit stehen zur Quantifizierung von Toxaphen noch keine isotopenmarkierten Standards zur Verfügung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden deshalb hierzu ¹³C₁₂ markierte PCB-Verbindungen eingesetzt.

Bei der Auswahl einer geeigneten Ionenmasse für diesen Standard war zu beachten, dass das ausgewählte Fragmention sich in der Masse möglichst wenig von dem registrierten Dichlortropylium-Ion der Toxaphenkongeneren unterscheiden darf. Der Grund hierfür liegt im Funktionsprinzip eines hochauflösenden Sektorfeld-Massenspektrometers.

Das Magnetfeld, in dem die Ablenkung der geladenen bewegten Teilchen auf dem Weg zum Detektor stattfindet, bleibt bei der Messung im SIR Betrieb konstant. Die erzeugten

Ionen werden durch das Magnetfeld zum Detektor hin beschleunigt. In dem zur Verfügung stehenden Sektorfeldgerät werden die Ionen mit der kleinsten Masse mit einer Beschleunigungsspannung von 8kV beschleunigt. Damit Fragmentationen mit höheren Massen auf den Detektor treffen und damit sichtbar werden, muß die Beschleunigungsspannung von 8kV entsprechend abgesenkt werden. Je größer die Differenzen zwischen kleinster und größter beobachteter Ionenmasse in einem Akquisitionsprogramm sind, desto höher ist die notwendige Absenkung der Beschleunigungsspannung. Da die Änderung der Beschleunigungsspannung über mehrere 1000 Volt im Millisekundenbereich stattfinden muß, sind dem Meßprinzip für reproduzierbare Ergebnisse damit technische Grenzen gesetzt.

Als Injektionsstandard wurde $^{13}\text{C}_{12}$ PCB 81 gewählt. Dieses PCB-Kongener stellt ein Tetrachlorbiphenyl dar. Im Massenspektrum des PCB 81 ist ein Fragmentation enthalten, welches nahe im Bereich zu der Masse des registrierten charakteristischen Fragmentations der Toxaphenkongenerie liegt. Es wird durch die Eliminierung von 4 Chloratomen aus dem Tetrachlorbiphenyl-Molekül gebildet und besitzt die nominale Masse von m/z 162,0872.

Zusätzlich zum Injektionsstandard wurde ein „Wiederfindungsstandard“ in die Analytik eingebaut, der Hinweise zur Güte der Probenaufarbeitung liefert. Hierzu wurde $^{13}\text{C}_{12}$ PCB 77 verwendet, welches auf derselben Massenspur wie das PCB 81 registriert werden kann, da es ebenfalls ein vierfach-chloriertes PCB ist und ähnliches Fragmentierungsverhalten im Massenspektrometer besitzt. Dabei wurde angenommen, daß PCB 77 ein ähnliches chemisches Verhalten während der durchgeführten Probenvorbereitung aufweist, wie die Kongenerie des Toxaphens. Nur Proben, deren Wiederfindungsraten zwischen 80-120% lagen, wurden bei der Auswertung berücksichtigt (Die ermittelten Gehalte wurden aber nicht entsprechend der Wiederfindung korrigiert).

4.2 Chromatographische Trennung von Toxaphen

Mit den unter Punkt 4.1 ausgewählten Fragmentionen wurden Toxaphenkongeneren in allen unterschiedlichen Proben detektiert und quantifiziert. Mit der vorgestellten Methode können zwar Interferenzen zu anderen chlorierten Verbindungen stark minimiert werden, Coelutionen von verschiedenen Toxaphenkongeneren untereinander konnten aber dadurch nicht immer ausgeschlossen werden.

Zur Minimierung solcher Coelutionen ist vor allem eine gute gaschromatographische Trennung wichtig. Im Vorfeld konnten keine Versuche vorgenommen werden, welcher gaschromatographische Säulentyp am besten zur Trennung von Toxaphenrückständen geeignet ist, da noch keine kontaminierten Realproben vorhanden waren. Als Trennsäule wurde deshalb eine unpolare DB-5 GC-Säule des Herstellers J+W mit 30 m Säulenlänge gewählt, die laut Literatur für die Analytik von Toxaphen bereits etabliert ist.

Eine komplette Trennung des Toxaphenstandards mit 22 Kongeneren konnte auf der DB-5 jedoch auch durch umfangreichste Variation des Temperaturgradienten während der Chromatographie nicht erreicht werden.

Je nach verwendetem Temperaturprogramm zeigte sich zwischen den Kongeneren Parlar 39 und 40, oder 40 und 41 Coelution. Die Einzelverbindungen Parlar 62 und 63 konnten bei allen getesteten Temperaturprogrammen nie basisliniengetrennt werden.

Für die Quantifizierung von Toxaphenrückständen wurde ein Standard aus 22 Toxaphenkongeneren (je 38,4ppb) und dem $^{13}\text{C}_{12}$ -markierten PCB 81 (12,94ppb) und PCB 77 (11,94ppb) hergestellt, dessen chromatographische Trennung in der Abbildung 5 zu sehen ist.

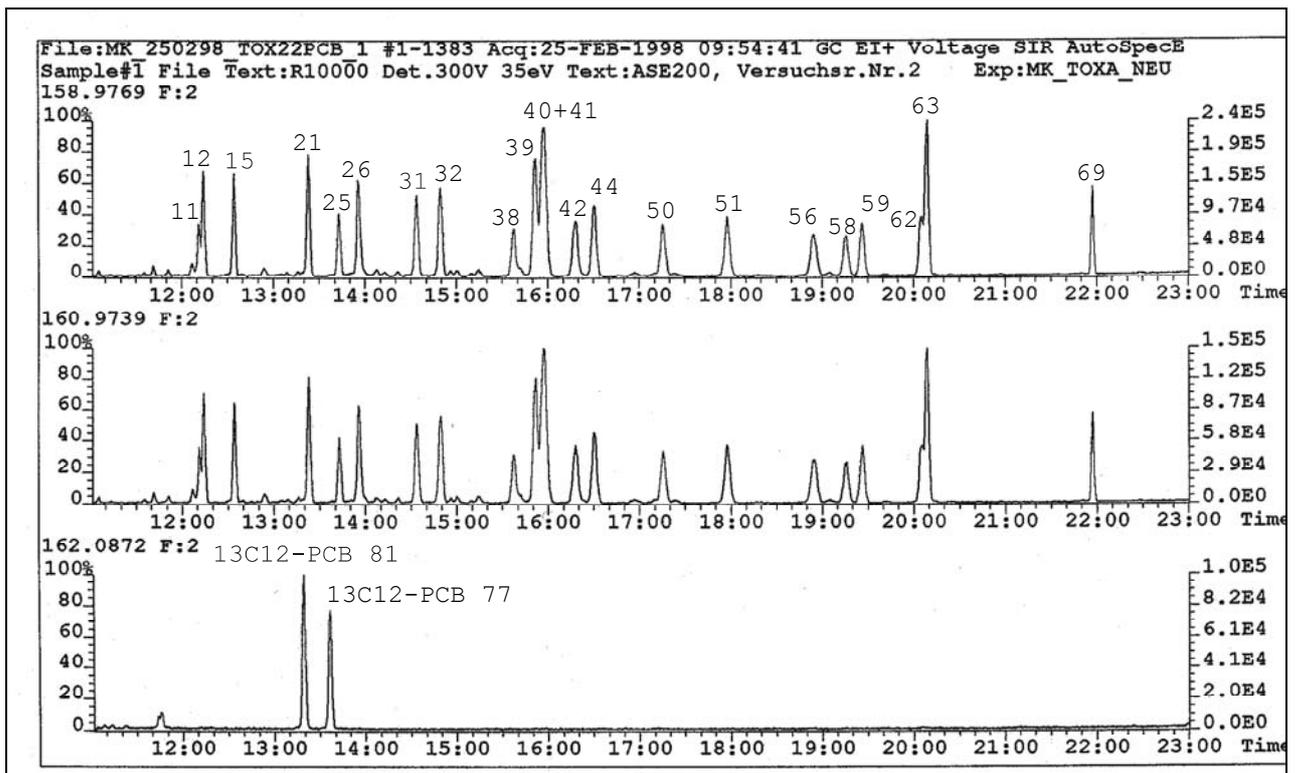


Abbildung 5: Trennung des zur Quantifizierung eingesetzten Standards auf einer DB-5 von J+W (30m x 0,25mm x 0,25 μ m); (GC Temp.Programm: 70°C (2min) - 225°C (22,5°C/min) - 230°C (1°C/min, 5 min) - 320°C (20°C/min, 1,5min))

4.3 Responseverhalten von Toxaphen nach Elektronenionisation

Die Quantifizierung von Toxaphen-Rückständen mittels Massenspektrometrie und Negativ-Chemischer-Ionisation ist nicht unproblematisch. Probleme bereiteten in der Vergangenheit fehlende Standards, der schwierig reproduzierbare Reaktandgasdruck in der Ionenquelle und stark unterschiedliches, sowie schwankendes und damit wenig reproduzierbares Responseverhalten der Toxaphene [43].

Dies bezog sich jedoch hauptsächlich auf die chemische Ionisierungstechnik mit Reaktandgasen, wie Methan oder iso-Butan. Im folgenden soll nun das Responseverhalten der Toxaphene mit Elektronenionisation untersucht werden. Hierzu wurde der Quantifizierungsstandard (aus Abbildung 5) vierzehn mal quantitativ analysiert. Für die Auswertung wurden die Flächen der Toxaphenkongenerere einmal auf die Fläche des Kongener Parlar 50 und einmal auf das markierte PCB $^{13}\text{C}_{12}$ 81 bezogen.

In der Abbildung 6 a und 6 b sind die Ergebnisse graphisch (wobei die Bezeichnungen P11, P12 etc. für Parlar und die entsprechende Nr. stehen) und in Tabelle 7 numerisch dargestellt.

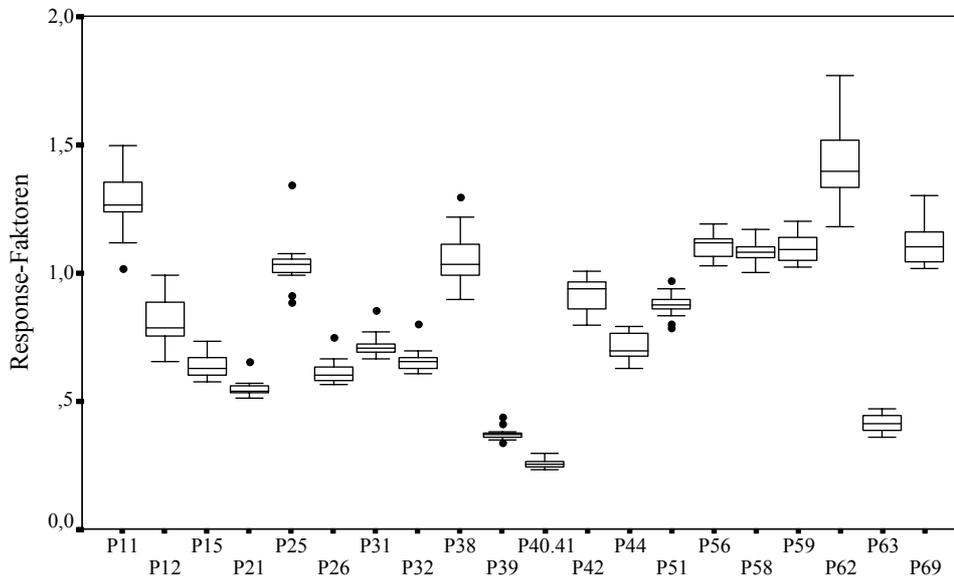


Abbildung 6 a: Responsefaktoren des 22 Komponentenstandard bezogen auf Kongener Parlar 50

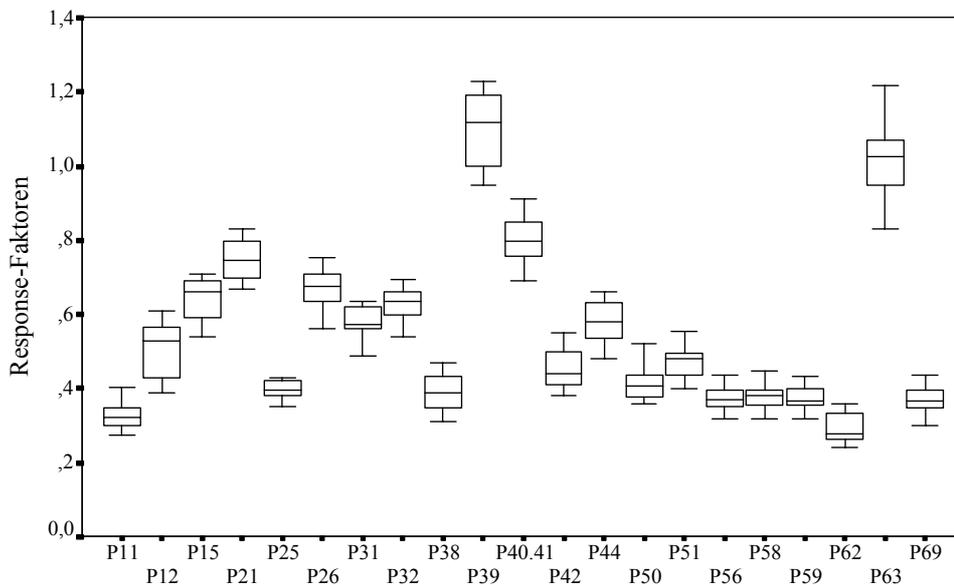


Abbildung 6 b: Responsefaktoren des 22 Komponentenstandard bezogen auf PCB 81

Tabelle 7: Responsefaktoren des 22 Komponentenstandard

	Responsefaktoren zu Parlar 50			Responsefaktoren zu PCB 81		
	MW	STD	STD %	MW	STD	STD %
Parlar 11	1,283	0,133	10,4	0,323	0,036	11,1
Parlar 12	0,816	0,101	12,4	0,513	0,073	14,2
Parlar 15	0,643	0,047	7,3	0,644	0,057	8,9
Parlar 21	0,549	0,035	6,4	0,751	0,055	7,3
Parlar 25	1,039	0,103	9,9	0,398	0,027	6,8
Parlar 26	0,609	0,062	9,9	0,671	0,057	8,5
Parlar 31	0,719	0,047	6,5	0,575	0,044	7,6
Parlar 32	0,658	0,050	7,6	0,627	0,045	7,2
Parlar 38	1,061	0,118	11,1	0,393	0,053	13,4
Parlar 39	0,375	0,025	6,7	1,103	0,097	8,8
P 40+41	0,257	0,016	6,2	0,802	0,070	8,8
Parlar 42	0,913	0,071	7,8	0,454	0,056	12,3
Parlar 44	0,712	0,051	7,2	0,581	0,059	10,2
Parlar 50	-----	-----	-----	0,413	0,042	10,2
Parlar 51	0,875	0,048	5,5	0,473	0,044	9,3
Parlar 56	1,105	0,049	4,4	0,373	0,034	9,1
Parlar 58	1,084	0,050	4,6	0,381	0,039	10,2
Parlar 59	1,098	0,053	4,8	0,376	0,034	9,0
Parlar 62	1,419	0,151	10,6	0,293	0,039	13,3
Parlar 63	0,407	0,029	7,1	1,025	0,094	9,2
Parlar 69	1,112	0,080	7,2	0,371	0,035	9,5

Wie aus den Abbildungen und der Tabelle ersichtlich ist, konnten mit der vorgestellten Methode durchaus reproduzierbare und vergleichbare Responsefaktoren für Toxaphenverbindungen ermittelt werden. Die deutlich schlechteren Standardabweichungen bei den Kongeneren Parlar 11, 12, 38 und 62 erklären sich mit der schlechten Basislinientrennung, was zu größeren Fehlern bei der Flächenbestimmung

dieser Peaks führte. Das Kongener Parlar 38 zeigte zudem bei einigen Chromatographieläufen eine Schulter, die ebenfalls die Integration erschwerte.

Die sehr geringen Schwankungen der Responsefaktoren für die Kongenere 51, 56, 58 und 59 im Bezug zu Parlar 50 sind auf geringere Unterschiede im gaschromatographischen und massenspektroskopischen Verhalten zu erklären, da sie in einem engen Zeitfenster von ca. zwei Minuten eluieren.

Bei den Responsefaktoren, die über den Quantifizierungsstandard PCB 81 ermittelt wurden, fällt auf, dass fast alle Standardabweichungen prozentual geringfügig höher als die mit Parlar 50 ermittelten sind (Ausnahme 25, 26 und 32). Dass die Kongenere Parlar 25, 26 und 32 geringere Standardabweichungen aufweisen, ist mit der Elutionsreihenfolge zu erklären (diese Kongenere eluieren fast zum gleichen Zeitpunkt wie das PCB 81).

Mit den über das PCB 81 ermittelten Responsefaktoren sollen Toxaphenrückstände in allen gemessenen Proben quantifiziert werden.

Da sich durch veränderte Messbedingungen auch die Responsefaktoren verändern können, wurde der zur Quantifizierung hergestellte Standard (Punkt 4.2) als Kontrollmessung nach jeder dritten Probe injiziert. Die Toxaphengehalte der jeweils zwischen den Standardinjektionen gemessenen drei Proben wurden mit Hilfe des vorher und nachher injizierten Standards berechnet.

4.4 Linearität des Detektors

Um das komplette Analysen-Verfahren zu überprüfen, kann zu rückstandsfreiem Untersuchungsmaterial der Mischstandard mit den 22-Toxaphenverbindungen zugesetzt werden [99]. Da aber von dem Toxaphenstandard nur eine begrenzte Menge zur Verfügung stand (10 ml eines 38,4 ppb Standards), konnten die Proben nicht einzeln dotiert werden. Zur Bestimmung der Linearität des Detektors wurden daher 2 ml des 22-Komponentenstandards in einem Probenvial vorsichtig zur Trockene eingengt. Anschließend wurden dem Vial 0,1 ml des $^{13}\text{C}_{12}$ -markierten PCB 81 Standards zugeführt. Von diesem Standard wurden mit Hilfe von isotopen-markiertem PCB 81 mit konstanter Konzentration entsprechende Verdünnungen zur Messung hergestellt. Für die graphische Darstellung wurden die Flächen der Toxaphene zu PCB 81 ermittelt. Am Beispiel der zwei

Kongenere Parlar 26 und 62 wurden die erhaltenen Flächen in den Abbildungen 7 und 8 aufgetragen. Die erhaltene Daten in Tabelle 8 wurden mit einer Auswertesoftware berechnet (Perkin Elmer SQS 98).

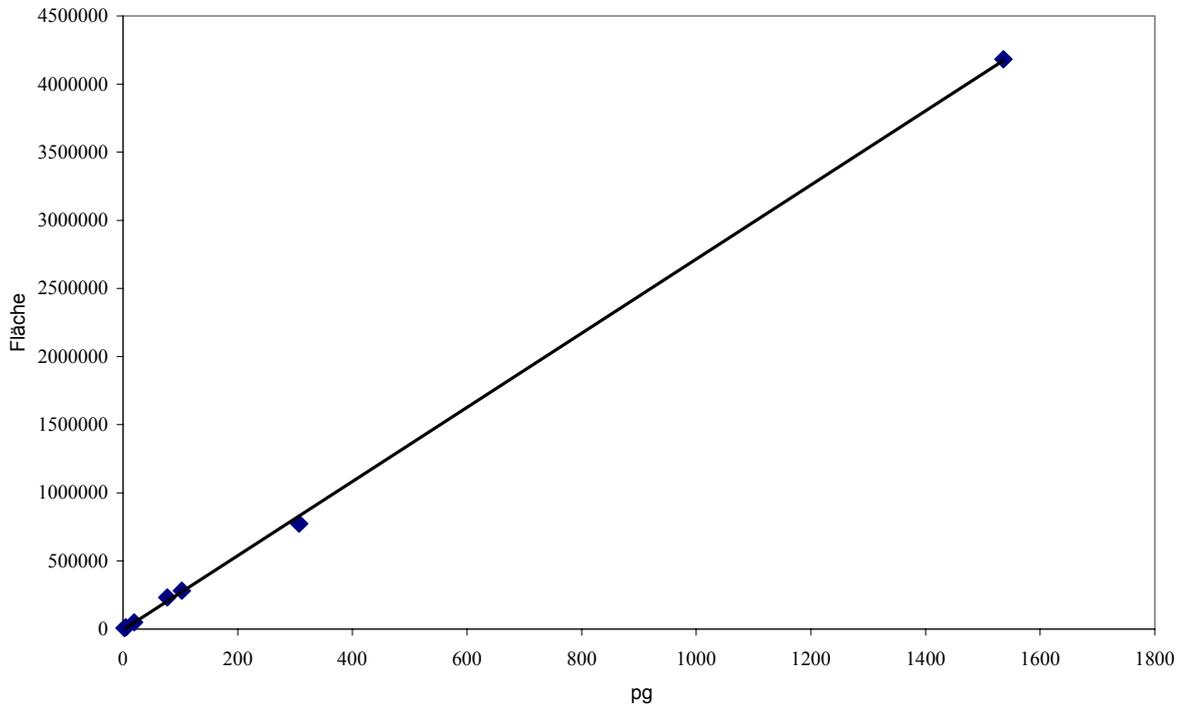


Abbildung 7: Linearer Bereich des Detektors am Beispiel des Kongeners Parlar 26

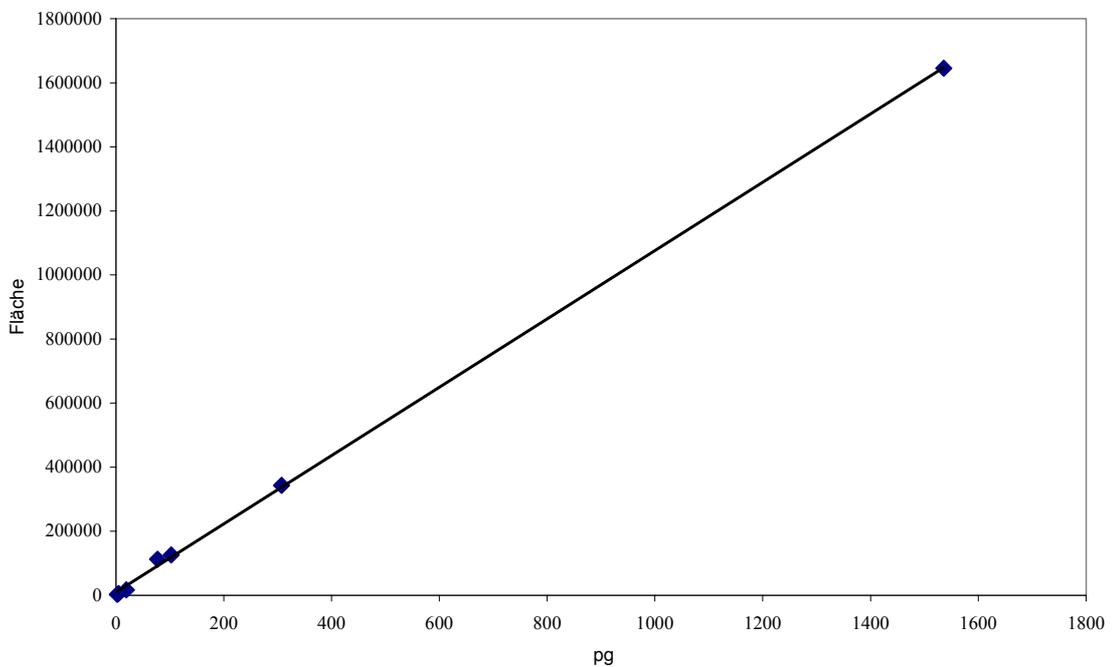


Abbildung 8: Linearer Bereich des Detektors am Beispiel des Kongeners Parlar 62

Für die Berechnung der Regressionsgeraden wurden die Flächen der zu bestimmenden Analyten gegen die Konzentration aufgetragen. Für die Kongenere aus dem 22. Kompetenzstandard sind die aus dem Versuch stammenden Regressionsgeraden in der Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Regressionsgeraden (n = 14)

	Regressionsgerade	Korrelationskoeffizient	Rel. Standard-Abweichung [%]
Parlar 11	$y = 1307 x + 2052$	0,9999	1,8
Parlar 12	$y = 2397 x - 33204$	0,9984	11,6
Parlar 15	$y = 2710 x - 12920$	0,9997	5,5
Parlar 21	$y = 3057 x + 2189$	0,9999	2,0
Parlar 25	$y = 1634 x - 2803$	0,9999	2,2
Parlar 26	$y = 2719 x - 4690$	0,9998	3,6
Parlar 31	$y = 2395 x - 4922$	0,9999	3,4
Parlar 32	$y = 2557 x + 645$	0,9999	1,9
Parlar 38	$y = 1583 x + 4439$	0,9999	3,2
Parlar 39	$y = 4667 x - 9197$	0,9999	2,3
Parlar 40+41	$y = 6720 x + 10659$	0,9999	1,0
Parlar 42a+42b	$y = 1894 x - 4534$	0,9999	4,0
Parlar 44	$y = 2634 x - 24158$	0,9999	6,4
Parlar 50	$y = 1710 x + 4451$	0,9999	4,0
Parlar 51	$y = 1872 x + 2459$	0,9999	1,9
Parlar 56	$y = 1502 x + 2453$	0,9999	2,3
Parlar 58	$y = 1553 x - 4888$	0,9998	3,1
Parlar 59	$y = 1488 x + 4470$	0,9999	2,4
Parlar 62	$y = 1066 x + 9721$	0,9998	4,2
Parlar 63	$y = 3887 x + 2453$	0,9999	2,6
Parlar 69	$y = 1351 x + 14368$	0,9998	4,1

Die Kalibrierfunktionen aller Kongenere waren linear. Für die Ermittlung der Daten wurde eine statistische Sicherheit $S = 1 - \alpha$ von 95% gewählt.

Für die Ermittlung der Nachweisgrenzen nach dem DIN-Verfahren aus einer Eichgeraden sollten in der Nähe der vermuteten Nachweisgrenze die Intervalle der Konzentration am schmälsten sein, um eine höhere Präzision zu erreichen. Durch die Drift des Ionenstrahls im Massenspektrometer waren pro Tag aber nur begrenzte Anzahlen von Messungen möglich, so daß die Punkt 4.5 ermittelten Nachweisgrenzen für das Verfahren gelten sollen.

4.5 Nachweisgrenzen für das Verfahren

Neben den wichtigen Kenngrößen für die Nachweisgrenzen (Probenmenge, Injektionsmenge, Detektorempfindlichkeit, Responseverhalten der Verbindungen, Konzentration der Injektionslösung) wird die Nachweisgrenze in dem vorgestellten Verfahren vor allem von der Fokussierung des Ionenstrahls und der verwendeten Auflösung des Massenspektrometers beeinflusst. Durch täglich neue Fokussierung des Ionenstrahls variieren die Nachweisgrenzen des Verfahrens.

Zur Ermittlung der Nachweisgrenzen über den gesamten Carry over Versuchsverlauf hinweg wurde Toxaphenfreies Probenmaterial untersucht. Zur Ermittlung einer Nachweisgrenze wurde für jedes Kongener eine Fläche von 6000 Flächeneinheiten eingesetzt, was in der Regel einem Signal - Rausch Verhältnis von 3:1 entsprach. Die Nachweisgrenzen wurden für 1g Probenmaterial (bezogen auf Fett) ermittelt. Die Proben wurden nach der Aufreinigung mit 1 ml des markierten PCB 81 versetzt und anschließend vorsichtig im Stickstoffstrom auf ca. 100 µl eingengt. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen aufgeführt.

Tabelle 9: Nachweisgrenzen für die 22 Toxaphenkongenere

Kongenere	Mittelwert [ng/g]	Median [ng/g]	Minimum [ng/g]	Maximum [ng/g]	Standard- abweichung	NWG [ng/g]
11	0,197	0,191	0,079	0,357	0,092	0,31
12	0,086	0,088	0,032	0,142	0,032	0,11
15	0,082	0,079	0,028	0,137	0,035	0,11
21	0,061	0,064	0,029	0,100	0,021	0,07
25	0,117	0,122	0,050	0,186	0,043	0,15
26	0,067	0,066	0,030	0,123	0,028	0,09
31	0,081	0,084	0,038	0,136	0,030	0,10
32	0,076	0,071	0,031	0,125	0,032	0,11
38	0,118	0,119	0,050	0,191	0,045	0,15
39	0,050	0,045	0,015	0,091	0,023	0,08
40+41	0,061	0,060	0,026	0,097	0,025	0,08
42	0,092	0,085	0,038	0,154	0,039	0,13
44	0,076	0,071	0,036	0,128	0,030	0,10
50	0,103	0,102	0,45	0,176	0,045	0,15
51	0,097	0,090	0,040	0,170	0,044	0,15
56	0,118	0,100	0,046	0,214	0,055	0,19
58	0,136	0,117	0,058	0,249	0,064	0,22
59	0,127	0,110	0,050	0,237	0,062	0,21
62	0,145	0,115	0,055	0,290	0,080	0,27
63	0,052	0,046	0,019	0,100	0,027	0,09
69	0,164	0,085	0,018	0,398	0,135	0,46

Die in der Tabelle deutlich erkennbaren Unterschiede resultieren vor allem aus verschiedenen Messbedingungen beim Betrieb des Massensepektrometers. Mit fortlaufender Betriebsdauer des Massenspektrometers verschlechtern sich naturgemäß die Nachweisgrenzen des Verfahrens, bedingt durch die zunehmende Verschmutzung der Ionenquelle des Gerätes.

4.6 Wiederfindung

Für die Wiederfindungsversuche wurde zu rückstandsfreiem Probenmaterial jeweils 1 ml des 22 Toxaphen-Komponentenstandards gegeben.

Für drei Proben ergaben sich die in Tabelle 10 aufgeführten Wiederfindungsraten.

Tabelle 10: Wiederfindungsraten des 22 Toxaphen-Komponentenstandards in %

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Parlar 11	91	87	107
Parlar 12	80	82	95
Parlar 15	82	81	95
Parlar 21	85	88	93
Parlar 25	82	92	88
Parlar 26	89	90	98
Parlar 31	90	94	91
Parlar 32	89	96	90
Parlar 38	85	89	88
Parlar 39	88	82	85
P 40+41	84	86	107
Parlar 42	89	109	91
Parlar 44	88	91	93
Parlar 50	94	95	93
Parlar 51	90	105	96
Parlar 56	89	86	102
Parlar 58	91	86	94
Parlar 59	88	94	93
Parlar 62	112	95	92
Parlar 63	86	95	90
Parlar 69	102	90	102

4.7 Wiederholbarkeit

Da lediglich eine beschränkte Menge des Toxaphenstandards zur Verfügung stand, die für weitere Dotierungsversuche keine Möglichkeit bot, wurden Versuche zur Wiederholbarkeit der Analytik mit einer Probe aus dem Fütterungsversuch durchgeführt.

Um die Wiederholbarkeit der GC/HRMS-Messtechnik zu überprüfen, wurde eine Probe zwölfmal an einem Tag vermessen. Um die Wiederholbarkeit der Aufarbeitung zu testen, wurde dieselbe Probe in unterschiedlichen Einwaagen an verschiedenen Tagen aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Wiederholbarkeit der Messungen und der Aufarbeitung anhand einer Hühnerfettprobe aus dem Carry over Versuch (Anfütterungsphase)

	Wiederholbarkeit der Messungen			Wiederholbarkeit der Aufarbeitung	
	Gehalt [ng / g]	Standard- abweichung [ng / g]	Standard- abweichung [%]	Standard- abweichung [ng / g]	Standard- abweichung [%]
Parlar 11	48,9	5,6	11,5	11,5	25,3
Parlar 21	61,4	11,3	18,3	10,18	14,5
Parlar 25	243,1	20,1	8,3	15,02	7,2
Parlar 26	359,8	18,9	5,3	17,42	4,8
Parlar 31	162,9	12,3	7,6	14,51	9,5
Parlar 32	181,0	13,4	7,4	15,6	9,7
Parlar 38	66,6	8,3	12,5	10,8	16,8
Parlar 39	21,5	3,8	17,6	----	---
P 40+41	187,9	13,9	7,4	20,15	11,9
Parlar 42	635,5	60,4	9,5	45,6	7,6
Parlar 44	184,5	18,3	9,9	14,2	7,7
Parlar 50	528,8	35,9	6,8	44,2	7,7
Parlar 51	227,8	23,1	10,1	21,7	10,8
Parlar 56	115,4	15,8	13,4	10,8	11,7
Parlar 58	447,3	35,4	7,9	43,3	10,6
Parlar 59	94,8	8,6	9,1	7,4	9,4
Parlar 62	704,8	60,0	8,5	87,3	13,6
Parlar 63	30,3	4,8	15,9	4,9	13,8
Parlar 69	114,7	8,0	7,0	12,4	11,3

Rückstände der Kongenere Parlar 12 und 15 konnten nicht detektiert werden.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass einige Kongenere deutlich größere Standardabweichungen aufweisen als andere. Dazu gehören die Kongenere Parlar 11, 21,

38, 39, 56 und 63. Der Grund für diese Schwankungen liegt in der gaschromatographischen Trennung dieser Verbindungen, die von unbekanntem Komponenten nicht immer getrennt werden, so dass die Peaks nicht basisliniengetrennt werden können. Der Gehalt der einzelnen Kongenere (Wiederholbarkeit der Aufarbeitung) wurde zur besseren Übersicht nicht mit angeführt. Die Werte waren mit minimalen Abweichungen identisch zu denen, die in der Tabelle Nr. 11 angeführt wurden. Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass mit dem vorgestellten Verfahren für die Toxaphenanalytik gut reproduzierbare Werte erhalten werden.

5. Ergebnisse des Fütterungsversuches an Legehennen

Der Fütterungsversuch gliederte sich in zwei Versuchsabschnitte. Im ersten Teil wurde durch den Zusatz von Toxaphen zum Legehennenalleinfutter der Transfer (Carry over) von Toxaphen aus dem Futter ins Huhn und ins Ei untersucht. Im zweiten Versuchsabschnitt wurde nach Absetzung der Toxaphenzugabe das Abklingverhalten der verschiedenen Kongenere betrachtet.

Während der gesamten Versuchsdauer konnten in keiner Versuchsgruppe eindeutige Hinweise auf eine Reduzierung der Legeleistung, der gelegten Eimasse oder auch eine Änderung im Futtermittelverzehr der Legehühner durch die Toxaphenzugabe festgestellt werden (Kontrollfassung während der 24 - 27 Versuchswoche). Ein negativer Gesundheitszustand der Tiere, hervorgerufen durch die Toxaphenaufnahme, konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.

Während des gesamten Versuches verendeten fünf Tiere, zwei davon gehörten der mit Toxaphen höchst dotierten Gruppe an und verendeten gegen Ende des Versuches. Dass das Verenden der Tiere unmittelbar mit der Toxaphenaufnahme zusammenhing, konnte aber nicht belegt werden.

5.1 Verhalten der Toxaphenkongenere

5.1.1 Verhalten der Toxaphenkongenere während des Transfers aus dem Futter in Legehennen und Eier

Während des Anfütterungs-Versuchsabschnittes erhielten alle Tiere in den verschiedenen Versuchsgruppen Futter, das mit technischem Toxaphen aus derselben Produktionscharge (siehe Abbildung 12) kontaminiert war, jedoch in unterschiedlichen Konzentrationen. Bei der Auswertung konnte festgestellt werden, dass sich innerhalb der Versuchsgruppen (A bis D1 bzw. D2) bei den einzelnen Proben keine Unterschiede im Chromatogramm muster ergaben. Daher gelten die folgende Aussagen für die entsprechenden Gewebeproben aller Versuchsgruppen. Die hier angeführten Chromatogramme stammen aus der D1 Gruppe, die einen Toxaphenzusatz von 5ppm mit dem Futter erhielten. Zur analytischen Beobachtung des Transfers von Toxaphen aus dem Futter in den Tierkörper wurden drei

Schlachtermine festgelegt. Der Transfer ins Ei und die Ausscheidung von Toxaphen über den Kot wurden kontinuierlich im Abstand von zwei bzw. vier Wochen kontrolliert. Während der gesamten Anfütterungsversuchsphase zeigte sich in den Chromatogrammen der Gewebeproben Fett, Fleisch und Dotter ein sehr ähnliches Toxaphenmuster. Vorherrschende Kongenere in Fett, Fleisch und Eidotter waren die Kongenere Parlar Nr. 26, 42, 50, 58 und 62, aber auch die Kongenere 40+41, 44 und 69 konnten sehr gut detektiert werden. Zusätzlich konnten drei unbekannte Toxaphenkongenere beobachtet werden. Da in den Proben Fett, Dotter und Fleisch während der gesamten Anfütterungsphase kaum Unterschiede auch innerhalb der unterschiedlich dosierten Versuchsgruppen (A-D2) im Chromatographiemuster auftraten, sind in Abbildung 9 stellvertretend nur die Chromatogramme der genannten Proben gegen Ende des Anfütterungsversuches dargestellt.

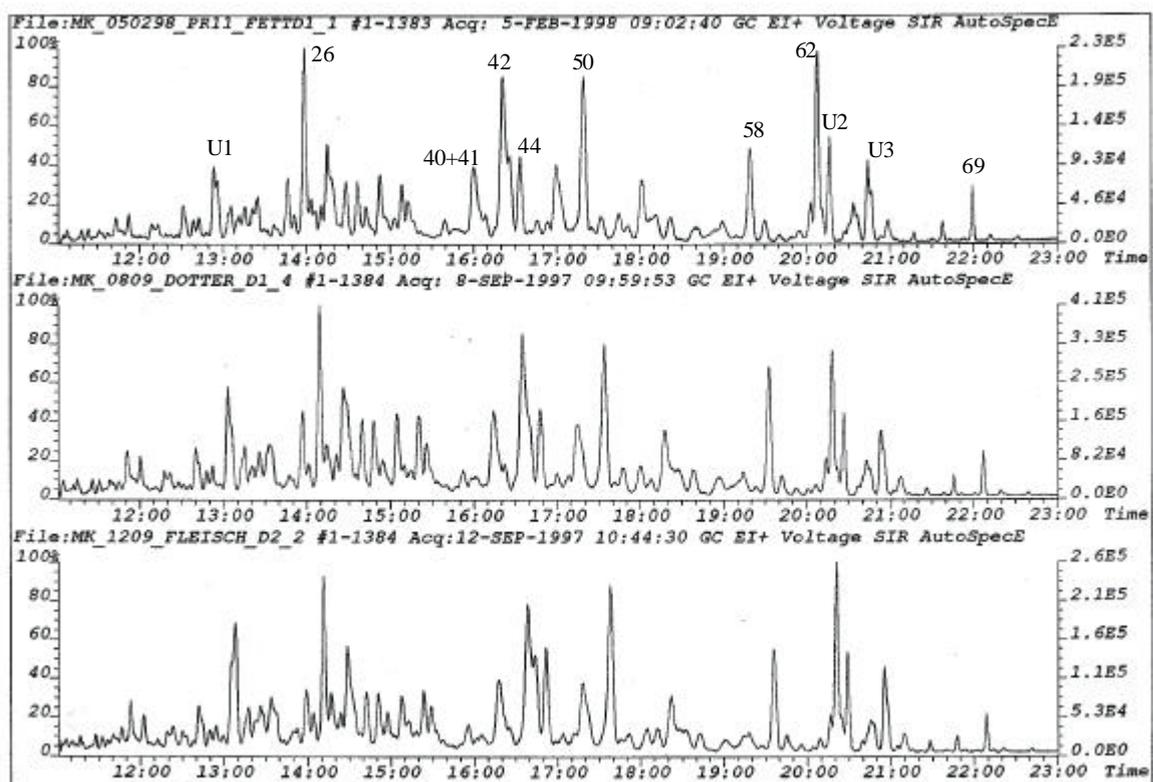


Abbildung 9: oberes Chromatogramm: Fettprobe Schlachttermin 28.1.97
 mittleres Chromatogramm: Dotterprobe Legetermin 28.1.97
 unteres Chromatogramm: Fleischprobe Schlachttermin 28.1.97

Aufgrund einer notwendigen Kürzung der GC-Säule ergaben sich im oberen Chromatogramm (Fettprobe) etwas verkürzte Retentionszeiten.

Bei der Einlagerung von Toxaphen in das Leber- und Nierengewebe zeigten sich, verglichen mit der Einlagerung ins Fett-, Fleisch- und Dottergewebe, Unterschiede.

Fett-, Fleisch- und Dotterproben wiesen über die gesamte Dauer der Anfütterung ein fast immer identisches Toxaphenmuster auf, bei den Leber- und Nierenproben wurde zu den 3 Schlachterminen jedoch ein unterschiedliches Toxaphenmuster registriert. Hier zeigte sich, dass einige Kongenere erst beim zweiten oder dritten Schlachtermin, in Konzentrationen, die durchaus mit denen in den Fett-, Fleisch- und Dotterproben (bezogen jeweils auf den Fettanteil) vergleichbar waren, im Gewebe nachgewiesen werden konnten. Besonders deutlich war dies bei den Kongeneren Parlar 58 und 62 zu sehen. In den Leber- und Nierenproben zeigte sich erst nach dem zweiten bzw. beim dritten Schlachtermin eine hohe Ähnlichkeit mit den in Fett-, Fleisch- und Dotterproben vorliegenden Chromatographiemustern. Als weiterer deutlicher Unterschied fiel die sehr geringe Konzentration der Verbindung Parlar 69 in den Leber- und Nierenproben auf.

Eine weitere Auffälligkeit in den Leber- und Nierenproben bei den ersten Schlachterminen ergab sich bezüglich der unbekanntes Toxaphenverbindung U1. Zeigte die unbekanntes Verbindung U1 beim ersten bzw. zweiten Schlachtermin ein höheres Responseverhalten gegenüber den anderen detektierten Kongeneren (Bsp. Parlar 26), so nahm das Responseverhalten und somit auch die Konzentration gegenüber den anderen Kongeneren beim letzten Schlachtermin deutlich ab.

Da das Chromatographiemuster der Toxaphenkongenere in den Leber- und Nierenproben sich sehr ähnelte, sind in der Abbildung 10 nur die Chromatogramme der Leberproben über die gesamte Dauer der Anfütterungsphase abgebildet.

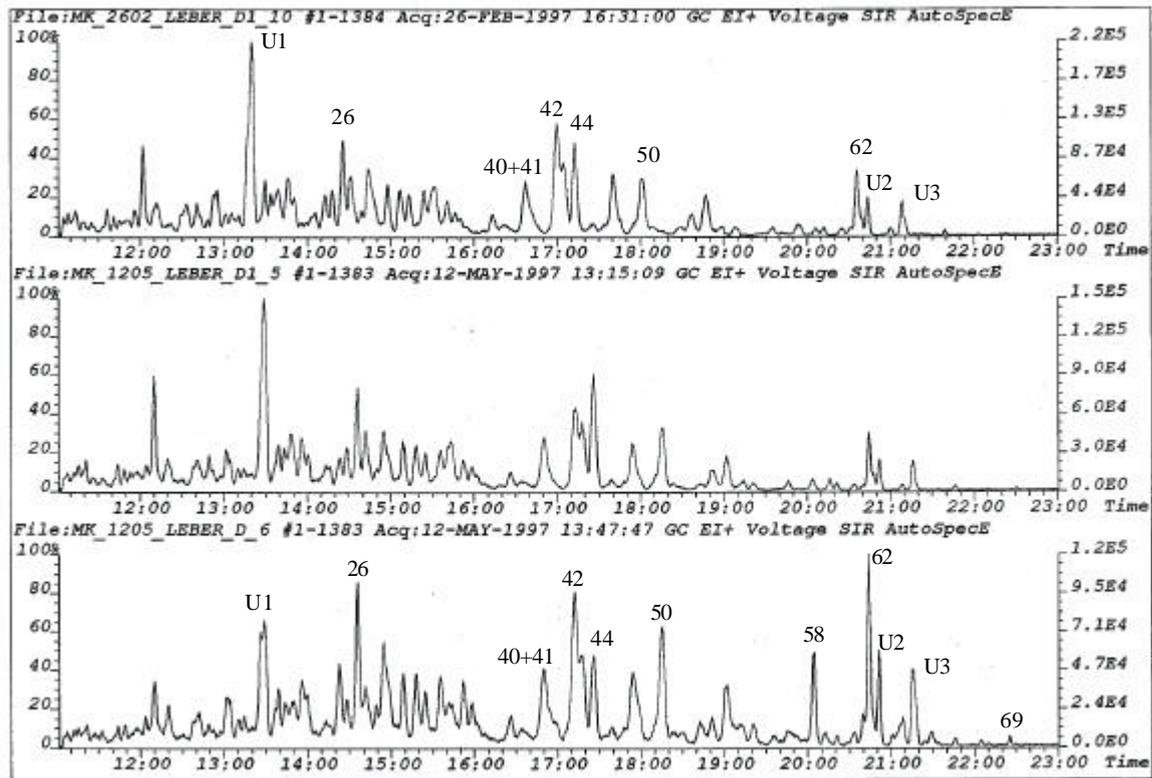


Abbildung 10: oberes Chromatogramm: Leberprobe Schlachttermin 09.09.1996
 mittleres Chromatogramm: Leberprobe Schlachttermin 18.11.1996
 unteres Chromatogramm: Leberprobe Schlachttermin 28.01.1997

Das Chromatogrammmuster der Blutproben aus allen drei Schlachtterminen zeigte eine deutliche Ähnlichkeit zum Toxaphenmuster in den Leber- und Nierenproben aus dem ersten und zweiten Schlachttermin. Eine zeitlich verzögerte Konzentrationszunahme einiger Kongenere (vor allem Parlar 58 und 62), wie sie in den Leber- und Nierenproben festgestellt werden konnte, war in den Blutproben während der Anfütterungsphase jedoch nicht zu beobachten.

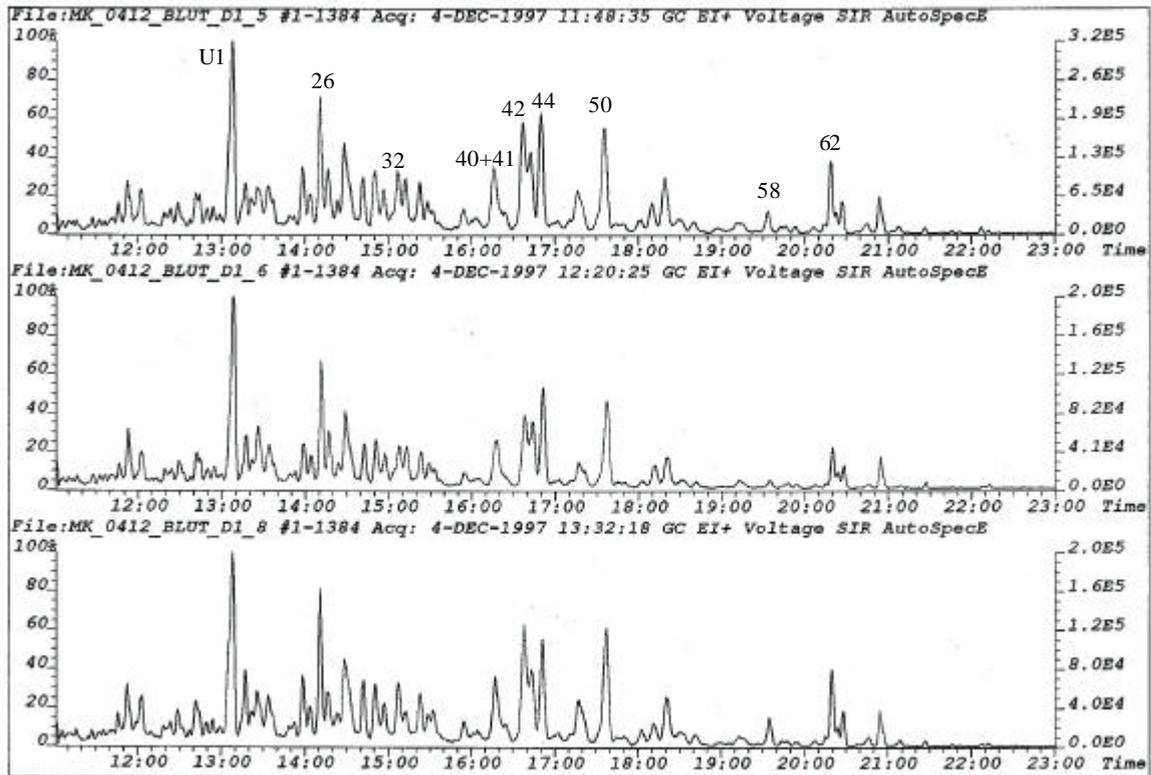


Abbildung 11: oberes Chromatogramm: Blutprobe Schlachttermin 09.09.1996
 mittleres Chromatogramm: Blutprobe Schlachttermin 18.11.1996
 unteres Chromatogramm: Blutprobe Schlachttermin 28.01.1997

Nur die Kotproben zeigten als einzige Probenmatrix ein deutlich von den anderen Proben abweichendes Toxaphenmuster. Das Chromatographiemuster der Kotproben besitzt sehr große Ähnlichkeit mit dem der Futterproben (techn. Toxaphen); siehe Abbildung 12. Größere Abweichungen im Chromatographiemuster der Kotproben (innerhalb der unterschiedlichen Versuchsgruppen sowie in den Terminen für die Probennahme) während der gesamten Anfütterungsphase konnten nicht beobachtet werden. Auffallend im Kongenerenmuster dieser Proben ist das Fehlen des Kongeners Parlar 69, sowie ein deutlich geringerer Anteil der Kongenere Parlar 42, 58, 59 und 62, verglichen mit der Zusammensetzung des technischen Toxaphens.

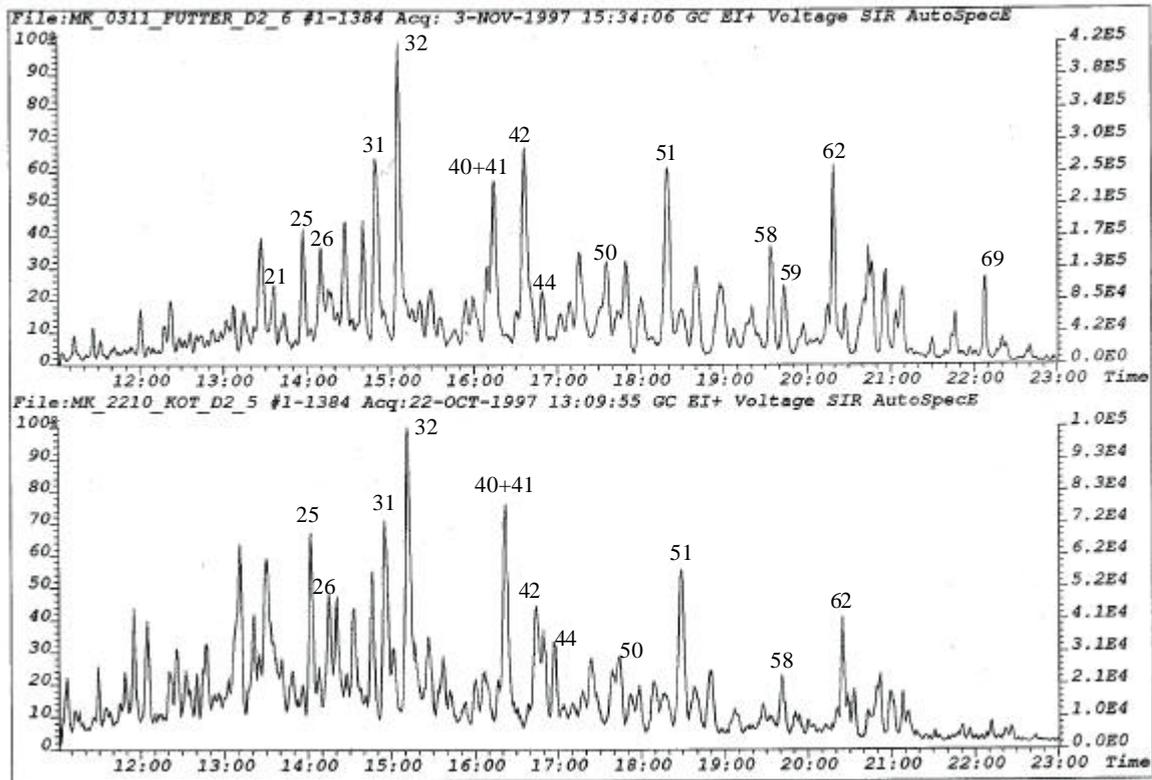


Abbildung 12: oberes Chromatogramm: Futterprobe
 (techn. Toxaphen 5ppm-Gruppe)
 unteres Chromatogramm: Kotprobe vom 28.01.1997

5.1.2 Verhalten der Toxaphenkongenere in Legehennen und Eiern während der Abklingphase

Nach der Anfütterung der Legehennen der D2-Gruppe mit Futter, welches 5ppm techn. Toxaphen enthielt, wurde dieser Versuchsgruppe ab dem 28.01.1997 für die Dauer der Abklingversuchsphase nur noch unkontaminiertes Futter verabreicht. Zur Beobachtung der Elimination von Toxaphen aus den verschiedenen Geweben und dem Ei wurden sieben Schlachtttermine festgelegt, die bereits im Abschnitt 3.3 angegeben wurden. Das Abklingen von Toxaphen im Ei wurde zuerst mit wöchentlicher Probennahme, und gegen Ende der Versuchsphase mit zweiwöchiger Probennahme beobachtet.

Die während der Anfütterungsphase dominierenden Kongenere waren auch während der Abklingphase die persistenteren Verbindungen aus dem technischen Toxaphen. Je nach Gewebeart konnten die Kongenere Parlar 26, 40+41, 42, 44, 50, 58, 62 und 69, sowie die drei unbekanntes Verbindungen U1, U2 und U3 deutlich nachgewiesen werden.

Im folgenden soll nun das chromatographische Muster der Toxaphenkontamination in den einzelnen Probenmatrizes im Verlauf der Abklingphase näher betrachtet werden.

In den Matrizes Fett, Fleisch und Dotter zeigte sich, in Analogie zur Anfütterungsphase, auch beim Abbau ein untereinander ähnliches Toxaphenmuster in den Chromatogrammen.

In den genannten Probenmatrizes ist in Abbildung 13 (Fettprobe stellvertretend für Fleisch und Dotterproben) der deutlich schnellere Abbau einiger Kongenere gegenüber den Kongeneren Parlar 26, 40+41, 42, 44, 50, 58, 62 und 69 zu sehen.

Im Chromatogramm (Abb.13) des letzten Schlachtttermines sind in den Fett-, Fleisch- und Dotterproben die Kongenere Parlar 26, 50, 58, 62 und 69 sowie zwei unbekanntes Verbindungen U2 und U3 die deutlich dominierenden und damit persistenten Verbindungen. Das Kongener Parlar 42 ist zwar auch noch gut nachweisbar, aber aufgrund seiner hohen Konzentration zu Beginn der Abklingphase ist ein schnelles Abklingen gut erkennbar. Kongener Parlar 44 ist ebenfalls noch gut zu detektieren. Der langsamere Abbau in den genannten Probenmatrizes ist ebenfalls in der Abbildung 13 zu erkennen.

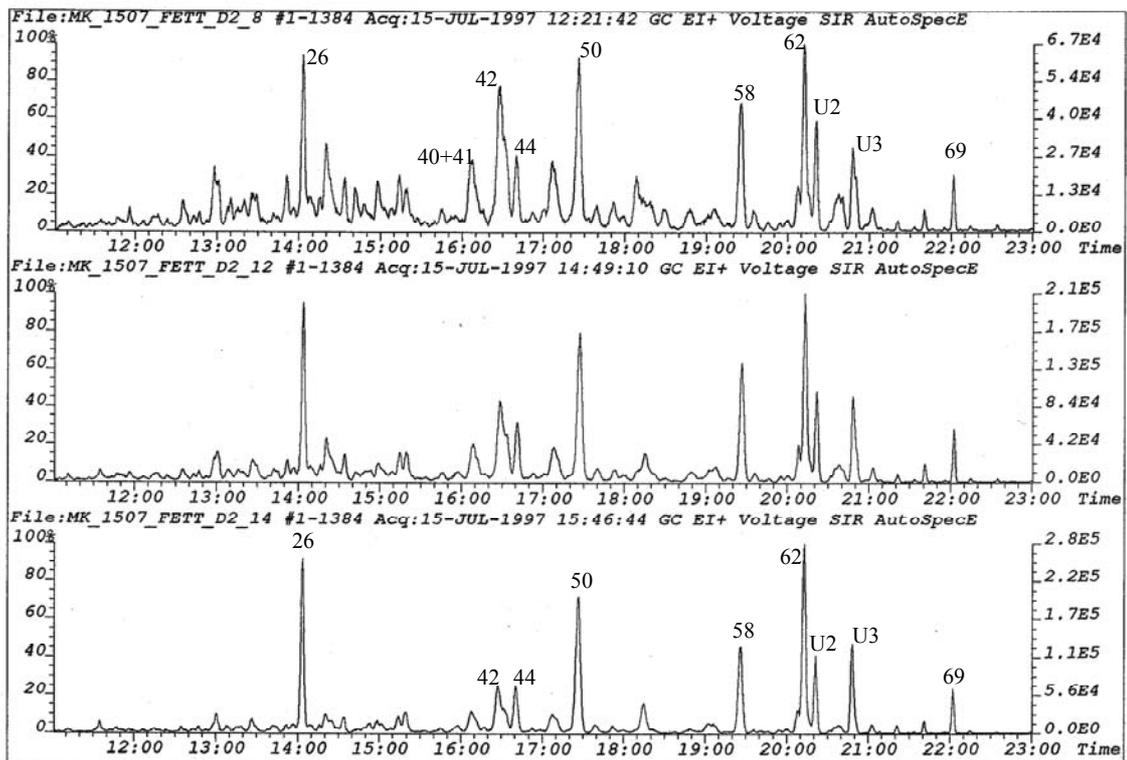


Abbildung 13: oberes Chromatogramm: Fettprobe Schlachtermin 04.02.1997
 mittleres Chromatogramm: Fettprobe Schlachtermin 25.03.1997
 unteres Chromatogramm: Fettprobe Schlachtermin 20.05.1997

Unterschiedliches Abklingverhalten einiger Kongenere in einzelnen Leber- und Nierenproben verschiedener Schlachtermine, wie sie bei der Anfütterung auftraten, konnten bei der Abklingphase nur bei den Leberproben beobachtet werden. Die Nierenproben zeigten während der Abklingphase ein ähnliches Toxaphenmuster wie die Fett-, Fleisch- und Dotterproben, lediglich das Kongener Parlar 69 konnte hier nur in geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden. Wegen der hohen Ähnlichkeit der Chromatogramme wird an dieser Stelle auf eine bildliche Darstellung des Abklingvorganges in den Nierenproben verzichtet.

In den Leberproben zeigten sich besonders für die Kongenere Parlar 44, 58 und 62 zu den unterschiedlichen Schlachterminen starke Variationen. Scheinen die Kongenere Parlar 58 und 62 gegenüber den übrigen dominierenden Kongeneren in der ersten Hälfte der Abklingphase schneller abgebaut zu werden, so konnte während der zweiten Hälfte des

Abklingversuches sogar ein Zunahme der Konzentration verzeichnet werden.

Während der ganzen Abklingphase zeigte zudem das Kongener Parlar 44 ein schwankendes Responseverhalten, bezogen auf die Kongenere Parlar 42 und 50. Zu Beginn des Versuches zeigten die Kongenere Parlar 42 und 50 einen höheren Response als das Kongener Parlar 44. Durch einen schnelleren Abbau der Kongenere Parlar 42 und 50 gegenüber dem Kongener Parlar 44 weist nun das Kongener Parlar 44 im zweiten Schlachttermin (zweites Chromatogramm Abbildung 14) einen höheren Response als die Kongenere Parlar 42 und 50 auf. Im weiteren Verlauf wurde dann wieder das Kongener Parlar 44 schneller abgebaut als die Kongenere Parlar 42 und 50 (drittes Chromatogramm Abbildung 14).

Zusätzlich ist in den Leberproben das Verhalten der unbekanntes Verbindung U1 hervorzuheben. Sie zeigte ein deutlich persistenteres Verhalten während des Abklingversuches als das Kongener Parlar 26.

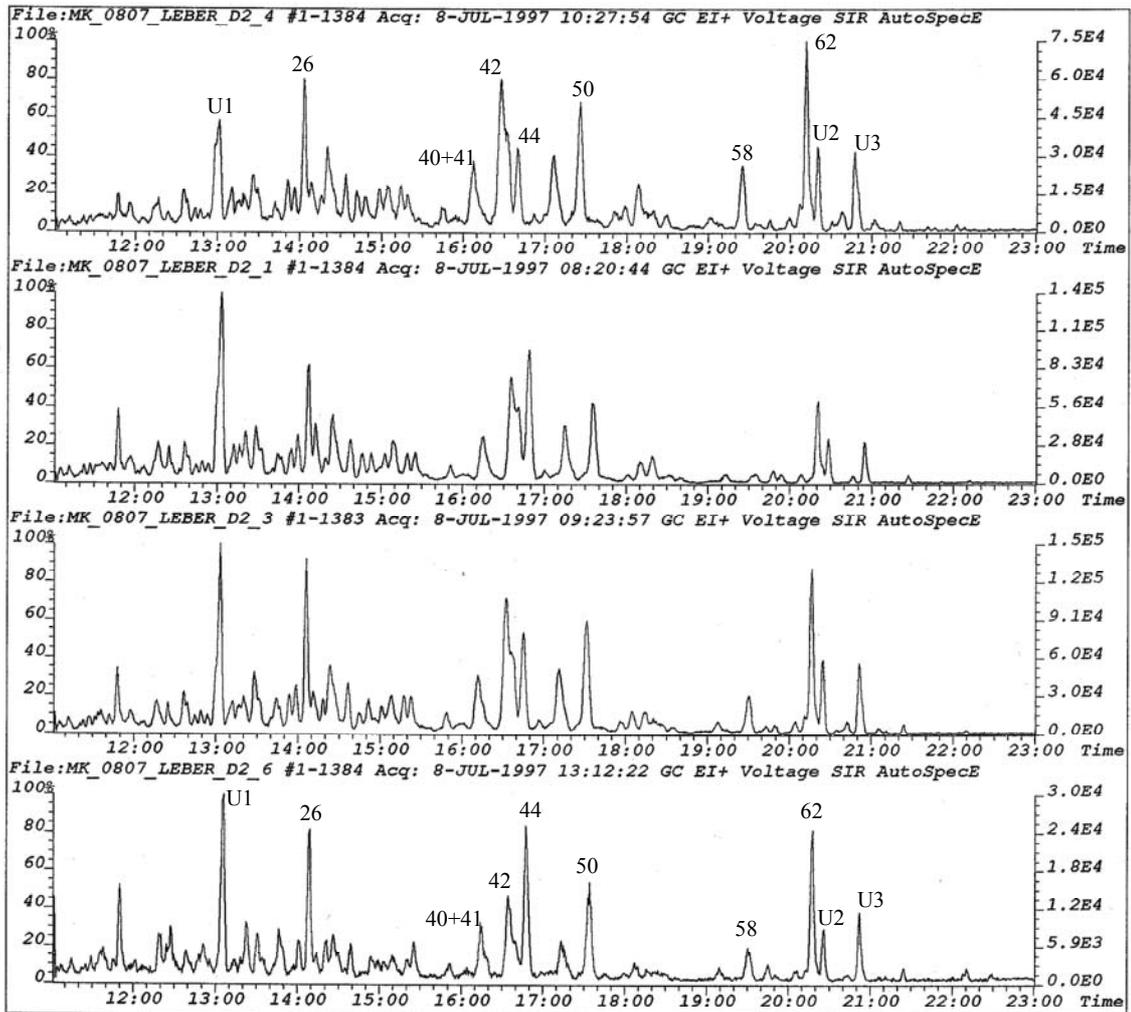


Abbildung 14: erstes Chromatogramm: Leberprobe Schlachtttermin 04.02.1997
 zweites Chromatogramm: Leberprobe Schlachtttermin 11.02.1997
 drittes Chromatogramm: Leberprobe Schlachtttermin 04.03.1997
 viertes Chromatogramm: Leberprobe Schlachtttermin 22.04.1997

Die Kotproben im Verlauf der Abklingphase zeigten gegenüber denen während der Anfütterung keine signifikante Veränderung im chromatographischen Muster. Während der Abklingphase war eine sehr schnelle Abnahme der Konzentration an Toxaphenkongeneren in den Kotproben zu verzeichnen. Ab der Mitte der Abklingphase konnte Toxaphen nur noch in Spuren nachgewiesen werden.

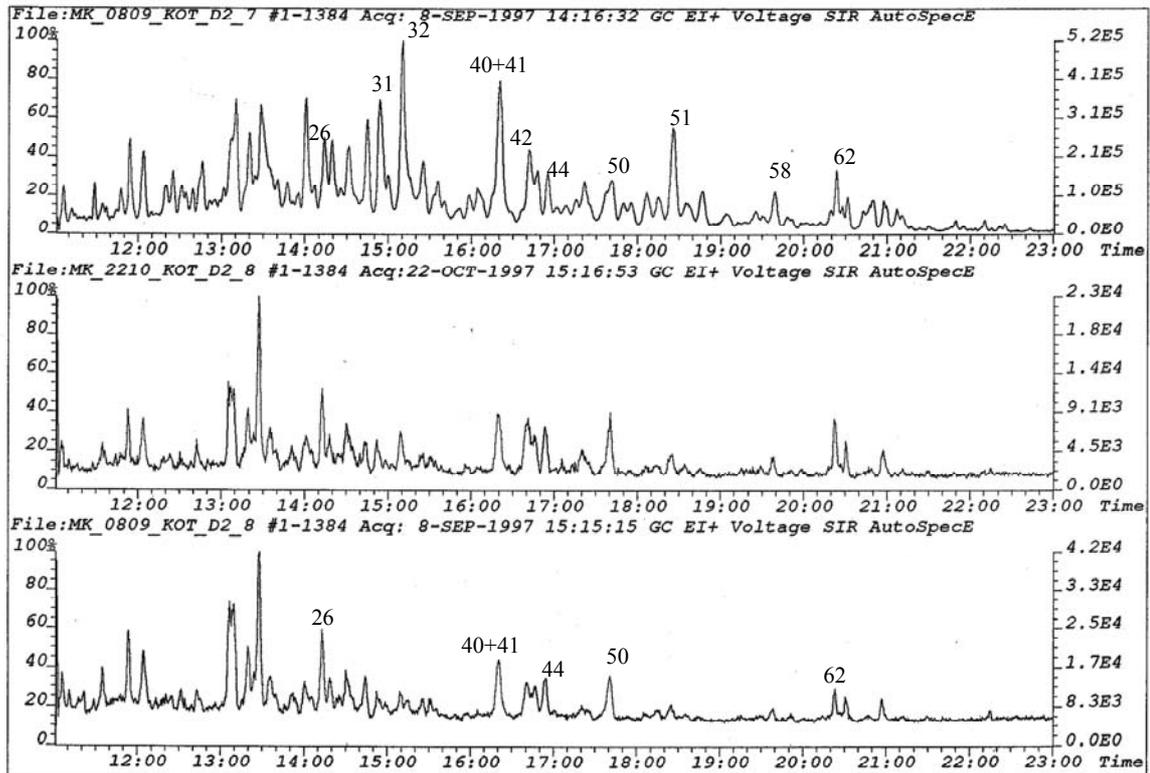


Abbildung 15: oberes Chromatogramm: Kotprobe Entnahmetermin 28.01.1997
 mittleres Chromatogramm: Kotprobe Entnahmetermin 04.02.1997
 unteres Chromatogramm: Kotprobe Entnahmetermin 04.03.1997

Wie bei den Kotproben, so konnten auch in den Blutproben ab Mitte der Abklingphase Toxaphenkongeneren nur noch in Spuren nachgewiesen werden.

Hervorzuheben ist, dass in den Blutproben zu Beginn der Abklingphase ein sehr ähnliches Chromatographiemuster wie in den Fett-, Fleisch- und Dotterproben vorlag (Ausnahme: geringerer Anteil von Parlar 69 an der Gesamtkontamination und deutlich höherer Anteil der unbekanntem Verbindung U1).

Im Verlauf der gesamten Abklingphase konnte ein ähnliches Abklingverhalten der Toxaphenkongeneren in den Blutproben parallel zu den Leberproben beobachtet werden. Auch hier zeigten sich unterschiedlich schnelle Abbauraten in den Kongenerkonzentrationen bei den einzelnen Schlachttterminen, sowie die Dominanz und Persistenz der unbekanntem Verbindung U1.

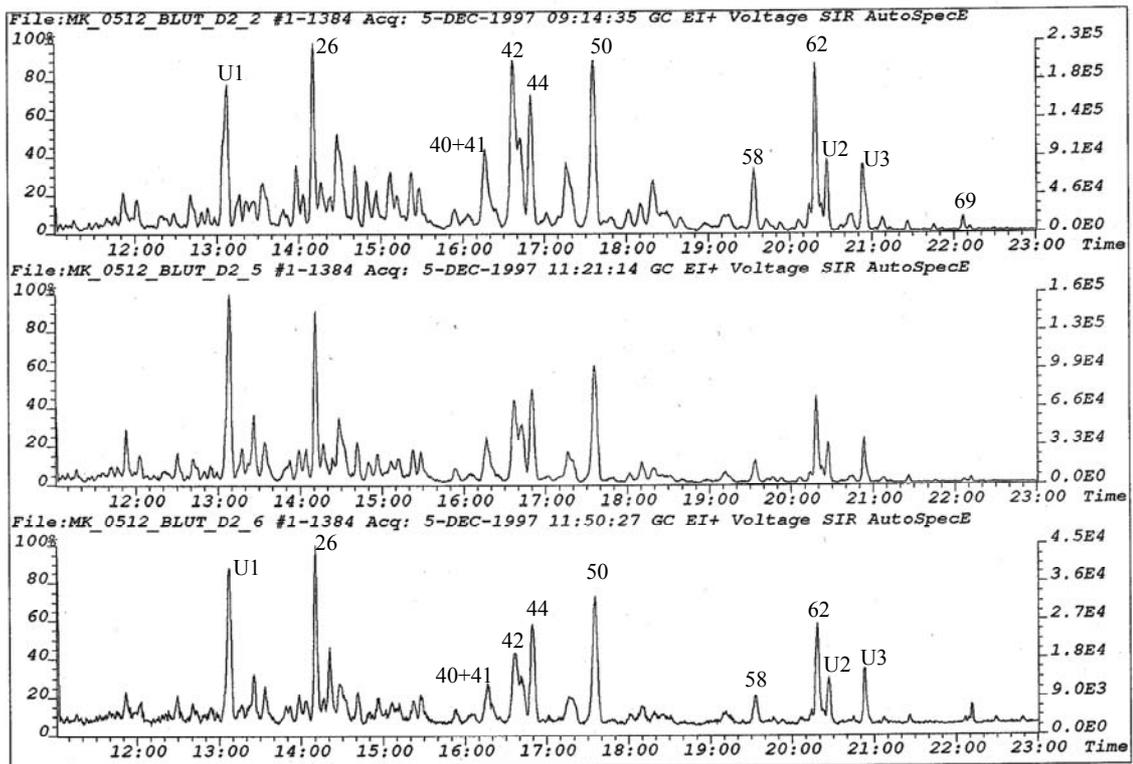


Abbildung 16: oberes Chromatogramm: Blutprobe Schlachttermin 04.02.1997
 mittleres Chromatogramm: Blutprobe Schlachttermin 04.03.1997
 unteres Chromatogramm: Blutprobe Schlachttermin 25.03.1997

5.2 Ergebnisse des Anfütterungsversuches

Die Legehennen nahmen während der Anfütterungsphase über 266 Tage kontinuierlich Toxaphen auf, was ausschließlich auf oralem Weg über das Futter erfolgte.

Untersuchungen bezüglich der Resorption und Verteilung von Toxaphen im Organismus der Tiere über die Beobachtung einer Einmalgabe wurden nicht vorgenommen. Analoge Untersuchungen wurden für Organochlorverbindungen (PCB) jedoch schon durchgeführt [102]. Da Toxaphen eine ähnlich hohe Affinität zu lipidreichen Geweben wie PCB besitzt, könnten die Wege der Resorption und der Verteilung möglicherweise denen der PCB entsprechen.

In diesem Versuchsteil sollen wichtige Fragen zur Anreicherung und zum Verbleib von Toxaphen im Tierkörper und im Ei durch eine Aufnahme kontaminierten Futters beantwortet werden. Zudem sollen Dosis-Gewebekonzentrationskurven erstellt werden, die es ermöglichen, Toxaphengehalte im Gewebe von Legehennen zu berechnen, wenn die Toxaphenkontamination im Futter bekannt ist. Vor einer Aussage über die genannten Parameter ist jedoch die Frage der Erreichung einer Toxaphen- Plateau- Konzentration (Gleichgewichtseinstellung) im Gewebe und im Ei zu klären.

5.2.1 Gleichgewichtseinstellung der Toxaphenkontamination in den verschiedenen Geweben und im Ei von Legehennen

Die Frage nach einer Gleichgewichtseinstellung kann über zwei unterschiedliche Ansätze beantwortet werden. Der erste ist die direkte Beobachtung des Konzentrationsverlaufes der verschiedenen Kongenere während des Fütterungsversuches. Bei einem zweiten Ansatz lässt sich die Einstellung des Gleichgewichts aus den biologischen Halbwertszeiten der Abklingphase zurückrechnen. Da sich die Frage nach einer erfolgten Gleichgewichtseinstellung in der Anfütterungsphase aufgrund der wenigen Messpunkte nicht mit der geforderten Zuverlässigkeit feststellen lässt, wurde für eine Betrachtung dieser Frage zusätzlich der zweite Ansatz mit verfolgt. Genauso, wie sich eine theoretische Eliminierungsrate aus der Halbwertszeit berechnen lässt, kann auch das Erreichen einer Plateau- Konzentration für die verschiedenen Kongenere berechnet werden. In Tabelle 12 sind diese Zusammenhänge näher erläutert.

Tabelle 12: Berechneter Zusammenhang zwischen Halbwertszeit ($T_{1/2} = \ln 2/\lambda$) und der Toxaphenanreicherung im Gewebe

Zeit (Angabe in $T_{1/2}$)	Anreicherungsrate (in %)
0 x $T_{1/2}$	0
1 x $T_{1/2}$	50
2 x $T_{1/2}$	75
3 x $T_{1/2}$	87,5
4 x $T_{1/2}$	93,8
5 x $T_{1/2}$	96,9
6 x $T_{1/2}$	98,4
7 x $T_{1/2}$	99,2
8 x $T_{1/2}$	99,6

Wie aus der Tabelle 12 zu sehen ist, stellt sich nach fünf bis sechs Halbwertszeiten annähernd das Plateau der Toxaphenkontamination für die verschiedenen Kongenere ein. Mit den aus Punkt 5.3.6 ermittelten biologischen Halbwertszeiten kann nun auf die notwendige Zeit für eine Gleichgewichtseinstellung rückgerechnet werden.

Tabelle 13: Rückgerechnete Zeiten für eine Einstellung des Gleichgewichtes für die Toxaphenkontamination (berechnet aus sechs biologischen Halbwertszeiten aus der Abklingphase)

Kongener	Zeit zur Erreichung der Gleichgewichtseinstellung in Tagen für			
	Depotfett	Eidotter	Niere	Muskelfleisch
Parlar 26	240	288	264	126
Parlar 40+41	132	174	174	114
Parlar 42	150	168	174	102
Parlar 44	210	234	216	132
Parlar 50	216	240	240	120
Parlar 58	216	246	306	90
Parlar 62	252	264	294	126

Bei einer Versuchsdauer der Anfütterungsphase von 266 Tagen ist also das Plateau in allen Geweben rechnerisch erreicht. Für die wenigen Kongenere, die in Tabelle 13 eine Zeit von über 266 Tage für die Gleichgewichtseinstellung aufweisen, sei darauf hingewiesen, dass die theoretische Zunahme der Konzentration gegen Ende des Anfütterungsversuches nur wenige Prozent beträgt und deshalb wenig Einfluss besitzt.

Neben der theoretischen Plateauerreichung der verschiedenen Kongenere soll nun die Plateau – Erreichung durch die Anfütterungsphase überprüft werden. Da eine Auftragung aller Werte aus allen Geweben und Gruppen nicht praktikabel ist, soll die Gleichgewichtseinstellung in den einzelnen Probenmatrizes hier nur kurz erläutert werden. In Tabelle 14 sind stellvertretend auch für andere Matrizes aus einer Versuchsgruppe die Konzentrationen der Kongenere im Depotfett während der Anfütterungsphase angeführt.

Tabelle 14: Konzentrationen der detektierten Toxaphenkongenere im Depotfett der D1-Gruppe während der Anfütterungsphase, bezogen auf das Fettgewicht

	1. Schlachttermin 9.9.1996 Gehalt in [ng / g]	2. Schlachttermin 18.11.96 Gehalt in [ng / g]	3. Schlachttermin 28.1.1997 Gehalt in [ng / g]
Parlar 11	42 ± 11	46 ± 12	54 ± 14
Parlar 21	52 ± 8	51 ± 7	78 ± 11
Parlar 25	187 ± 13	210 ± 15	235 ± 17
Parlar 26	276 ± 13	362 ± 17	352 ± 17
Parlar 31	102 ± 10	152 ± 14	151 ± 14
Parlar 32	133 ± 14	154 ± 16	182 ± 19
Parlar 40+41	151 ± 18	169 ± 20	219 ± 26
Parlar 42	584 ± 44	600 ± 46	674 ± 51
Parlar 44	147 ± 11	185 ± 14	186 ± 14
Parlar 50	567 ± 44	573 ± 44	621 ± 48
Parlar 51	229 ± 25	201 ± 22	205 ± 22
Parlar 56	126 ± 15	130 ± 14	145 ± 17
Parlar 58	437 ± 46	407 ± 43	535 ± 57
Parlar 59	95 ± 9	79 ± 7	95 ± 9
Parlar 62	652 ± 89	642 ± 87	646 ± 88
Parlar 63	32 ± 4	35 ± 5	29 ± 4
Parlar 69	96 ± 11	109 ± 12	121 ± 14

Wie aus der Tabelle 14 zu sehen ist, liegen die meisten Konzentrationsangaben über die drei Schlachttermine hinweg im Schwankungsbereich der Genauigkeit. Nur die Kongenere Parlar 40+41 und 58 weisen vom zweiten zum dritten Schlachttermin hin eine deutliche Zunahme in ihren Konzentrationen auf. Aufgrund der angeführten Gehalte und den berechneten Werten aus Tabelle 13 kann von einer Gleichgewichtseinstellung der Toxaphenkonzentration im Depotfett der Legehühnern auch bei dieser Betrachtungsweise ausgegangen werden. Es ist allerdings anzumerken, dass mit lediglich 3 Schlachtterminen eine Verlaufsbeobachtung der exponentiellen Anfütterungskurve nur bedingt möglich ist.

Aus versuchstechnischen Gründen (die maximale Ausschöpfung der Stallkapazität war erreicht) konnten jedoch keine weiteren Schlachtttermine in die Versuchsplanung mit aufgenommen werden.

Bei den Leber- und Nierenproben aus den verschiedenen Versuchsgruppen ist eine zuverlässige Aussage über das Erreichen einer Plateaukonzentration aus den Konzentrationen der verschiedenen Kongenere nicht möglich. Wie schon erwähnt, wurden einige Kongenere „verspätet“ eingebaut, was sich auch deutlich in den Gehalten widerspiegelt. Besonders deutlich ist dies bei den Kongeneren 50, 58 und 62 zu erkennen. In den Proben war je nach Versuchsgruppe vom ersten zum zweiten oder vom zweiten zum dritten Schlachtttermin eine beträchtliche Konzentrationszunahme zu verzeichnen. Mit den Möglichkeiten für einen vierten oder fünften Schlachtttermin hätte hier vermutlich eine exaktere Aussage über die Gleichgewichtseinstellung aller Kongenere getroffen werden können.

Bei Kongeneren, die diese hohe Zunahme in der Konzentration nicht zeigten, wie beim Kongener Parlar 26, wurden zwar auch Schwankungen in der Konzentration festgestellt, die aber nicht so ausgeprägt waren, so dass eine eindeutige Aussage zur Plateauerreichung über die Konzentrationen nicht korrekt zu treffen war. Nach der theoretisch durchgeführten Berechnung dürfte aber in den Nierenproben eine Gleichgewichtseinstellung vorgelegen haben.

Bei den Fleischproben ergibt sich bei der Betrachtung der Konzentrationen für die Kongenere des Toxaphens ein sehr uneinheitliches Bild. Je nach Bezug der Konzentrationen auf Frisch- oder Fettgewicht zeigte sich ein unterschiedlicher Konzentrationsverlauf während der Anfütterungsphase des Versuches.

Werden die Konzentrationen der Toxaphenkongenere auf das Frischgewicht bezogen, nehmen die Gehalte während der Anfütterung ab. Die Abnahme betrug vom ersten zum zweiten Schlachtttermin etwa ein Drittel bis die Hälfte, bezogen auf die ursprünglichen Gehalte. Nach dem zweiten Schlachtttermin nahmen die Konzentrationen nur noch leicht ab.

Werden die Toxaphengehalte auf den Fettanteil im Fleisch bezogen, so ergaben sich für einige Kongenere durchaus vergleichbare Gehalte in den Proben des ersten und letzten Schlachtttermins, während die Gehalte beim zweiten Schlachtttermin deutlich höher lagen.

Die Kongenere Parlar 58 und 62 wiederum wiesen beim ersten Schlachtermin die höchsten Gehalte auf, die dann im Verlauf der Anfütterungsphase wiederum abnahmen. Die Kongenere Parlar 40+41, 42, 63 und 69 wiesen über alle drei Termine vergleichbare Gehalte auf.

Als Grund für diese Schwankungen kann der extrem variierende Fettanteil der Fleischproben angeführt werden. Der Fettanteil in den Proben zu unterschiedlichen Schlachterminen variierte von 1 % bis 9 %. Da Toxaphen sich vor allem in fettreichem Gewebe anreichert, sind demzufolge Proben mit geringerem Fettanteil bei Bezug auf die Frischeinwaage weniger belastet.

Um diese Vorgänge für die Fleischproben, aber auch für die anderen Probenmatrizes graphisch anschaulich zu machen, wurden im Abschnitt 5.2.2 die Carry over Faktoren aus allen drei Schlachterminen in Abbildung 19 und 20 aufgetragen (Da die einzelnen Kongenere eine Konzentration im Futter von definiertem Wert besitzen, kann die Konzentrationszunahme bzw. -abnahme während der Anfütterungsphase auch über die Carry over Faktoren verfolgt werden).

Aufgrund einer größeren Anzahl von Eiproben während der Anfütterungsphase konnte die Sättigung der Toxaphenkonzentration in den Dotterproben besser beobachtet werden.

In der Abbildung 17 ist der Verlauf der Konzentrationszunahme am Beispiel des Kongeners Parlar 26 im Eidotter während der Anfütterungsphase dargestellt.

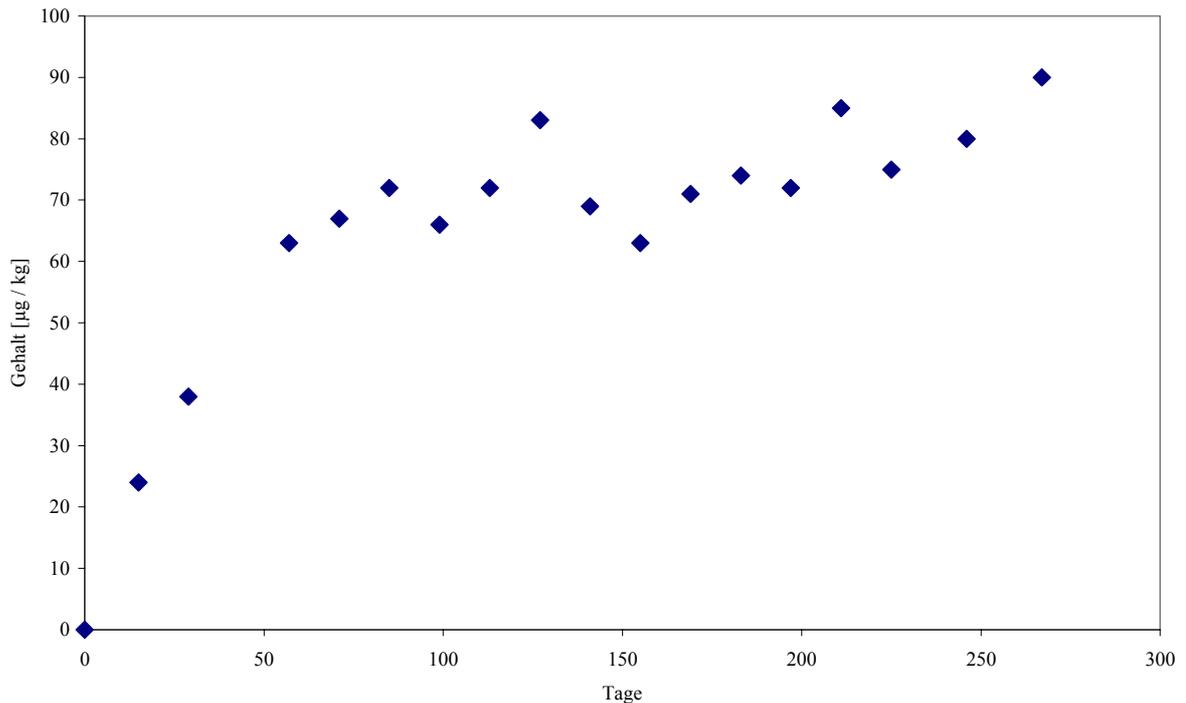


Abbildung 17: Konzentrationen des Kongener Parlar 26 im Eidotter (D1-Gruppe, bezogen auf das Frischgewicht) während der Anfütterungsphase.

In der Abbildung 17 ist in den ersten 50 Tagen ein starker Konzentrationsanstieg zu erkennen, der sich nach etwa 100 Tagen deutlich abschwächt. In der Abbildung 17 ist kein exakt exponentieller Kurvenverlauf festzustellen. Da die Eier auch zur Eliminierung von Toxaphen dienen, und die Produktion der Eier biologischen Schwankungen unterliegt, sind Schwankungen in den Gehalten nicht nur messbedingt.

An dieser Stelle ist nochmals darauf hinzuweisen, dass Toxaphen in den untersuchten Eiern fast ausschließlich im Dotter nachzuweisen war. In den Eiweißproben fanden sich nur Spuren von Toxaphen, die nur ca. 1/1000 der Gehalte in den Dotterproben betragen. Aus diesem Grund ließen sich im Eiklar keine Carry over Faktoren ermitteln. Analoges gilt auch für die Blut- und Kotproben, in denen sich aufgrund des geringen Fettgehaltes Toxaphen kaum anreichert.

5.2.2 Carry over-Faktoren

Eine wichtige Kenngröße für die Anreicherung von Schadstoffen in Organismen und Geweben ist der Carry over-Faktor. Er wird wie folgt definiert und berechnet [103]:

- Der Carry over-Faktor (Co-F) wird oft auch als Anreicherungsfaktor bezeichnet. Der Faktor ergibt sich als Quotient der Toxaphenkonzentration im Lebensmittel und der Konzentration im Futtermittel.

$$\text{Co-F} = \mu\text{g} / \text{kg Toxaphen [Gewebe]} / \mu\text{g} / \text{kg Toxaphen [Futtermittel]}$$

Aus dieser Definition ergibt sich, dass der Carry over-Faktor eine dimensionslose Größe ist. Wichtig bei der Berechnung dieses Faktors ist die Angabe, ob unter den Versuchsbedingungen ein Konzentrationsplateau im jeweiligen Gewebe erreicht wurde. Der Carry over-Faktor sollte nur aus Werten berechnet werden, die sich während einer Fütterungsstudie bei Erreichen des Konzentrationsplateaus einstellen. Bei Berechnung dieser Größe vor Erreichen der Gleichgewichtseinstellung ergeben sich zwangsläufig zu niedrige Werte. Ist eine Einstellung des Gleichgewichtes noch nicht erreicht, ist dies bei der Angabe des Faktors anzuzeigen.

Die Kenntnis des Carry over-Faktors ist für die Festlegung einer Höchstmengenregelung in Futter- und Lebensmitteln unerlässlich [103].

Der Carry over-Faktor unterliegt starken Einflüssen. Hierzu gehören insbesondere die Stabilitäten der betrachteten Verbindungen bezüglich Abbau und Metabolisierungsmechanismen. Bei der Ermittlung des Carry over-Faktors von Toxaphenkongeneren spielen zudem analytische Probleme, wie Coelutionen mit unbekanntem Toxaphenkongeneren, eine äußerst wichtige Rolle.

Wie im Abschnitt 5.2.1 gezeigt werden konnte, lag im Depotfett und im Dotter der Legehennen ein Konzentrationsplateau vor. Für die Matrizes Fleisch, Leber und Niere konnte dies über die Konzentration nicht gezeigt werden. Da aber die berechneten

Konzentrationsplateaus der Proben Depotfett und Eidotter mit den experimentellen Daten übereinstimmen, wird auch von einem Konzentrationsplateau im Fleisch, den Nieren und den Lebern ausgegangen.

Da Elutionsreihenfolge und Trennung der Toxaphenkongener auf Gaschromatographie-säulen unterschiedlicher Hersteller stark variieren, können die hier ermittelten Werte nur bedingt auf GC-Säulen anderer Belegung übertragen werden.

Für die Gehalte im Futter wurde der Median für jedes Kongener aus insgesamt 14 Einzelproben herangezogen. Mit diesen Medianen wurden für jeden Schlachttermin in der Anfütterungsphase entsprechende Carry over-Faktoren berechnet.

In den folgenden Abschnitten sollen die Carry over-Faktoren, die sich über Zugrundelegen der Daten aus dem letzten Schlachttermin für alle Gruppen ergaben, sowie die Carry over-Faktoren für die D1- Versuchsgruppe während der gesamten Anfütterungsphase (3 Schlachttermine) vorgestellt werden.

Mit Hilfe der Carry over-Faktoren zu allen drei Schlachtterminen kann, wie in Punkt 5.2.1 erwähnt, die Gleichgewichtseinstellung der Toxaphenkonzentrationen nochmals überprüft werden.

5.2.2.1 Carry over-Faktoren im Depotfett von Legehennen

Tabelle 15: Carry over-Faktoren für den Übergang von Toxaphenkongeneren aus dem Futter ins Depotfett von Legehennen nach 38-wöchiger Fütterung mit Toxaphenkontaminiertem Legehennenalleinfutter

Kongener	Gruppe A 0,1 ppm Toxaphen	Gruppe B 0,5 ppm Toxaphen	Gruppe C 1,0 ppm Toxaphen	Gruppe D1 5,0 ppm Toxaphen	Carry over - Faktor Mittelwert
Parlar 11	4,7	3,1	2,0	2,0	3
Parlar 21	4,4	7,0	6,0	6,0	6
Parlar 25	4,4	3,5	5,5	4,7	5
Parlar 26	9,8	8,4	14,8	10,2	11
Parlar 31	2,6	2,3	3,0	2,1	3
Parlar 32	2,0	1,8	2,3	1,9	2
Parlar 38	2,6	3,4	3,7	2,7	3
Parlar 39	1,3	1,5	1,4	1,0	1
Parlar 40+41	4,7	4,3	5,0	4,7	5
Parlar 42	6,4	6,6	11,1	6,7	8
Parlar 44	12,0	9,9	14,6	9,6	12
Parlar 50	15,0	12,9	16,5	12,8	14
Parlar 51	3,3	2,6	3,2	2,4	3
Parlar 56	5,3	10,3	14,8	9,6	10
Parlar 58	8,7	8,6	12,0	9,1	10
Parlar 59	2,0	2,5	3,4	2,5	3
Parlar 62	7,4	7,4	10,6	7,0	8
Parlar 63	7,1	7,4	7,6	7,9	8
Parlar 69	4,1	4,2	5,9	4,0	5

Aus der Tabelle 15 ist klar zu erkennen, dass die Carry over-Faktoren einiger Kongenere in den einzelnen Gruppen differieren. In Anbetracht der analytischen Schwankungsbreite, der Problematik der inhomogenen Verteilung von Toxaphen im Futter, sowie der natürlichen Schwankungen bei den biologischen Vorgängen in den Tieren, sind diese Schwankungen jedoch noch als gering einzustufen.

Zu den Toxaphenverbindungen mit sehr geringem Anreicherungsfaktor in Hühnern und deren Gewebe gehören die Kongenere Parlar 11, 31, 32, 38, 39, 51 und 59.

Kongenerere, die einen mittleren Anreicherungsfaktor besitzen, sind die Verbindungen Parlar 21, 25, 40+41 und 69.

Die Kongenerere Parlar 26, 42, 44, 50, 56, 58, 62 und 63 sind die Verbindungen, die das höchste Anreicherungspotential besitzen.

Das hohe Anreicherungspotential für das Kongener Parlar 56 beruht möglicherweise auf einer Coelution mit unbekanntem Toxaphenkongeneren in den Proben. Das Kongener Parlar 56 wurde als Schulter eines unbekanntem Kongeners quantifiziert. Ob die bestimmten Gehalte auch ausschließlich von diesem Kongener stammten, konnte leider nicht verifiziert werden, da bei Wiederholungen auf weiteren Gaschromatographiesäulen dieses Kongener mit dem Kongener Parlar 51 coeluierte und eine Trennung dieser beiden Kongenerere ebenfalls nicht möglich war.

Da die bestimmten Gehalte des Kongeners Parlar 56 in den Proben aber relativ niedrig waren und der Anreicherungsfaktor möglicherweise zu hoch eingeschätzt wurde, soll dieses Kongener nicht mit in die Betrachtung der anreicherungsfähigsten Kongenerere des Toxaphens eingehen.

Im Depotfett der Legehennen ergab sich für die anreicherungsfähigsten Kongenerere die folgende Reihenfolge:

$$42 \cong 63 \cong 62 < 58 < 26 < 44 < 50$$

Im folgenden sollen die Carry over-Faktoren über die gesamte Anfütterungsphase dargestellt werden, wobei nur die oben ausgewählten Kongenerere näher betrachtet wurden (zusätzlich noch Parlar 40+41 und 69). Durch die in Abbildung 18-20 dargestellten Carry over-Faktoren (18. Woche repräsentiert den ersten Schlachttermin, 28. Woche repräsentiert den zweiten Schlachttermin, 38. Woche repräsentiert den dritten Schlachttermin während der Anfütterungsphase) kann eine evtl. Zunahme der Carry over-Faktoren nur bei Nichterreicherung eines Konzentrationsplateaus beobachtet werden

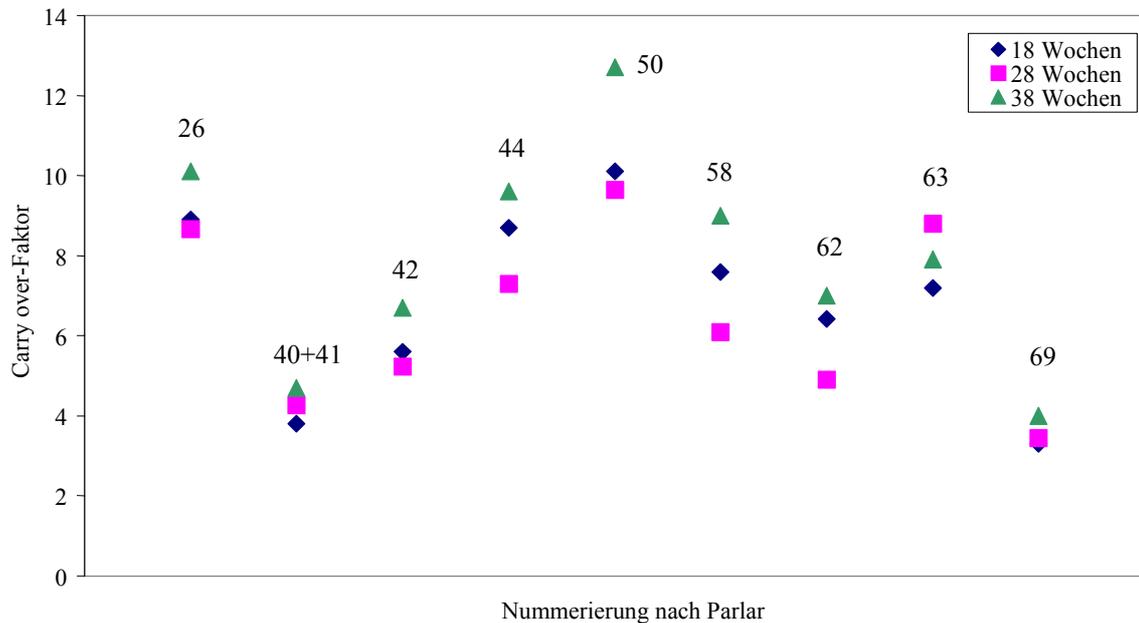


Abbildung 18: Carry over-Faktoren im Depotfett von Legehennen während der Anfütterungsphase aus drei Schlachterminen (D - Gruppe 5 ppm tech. Toxaphen)

In der Abbildung 18 ist deutlich zu beobachten, dass aus den Konzentrationen der Proben aus allen drei Schlachterminen ähnliche Carry over-Faktoren bestimmt werden konnten, was die Erreichung des Konzentrationsplateaus bestätigt. Die sich ergebenden Unterschiede liegen im Schwankungsbereich der Messgenauigkeit.

5.2.2.2 Carry over - Faktoren im Muskelfleisch von Legehennen

Im Fleisch war während der Anfütterungsphase keine eindeutige Zunahme des Toxaphengehaltes zu verzeichnen.

Der Verlauf der Toxaphengehalte in den Fleischproben während der Anfütterungsphase wird in der Abbildung 19 und 20 deutlich, die Gehalte wurden jedoch auf die Carry over-Faktoren umgerechnet.

Carry over-Faktoren

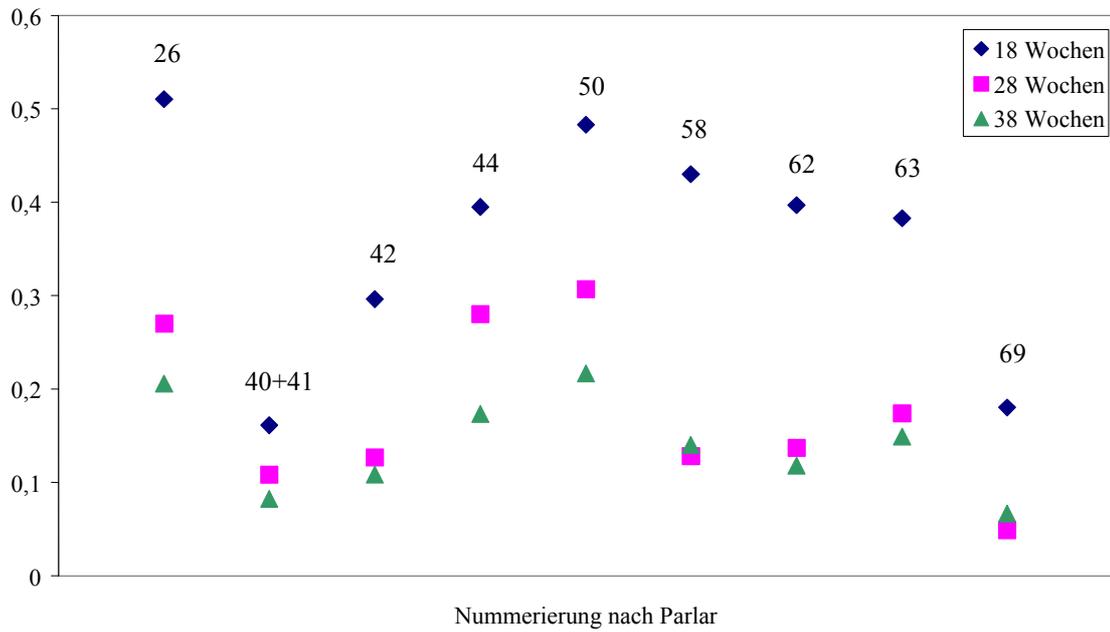


Abbildung 19: Carry over-Faktoren im Muskelfleisch von Legehennen während der Anfütterungsphase aus drei Schlachterminen bezogen auf die Frischeinwaage (D - Gruppe 5 ppm tech. Toxaphen)

Carry over-Faktoren

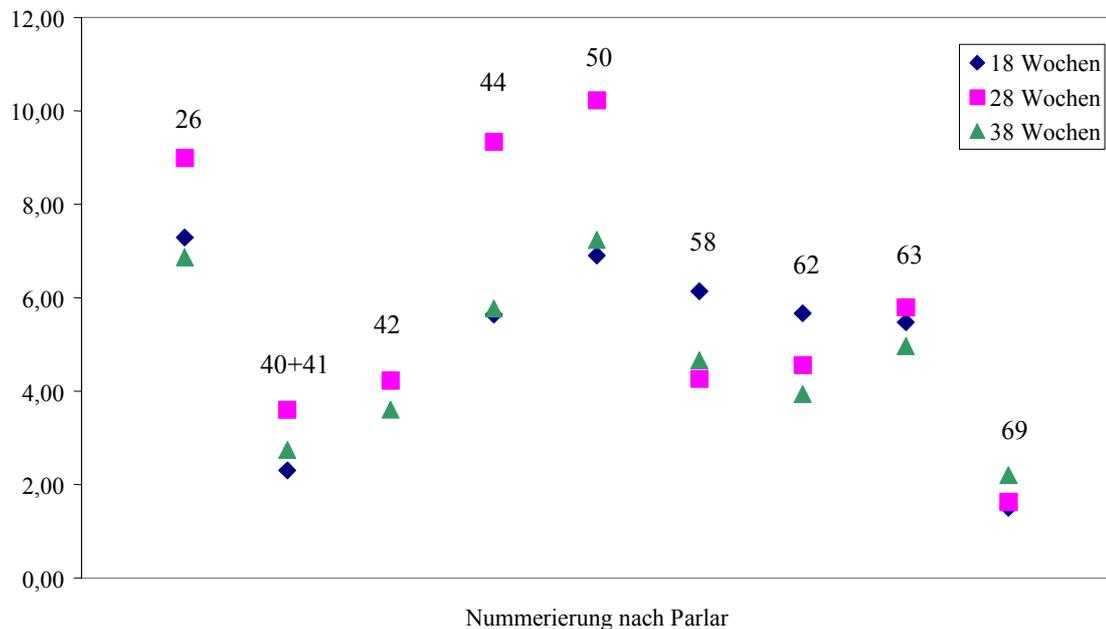


Abbildung 20: Carry over-Faktoren im Muskelfleisch von Legehennen während der Anfütterungsphase aus drei Schlachtterminen bezogen auf Fett (D - Gruppe 5 ppm tech. Toxaphen)

In Abbildung 19 ist eine Abnahme der Carry over-Faktoren während der Anfütterungsphase zu erkennen. Ursache hierfür ist der abnehmende Fettanteil im Fleisch während der Anfütterungsphase. Infolge des Rückgangs des Fettanteils im Fleisch konnte Toxaphen nicht mehr so stark im Gewebe akkumuliert werden, wodurch die Toxaphengehalte, bezogen auf das Frischgewicht, natürlich abnahmen.

Für die Belegung einer Gleichgewichtseinstellung der Toxaphenkonzentration im Fleisch wurden zusätzlich die Carry over-Faktoren, bezogen auf das Fettgewicht, ermittelt. Die daraus erhaltenen Faktoren sind in Abbildung 20 zu sehen. Für die Kongenere 40+41, 42, 62, 63 und 69 sind die Schwankungen nicht allzu groß, was für eine weitgehende Gleichgewichtseinstellung spricht. Dies war auch in Abbildung 19 zu erkennen, wo die Faktoren für den zweiten und dritten Schlachttermin bei den meisten Kongeneren eng beieinander lagen (die Proben aus dem zweiten und dritten Termin zeigten ähnliche Fettanteile und waren somit besser vergleichbar).

In Abbildung 20 ist jedoch zu erkennen, dass nicht der letzte Schlachtermin (nach 38-wöchiger Toxaphenaufnahme) die höchsten Faktoren liefert. Daher wurde in Tabelle 16 der Bereich der Carry over-Faktoren für Fleisch über die gesamte Anfütterung im Sinne einer "worst case Betrachtung" in Form von Bereichen angegeben.

Tabelle 16: Carry over - Faktoren für den Übergang von Toxaphenkongeneren aus dem Futter ins Muskelfleisch von Legehennen nach 18 bis 38-wöchiger Anfütterung mit technischem Toxaphen (D2-Gruppe)

	Parlar 26	Parlar 42	Parlar 44	Parlar 50	Parlar 58	Parlar 62
Carry over - Faktor	0,3 – 0,7	0,2 - 0,4	0,2 - 0,6	0,3 - 0,7	0,2 - 0,5	0,2 - 0,5

5.2.2.3 Carry over-Faktoren in Leber und Niere von Legehennen

In den Leber- und Nierenproben wurde während der Anfütterungsphase kein einheitlicher Einbau von Toxaphen ins Gewebe festgestellt. Zudem wiesen die Carry over-Faktoren für den letzten Schlachtermin in den einzelnen Gruppen große Abweichungen zueinander auf, die eine Ermittlung eines zuverlässigen Carry over-Faktor nicht zulassen. Die großen Schwankungen der Toxaphengehalte in den Lebern und Nieren lassen sich mit biologischen Transportvorgängen und Metabolisierungen durch Enzyme während des Versuches erklären, eine weitergehende Betrachtung wird in der Diskussion vorgenommen. Vollständigkeitshalber wurden die Ergebnisse der Carry over-Faktoren-Berechnungen in Tabelle 17 und 18 zusammengefasst.

Tabelle 17: Carry over-Faktoren für den Übergang von Toxaphenkongeneren aus dem Futter in die Leber von Legehennen nach 38-wöchiger Anfütterung mit technischem Toxaphen bezogen auf das Frischgewicht

Kongener	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D1
Parlar 26	0,90	0,78	0,36	1,58
Parlar 31	0,27	0,16	0,09	0,37
Parlar 32	0,17	0,11	0,06	0,28
Parlar 40+41	0,42	0,37	0,16	0,73
Parlar 42	0,68	0,68	0,30	0,94
Parlar 44	1,33	0,98	0,52	2,01
Parlar 50	1,04	0,93	0,35	1,6
Parlar 56	0,29	0,16	0,09	---
Parlar 58	0,34	0,32	0,17	0,93
Parlar 62	0,06	0,58	0,24	1,06
Parlar 63	0,58	0,52	0,19	1,60
Parlar 69	---	0,04	0,04	0,11

Tabelle 18: Carry over-Faktoren für den Übergang von Toxaphenkongeneren aus dem Futter in die Nieren von Legehennen nach 38-wöchiger Anfütterung mit technischem Toxaphen bezogen auf das Frischgewicht

Kongener	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D1
Parlar 26	0,57	0,52	0,92	0,73
Parlar 31	0,20	0,13	0,20	0,18
Parlar 32	0,14	0,09	0,13	0,14
Parlar 40+41	0,28	0,22	0,36	0,38
Parlar 42	0,35	0,40	0,67	0,44
Parlar 44	0,83	0,72	1,24	0,90
Parlar 50	0,84	0,68	0,96	0,89
Parlar 56	0,22	0,16	0,27	0,04
Parlar 58	0,23	0,22	0,43	0,43
Parlar 62	0,31	0,35	0,55	0,55
Parlar 63	0,32	0,40	0,48	0,89
Parlar 69	0,04	0,05	0,05	0,05

Aufgrund der variierten Werte der Carry over-Faktoren in allen Gruppen für die Gewebe Leber und Nieren können keine exakten Carry over-Faktoren ermittelt werden. Es zeigte sich jedoch, dass Niere und Leber von Legehennen nicht zu den Gewebearten gehören, in denen sich Toxaphen anreichert.

5.2.2.4 Carry over -Faktoren in Eidotter von Legehennen

In der Tabelle 19 sind die Carry over-Faktoren aller Gruppen aufgeführt, die sich aus den Gehalten der letzten Werte der Anfütterungsphase ergaben.

Tabelle 19: Carry over-Faktoren für den Übergang von Toxaphenkongeneren aus dem Futter ins Ei (Dotter) von Legehennen nach 38-wöchiger Anfütterung mit technischem Toxaphen

Kongenere	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D1	Mittelwert Carry over-Faktor
Parlar 26	1,5	2,5	2,2	2,5	2,2
Parlar 31	0,5	0,6	0,6	0,4	0,5
Parlar 32	0,3	0,5	0,4	0,4	0,5
Parlar 40+41	0,6	1,0	0,9	0,7	0,8
Parlar 42	0,9	1,8	1,5	1,4	1,4
Parlar 44	1,5	2,3	2,4	2,3	2,1
Parlar 50	2,2	3,2	2,5	2,3	2,6
Parlar 56	0,8	1,2	1,3	1,9	1,3
Parlar 58	1,0	1,8	1,8	1,9	1,6
Parlar 62	0,9	2,4	1,5	1,7	1,6
Parlar 63	0,9	1,9	1,3	2,3	1,6
Parlar 69	0,3	1,7	1,0	1,3	1,1

Aus der Tabelle ist die gute Übereinstimmung der Carry over-Faktoren zwischen den Gruppen B, C und D1 zu sehen. Lediglich die Carry over-Faktoren aus der Gruppe A sind für die meisten Kongenere deutlich geringer als in den anderen Gruppen.

Für die Dotterproben wurden die Carry over - Faktoren zu allen drei Schlachterminen während der Anfütterungsphase für die Gruppe D1 in Abbildung 21 dargestellt.

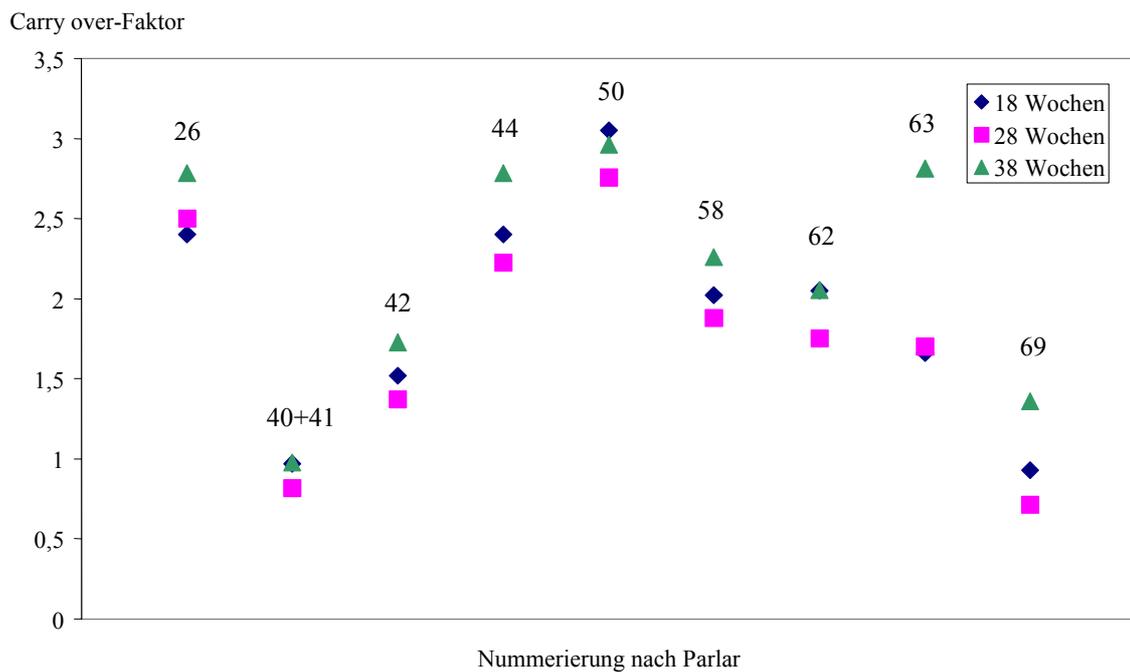


Abbildung 21: Carry over-Faktoren im Eidotter von Legehennen während der An-
fütterungsphase aus drei Schlachttermine (D - Gruppe 5 ppm tech. Toxaphen)

Wie in der Abbildung 21 zu erkennen ist, unterscheiden sich die Faktoren nach 18-, 28- und 38-wöchiger Toxaphenaufnahme nur wenig. Aufgrund der sehr ähnlichen Carry over - Faktoren für alle drei Schlachttermine kann von einer Gleichgewichtseinstellung der Toxaphenkonzentration in den Dotterproben ausgegangen werden, was in Einklang mit der theoretisch berechneten Gleichgewichtseinstellung und der beobachteten Gehaltszunahme (Abbildung 17) steht.

5.2.3 Bilanzierung zum Verbleib des aufgenommenen Toxaphens in der Legehenne

In diesem Teil der Arbeit soll der Versuch einer Bilanzierung über den Verbleib des Toxaphens im Körper der Legehennen unternommen werden. Die Eliminierungsrate von Toxaphen über den Kot und die Eier wurde berechnet und die Carry over-Raten ermittelt.

Aus der Bilanzierung ergeben sich Carry over-Raten, die wie folgt definiert werden können:

- Die Carry over-Rate gibt die aufsummierten Dosisanteile in Prozent an, die nach Einzel- und Mehrfachdosen zeitabhängig im Lebensmittel wiedergefunden werden [103]. Die Carry over-Rate gibt schließlich in Prozent an, wieviel von einem Substanz ins Tier gelangte.

Zur Ermittlung der über das Futter aufgenommenen Toxaphenmenge wurden für jede Versuchsgruppe 14 mit Toxaphen kontaminierte und homogenisierte Futterproben quantifiziert. Aus den nachgewiesenen Konzentrationen wurde für jedes Kongener die Median-Konzentration zur weitergehenden Berechnung herangezogen.

Bei einem Futterverbrauch von durchschnittlich 0,117 kg pro Tier und Tag über einen Zeitraum von 38 Wochen nahmen die Legehennen von jedem Kongener die in Tabelle 20 angeführten Stoffmengen zu sich.

Tabelle 20: Aufgenommene Menge an Toxaphenkongeneren während der Anfütterungsphase (38 Wochen bei 0,117 kg Futterverbrauch pro Henne und Tag)

	Gruppe A 0,1 ppm tech. Toxaphen	Gruppe B 0,5 ppm tech. Toxaphen	Gruppe C 1,0 ppm tech. Toxaphen	Gruppe D 5,0 ppm tech. Toxaphen
	Aufnahme in [µg]			
tech. Toxaphen	3.100	15.500	31.000	156.000
Parlar 11	25	99	176	830
Parlar 21	17	42	77	406
Parlar 25	63	210	285	1571
Parlar 26	46	140	174	1072
Parlar 31	81	270	292	2296
Parlar 32	115	338	498	2946
Parlar 38	29	81	101	662
Parlar 39	17	53	76	432
Parlar 40+41	57	176	261	1449
Parlar 42	110	325	491	3138
Parlar 44	24	74	92	600
Parlar 50	44	154	278	1515
Parlar 51	98	275	482	2630
Parlar 56	16	45	73	469
Parlar 58	63	181	275	1839
Parlar 59	42	120	215	1181
Parlar 62	89	277	481	2850
Parlar 63	6	16	33	114
Parlar 69	25	80	150	942

Zur Berechnung der Carry over-Raten wurden folgende Daten herangezogen:

Legeleistung:	95 %
Mittleres Eigewicht:	60 g
Dotteranteil:	37 %

Da sich Toxaphen im Eiklar nicht anreichert, ist für die Ermittlung der Carry over-Raten nur der Eidotter von Interesse. Unter Einbeziehung der oben angeführten Daten ergibt sich über den Versuchszeitraum von 266 Tagen somit eine Eidottergesamtmasse von 5,6 kg.

Für die Eliminierung von Toxaphen über den Kot wurde mit einer ausgeschiedenen Kotmenge von 0,130 kg pro Tier und Tag gerechnet. Über die gesamte Versuchsdauer ergeben sich somit eine Menge von 34,6 kg Kot pro Tier.

Für den Verbleib von Toxaphen im Tierkörper wurde ein mittleres Schlachtgewicht von 1,55 kg zugrunde gelegt. Mit einem Fettanteil von 15 %, bezogen auf das Schlachtgewicht ergeben sich damit 0,25 kg anreicherungsfähige Gewebeanteile.

In den Kot- und Eierproben zeigten sich während der Anfütterung steigende Konzentrationen, so dass nicht immer der gleiche Gehalt an Toxaphen eliminiert wurde. Als Berechnungsgrundlage wurden über einen Zeitraum von mehreren Wochen die Mediane der Toxaphenkonzentrationen berechnet und anschließend aufsummiert. In Tabelle 28 sind die so ermittelten Carry over-Raten für die D1-Versuchsgruppe nach 38-wöchiger Anfütterung aufgeführt.

Tabelle 21: Carry over-Raten in [%] der mit dem Futter aufgenommenen Toxaphenmengen in Hühnern, Kot und Ei;

Kongener	Verbleib im Tierkörper [%]	Eliminierung über den Kot [%]	Eliminierung über Eier [%]
Parlar 26	6	4	34
Parlar 31	2	4	7
Parlar 32	1	4	6
Parlar 40+41	4	5	14
Parlar 42	5	2	22
Parlar 44	7	4	31
Parlar 50	10	2	37
Parlar 58	7	2	25
Parlar 62	5	2	22
Parlar 63	6	6	29
Parlar 69	3	1	14

In den weiteren Versuchsgruppen ergaben sich bis auf geringe Unterschiede sehr ähnliche Carry over-Raten, so dass diese Werte hier nicht mit angeführt wurden. Bei den Gruppen A und C wurden an den Kotproben Carry over-Raten ermittelt, die teilweise um den Faktor 2 höher waren als die in Tabelle 21 aufgelisteten Faktoren. Trotz der höheren Raten in diesen Versuchsgruppen, ergaben sich für die Kotproben sehr geringe Carry over-Raten, so dass eine höhere Ausscheidung von unmetabolisiertem Toxaphen über den Kot in diesen Gruppen kaum eine Rolle spielt.

5.2.4 Dosis- Gewebekonzentrationskurven

Aus den gemessenen Toxaphen-Gewebekonzentrationen können unter Zuhilfenahme der Toxaphen-Futterkonzentration Dosis-Gewebekonzentrationskurven abgeleitet werden.

Dazu wurden die jeweiligen Toxaphenkongener-Gewebekonzentrationen gegen die entsprechenden Konzentrationen im Futter der jeweiligen Versuchsgruppen aufgetragen. In Abbildung 22 sind die sich ergebenden Kurven beispielhaft für das Kongener Parlar 50 in Depotfett, Dotter und Fleisch angeführt.

In der Auftragung erhält man Geraden, die den Anreicherungsverlauf für das betrachtete Kongener im entsprechenden Gewebe widerspiegeln. Je nach betrachtetem Schlachtzeitpunkt ergeben sich unterschiedliche Geradengleichungen, wenn die Gleichgewichtseinstellung der Toxaphenkonzentration noch nicht erfolgt ist. Zur Verdeutlichung dieses Sachverhaltes wurden in den folgenden Tabellen die Dosis-Gewebekonzentrationskurven für alle drei Schlachttermine bzw. fünf Entnahmetermine (für die Dotterproben) berechnet. Aus den entsprechenden Dosis-Gewebe-Konzentrationskurven erhält man Informationen, welche Konzentration sich in einem Gewebe einstellt, wenn Legehennen Toxaphen-kontaminiertes Futter erhalten. In diesem Abschnitt werden Dosis-Gewebekonzentrationskurven für die Kongenere ermittelt, die die anreicherungsfähigsten und persistentesten Toxaphenverbindungen in Legehennen darstellen.

Tabelle 22: Dosis-Gewebekonzentrationskurven für das Kongener Parlar 26; die Signifikanz der Korrelationskoeffizienten liegt zwischen 95 und 99,9 %.

Gewebe	Schlachttermin bzw. Entnahmetermin	Geradengleichung	Korrelationskoeffizient
Fett	38. Woche	$y = 10,3 x - 4,6$	0,9998
	28. Woche	$y = 11,9 x - 6,7$	0,9978
	18. Woche	$y = 8,9 x + - 6,5$	0,9981
Muskel [Frischgewicht]	38. Woche	$y = 0,19 x + 0,47$	0,9958
	28. Woche	$y = 0,29 x - 0,53$	0,9961
	18. Woche	$y = 0,52 x - 0,24$	0,9958
Eidotter [Fettgewicht]	38. Woche	$y = 8,70 x + 4,02$	0,9984
	28. Woche	$y = 8,05 x - 0,91$	0,9960
	18. Woche	$y = 7,64 x + 1,36$	0,9983
	7. Woche	$y = 5,58 x - 3,79$	0,9999
	3. Woche	$y = 3,59 x - 0,45$	0,9983

Tabelle 23: Dosis-Gewebekonzentrationskurven für das Kongener Parlar 42; die Signifikanz der Korrelationskoeffizienten liegt zwischen 95 und 99,9 %.

Gewebe	Schlachttermin bzw. Entnahmetermin	Geradengleichung	Korrelationskoeffizient
Fett	38. Woche	$y = 6,68 x - 0,89$	0,9987
	28. Woche	$y = 8,16 x - 5,65$	0,9762
	18. Woche	$y = 5,70 x - 5,76$	0,9956
Muskel [Frischgewicht]	38. Woche	$y = 0,09 x + 1,41$	0,9917
	28. Woche	$y = 0,13 x - 0,50$	0,9966
	18. Woche	$y = 0,29 x + 0,43$	0,9898
Eidotter [Fettgewicht]	38. Woche	$y = 5,41 x + 7,03$	0,9853
	28. Woche	$y = 4,35 x + 7,57$	0,9969
	18. Woche	$y = 4,75 x + 11,4$	0,9789
	7. Woche	$y = 3,30 x + 2,92$	0,9983
	3. Woche	$y = 2,90 x - 0,696$	0,9995

Tabelle 24: Dosis-Gewebekonzentrationskurven für das Kongener Parlar 44; die Signifikanz der Korrelationskoeffizienten liegt zwischen 95 und 99,9 %.

Gewebe	Schlachttermin bzw. Entnahmetermin	Geradengleichung	Korrelationskoeffizient
Fett	38. Woche	$y = 9,54 x + 1,41$	0,9999
	28. Woche	$y = 11,32 x - 0,80$	0,9886
	18. Woche	$y = 8,34 x - 1,11$	0,9976
Muskel [Frischgewicht]	38. Woche	$y = 0,16 x + 0,34$	0,9959
	28. Woche	$y = 0,29 x - 0,24$	0,9960
	18. Woche	$y = 0,38 x + 0,33$	0,9759
Eidotter [Fettgewicht]	38. Woche	$y = 8,82 x + 0,36$	0,9875
	28. Woche	$y = 7,10 x + 1,41$	0,9942
	18. Woche	$y = 7,55 x + 2,85$	0,9983
	7. Woche	$y = 5,68 x - 2,09$	0,9999
	3. Woche	$y = 4,02 x - 0,60$	0,9994

Tabelle 25: Dosis-Gewebekonzentrationskurven für das Kongener Parlar 50; die Signifikanz der Korrelationskoeffizienten liegt zwischen 95 und 99,9 %.

Gewebe	Schlachttermin bzw. Entnahmetermin	Geradengleichung	Korrelationskoeffizient
Fett	38. Woche	$y = 12,70 x + 2,18$	0,9973
	28. Woche	$y = 14,30 x + 2,56$	0,9735
	18. Woche	$y = 9,99 x - 6,2$	0,9911
Muskel [Frischgewicht]	38. Woche	$y = 0,20 x + 1,13$	0,9917
	28. Woche	$y = 0,32 x - 0,79$	0,9940
	18. Woche	$y = 0,47 x + 0,93$	0,9835
Eidotter [Fettgewicht]	38. Woche	$y = 9,23 x + 8,00$	0,9788
	28. Woche	$y = 8,85 x + 1,41$	0,99757
	18. Woche	$y = 8,64 x + 6,57$	0,9858
	7. Woche	$y = 5,53 x + 3,59$	0,9986
	3. Woche	$y = 4,90 x - 0,35$	0,9990

Tabelle 26: Dosis-Gewebekonzentrationskurven für das Kongener Parlar 58; die Signifikanz der Korrelationskoeffizienten liegt zwischen 95 und 99,9 %.

Gewebe	Schlachttermin bzw. Entnahmetermin	Geradengleichung	Korrelations-koeffizient
Fett	38. Woche	$y = 9,11 x - 4,35$	0,9924
	28. Woche	$y = 7,99 x + 4,52$	0,9934
	18. Woche	$y = 6,66 x + 2,11$	0,9981
Muskel [Frischgewicht]	38. Woche	$y = 0,12 x + 0,93$	0,9902
	28. Woche	$y = 0,13 x - 0,32$	0,9967
	18. Woche	$y = 0,43 x - 0,19$	0,9942
Eidotter [Fettgewicht]	38. Woche	$y = 7,10 x + 4,87$	0,9927
	28. Woche	$y = 6,01 x + 2,54$	0,9979
	18. Woche	$y = 6,40 x + 4,48$	0,9654
	7. Woche	$y = 3,77 x + 2,76$	0,9978
	3. Woche	$y = 3,01 x - 0,72$	0,99975

Tabelle 27: Dosis-Gewebekonzentrationskurven für das Kongener Parlar 62; die Signifikanz der Korrelationskoeffizient liegen zwischen 95 und 99,9 %.

Gewebe	Schlachttermin bzw. Entnahmetermin	Geradengleichung	Korrelationskoeffizient
Fett	38. Woche	$y = 7,04 x + 0,52$	0,9985
	28. Woche	$y = 8,60 x + 6,65$	0,9767
	18. Woche	$y = 6,23 x - 4,27$	0,9707
Muskel [Frischgewicht]	38. Woche	$y = 0,10 x + 1,64$	0,9865
	28. Woche	$y = 0,14 x - 0,69$	0,9960
	18. Woche	$y = 0,40 x - 0,06$	0,9935
Eidotter [Fettgewicht]	38. Woche	$y = 6,56 x - 5,13$	0,9887
	28. Woche	$y = 5,60 x + 4,87$	0,9978
	18. Woche	$y = 5,49 x + 6,97$	0,9983
	7. Woche	$y = 2,66 x + 11,1$	0,9931
	3. Woche	$y = 2,22 x - 5,27$	0,9897

Die angeführten x-Achsen-Werte im Graphen stehen für die Toxaphenkonzentration im Futter, während die y-Achsen-Werte die Toxaphenkonzentration im Gewebe angeben. Bei der Fütterung von Legehühnern mit Futter, das mit 30 µg/kg des Kongeners Parlar 50 kontaminiert ist, würde sich nach der Dosis-Gewebekonzentrationskurve nach 18wöchiger Futteraufnahme eine Konzentration dieses Kongeners von 279 µg /kg im Dotter (bezogen auf das Fettgewicht) ergeben.

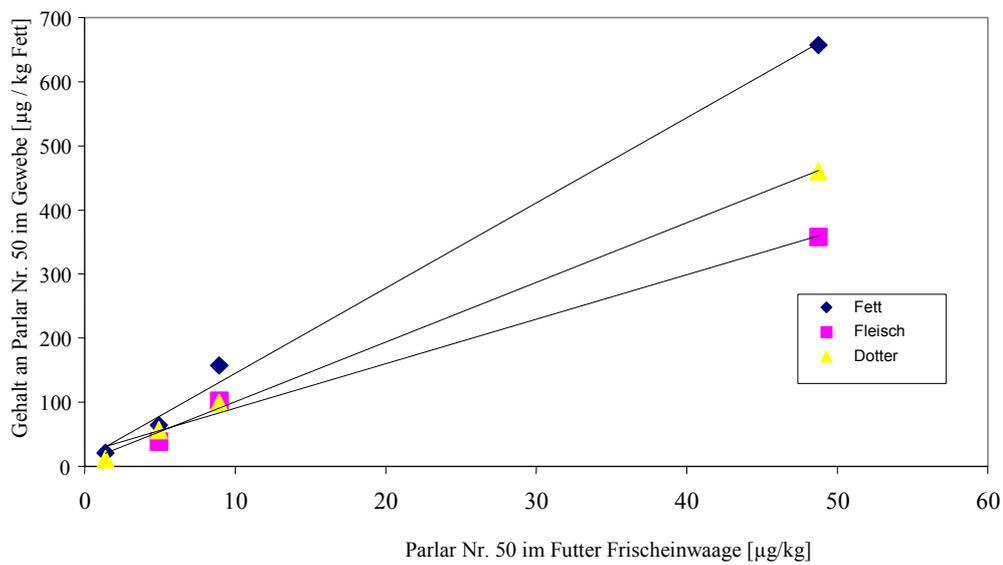


Abbildung 22: Dosis-Gewebekonzentrationskurven für das Toxaphenkongener Parlar 50 im Detpotfett und Fleisch von Legehennen, sowie im Eidotter bezogen auf das Fettgewicht

5.3 Abklingverhalten und biologische Halbwertszeiten von Toxaphenkongeneren

Mit Ergebnissen aus diesem Versuchsteil können Aussagen über eine Plateauerreichung der Toxaphenkontamination in den Geweben der Legehennen sowie im Ei getroffen werden, die eine Ermittlung des Carry over Faktors erleichtern bzw. bestätigen.

An dieser Stelle soll zunächst das Abklingverhalten der Toxaphenkontamination näher untersucht werden. Hauptziel ist es dabei, die biologischen Halbwertszeiten $T_{1/2}$ (die Zeit, in der sich bei Abbruch der Zufuhr ein Stoff infolge des Abbaus im Tierkörper bzw. seiner Wiederausscheidung um die Hälfte reduziert) für die verschiedenen Toxaphenkongeneren zu ermitteln.

Durch den Vergleich der biologischen Halbwertszeiten der untersuchten Toxaphenkongeneren können die persistenteren Kongeneren ermittelt werden, die aus diesem Grund auch größere Relevanz in der Toxaphenrückstandsproblematik besitzen. Vergleiche der biologischen Halbwertszeiten von Kongeneren mit anderen chlorierten Xenobiotika können evtl. Fragen zum Verbleib von Toxaphen in der Umwelt beantworten helfen.

Zur Ermittlung der biologischen Halbwertszeit kann das Zerfallsgesetz für den radioaktiven Zerfall herangezogen werden [100]:

$$N = N_0 e^{-\lambda t} \quad [1]$$

wobei λ die Zerfallskonstante ist.

Unter der Bedingung, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt die Zahl der vorhandenen Teilchen nur noch halb so groß ist [2], kann die Halbwertszeit $T_{1/2}$ durch Einsetzen von [2] in Gleichung [1] berechnet werden.

$$N = N_0/2 \quad [2]$$

Daraus folgt:

$$T_{1/2} = \ln 2 / \lambda = 0,693 / \lambda \quad [3]$$

Zur graphischen Ermittlung der Zerfallskonstante bzw. der Abklingkonstante λ muss der

abnehmende Toxaphengehalt der Kongenere nach Absetzen des kontaminierten Futters gegen die Zeit aufgetragen werden.

Unter diesen Versuchsbedingungen erhält man in den meisten Fällen eine Kurve mit exponentiellem Charakter. Aus der Gleichung dieser Kurve kann die Abklingkonstante direkt abgelesen werden. Werden die Toxaphengehalte logarithmisch aufgetragen, so ergibt die Steigung der dabei erhalten Geraden die Abklingkonstante λ .

5.3.1 Abklingverhalten und biologische Halbwertszeiten von Toxaphenkongeneren im Depotfett von Legehennen

Gegen Ende des Abklingversuches sind 10 Kongenere in den Chromatogrammen der Fettproben noch sehr gut zu detektieren. Acht dieser Verbindungen konnten mit dem 22 Komponentenstandard identifiziert werden (Parlar 26, 40+41, 42, 44, 50, 58, 62 und 69). Zwei Komponenten in den Fettproben konnten nicht identifiziert werden und sind deshalb mit U2 und U3 in den Chromatogrammen bezeichnet.

Die in diesem Abschnitt ermittelten Halbwertszeiten für die Matrix Hühnerfett wurden durch Quantifizierung der Proben auf einer weiteren Gaschromatographiesäule (Optima 17 der Firma Machery und Nagel 50m x 0,25mm x 0,25 μ m Temperaturprogramm Punkt 6.2.1) bestätigt. Infolge der unterschiedlichen Trenneigenschaften dieser GC-Säule zu der bei den übrigen Proben verwandte DB 5 GC-Säule konnten zusätzlich Halbwertszeiten für die Kongenere Parlar Nr. 40, 41, 42a und 42b ermittelt werden.

In den Fettproben, und auch in den übrigen Geweben, konnten die Verbindungen Parlar 12 und 15 nicht detektiert werden. Für die Kongenere Parlar 38 und 39 ergaben sich zum Teil Coelutionen, so dass die Integrationslinie zur Festlegung der Peakfläche nicht immer einwandfrei festgelegt werden konnte. Aus diesem Grund wurden diese Kongenere auch nicht in die Auswertung mit aufgenommen.

Zur Ermittlung der Halbwertszeiten wurden die gemessenen Toxaphengehalte gegen die Zeit aufgetragen. Damit die Höhe des Toxaphenrückstandes in den Geweben der Hühner und im Ei aus den folgenden Graphiken leichter abgelesen werden kann, wurde auf eine logarithmische Auftragung der Werte verzichtet.

Graphische Auftragung des Abklingverhaltens von Toxaphen im Depotfett von Legehennen

Da die Depotfettproben nahezu aus 100 % extrahierbarem Anteil bestanden, gelten die in den folgende Graphiken aufgetragenen Gehalte sowohl auf das Frisch-, als auch auf das Fettgewicht bezogen.

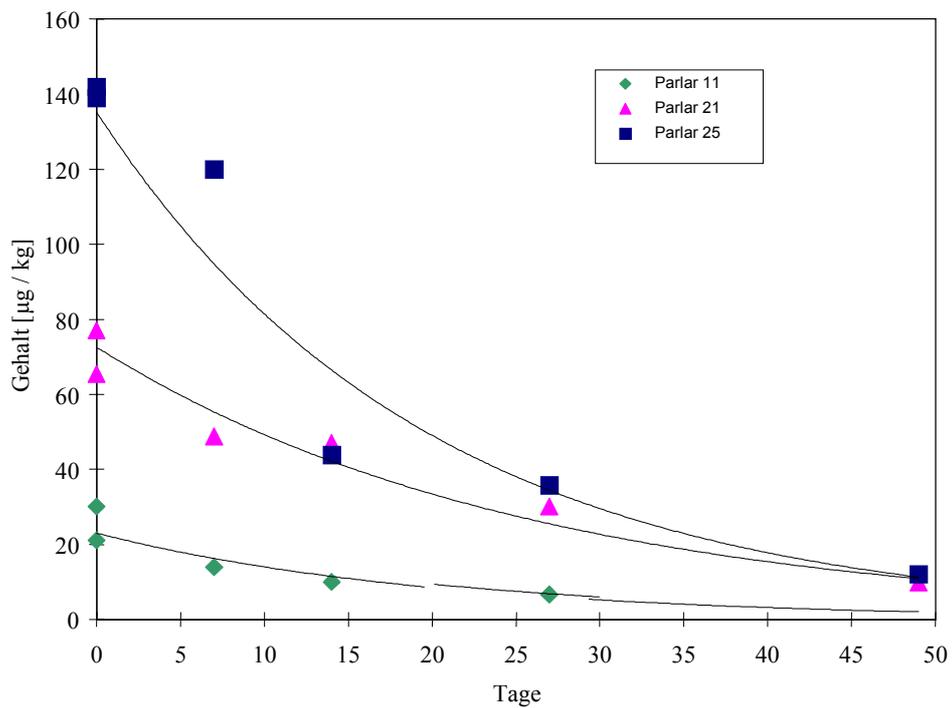


Abbildung 23: Abklingkurven für die Kongenere Parlar 11, 21 und 25 im Fett von Legehennen

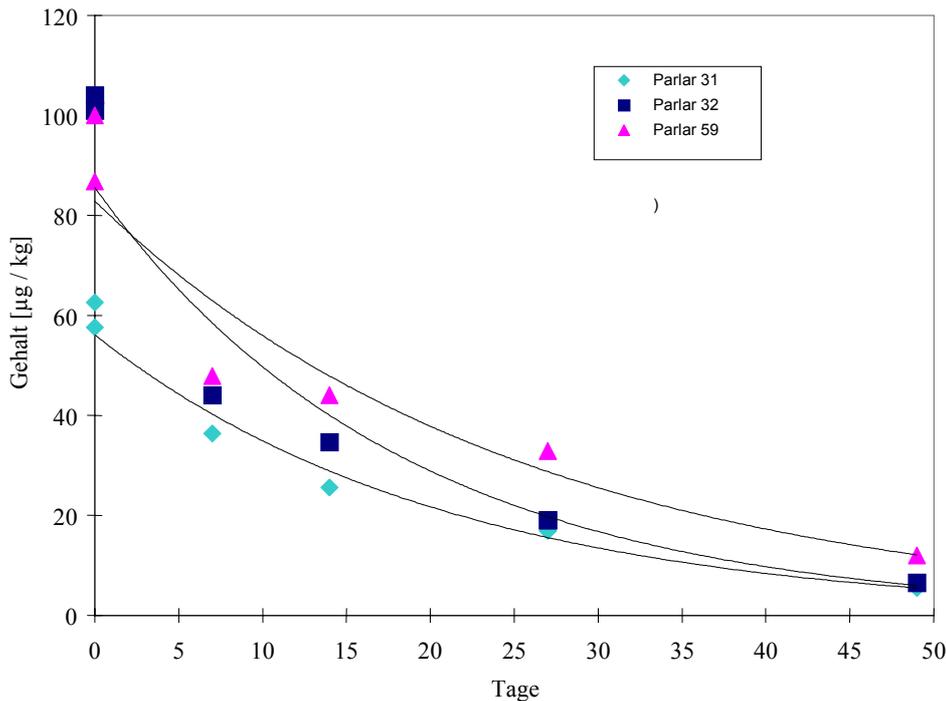


Abbildung 24: Abklingkurven für die Kongenere Parlar 31, 32 und 59 im Fett von Legehennen

In den Abbildungen 23 und 24 ist ein relativ schneller Abbau, ausgehend von einer nur mäßigen Anreicherung der betrachteten Kongenere, zu beobachten. Zur Berechnung der Halbwertszeit wurden nur die ermittelten Konzentrationen aus den ersten fünf Schlachterminen des Abklingversuches herangezogen. Zum Zeitpunkt des sechsten und siebten Schlachtermins waren diese Kongenere nur noch in sehr geringen Konzentrationen, nahe der Nachweisgrenze, zu detektieren.

Für die weiteren Gewebe- (Dotter, Fleisch, Leber, Niere) und Kotproben ergaben sich aufgrund des geringeren Fettanteils deutlich höhere Nachweisgrenzen, die eine einwandfreie Detektion der Kongenere Parlar 11, 21, 25, 31, 32 und 59 erschwerten. Die biologischen Halbwertszeiten für diese Kongenere wurden daher nur im Depotfett bestimmt.

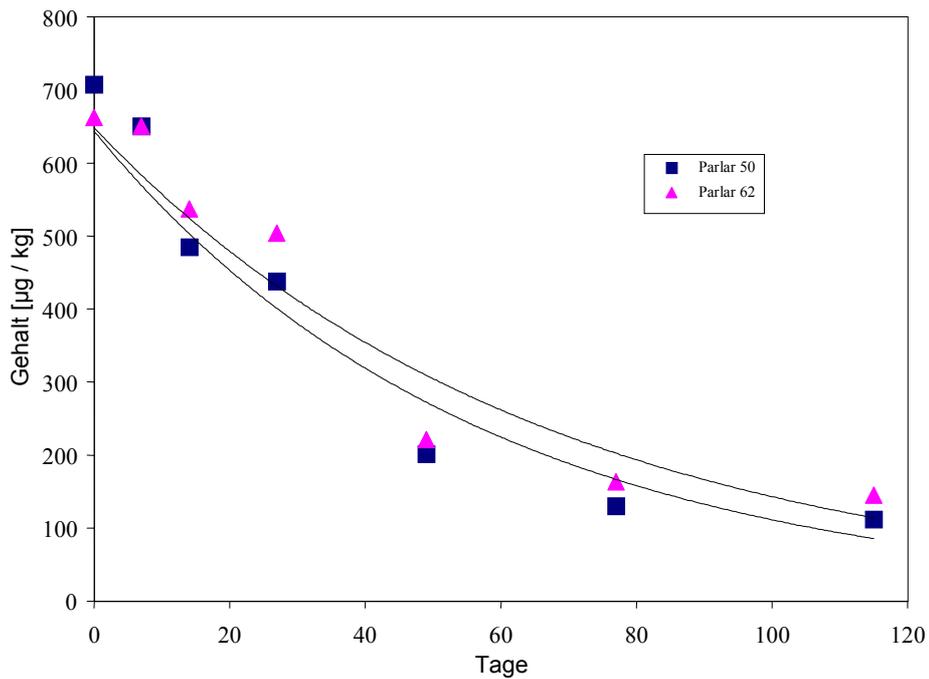


Abbildung 25: Abklingkurven für die Kongenere Parlar 50 und 62 im Fett von Legehennen

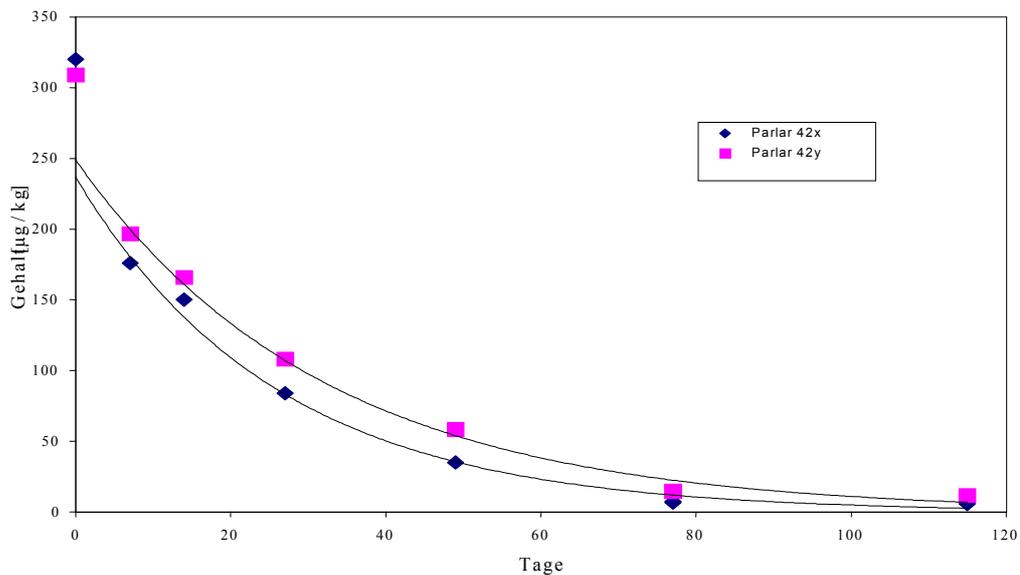


Abbildung 26: Abklingkurven für die Kongenere Parlar 42x und 42y im Fett von Legehennen (da für die Kongenere 42a und 42b keine Einzelstandards zur Verfügung standen, konnte eine exakte Zuordnung der Kongenere nicht vorgenommen werden, daher die Bezeichnung 42x und 42y)

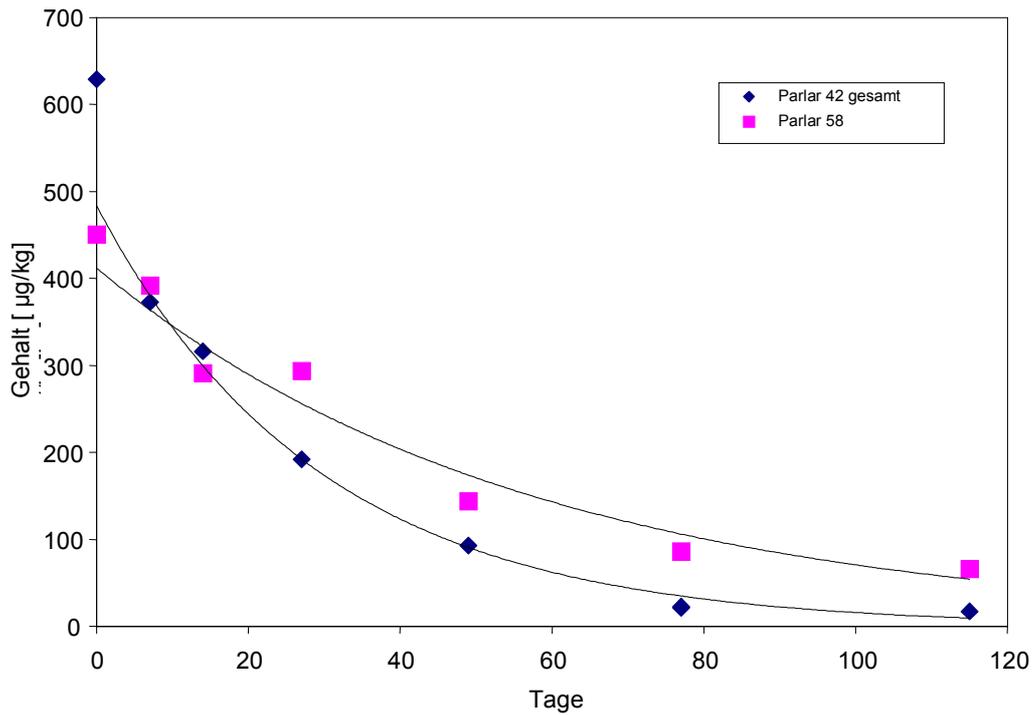


Abbildung 27: Abklingkurven für die Kongenere Parlar 42a+b (entspricht gesamt 42) und 58 im Fett von Legehennen

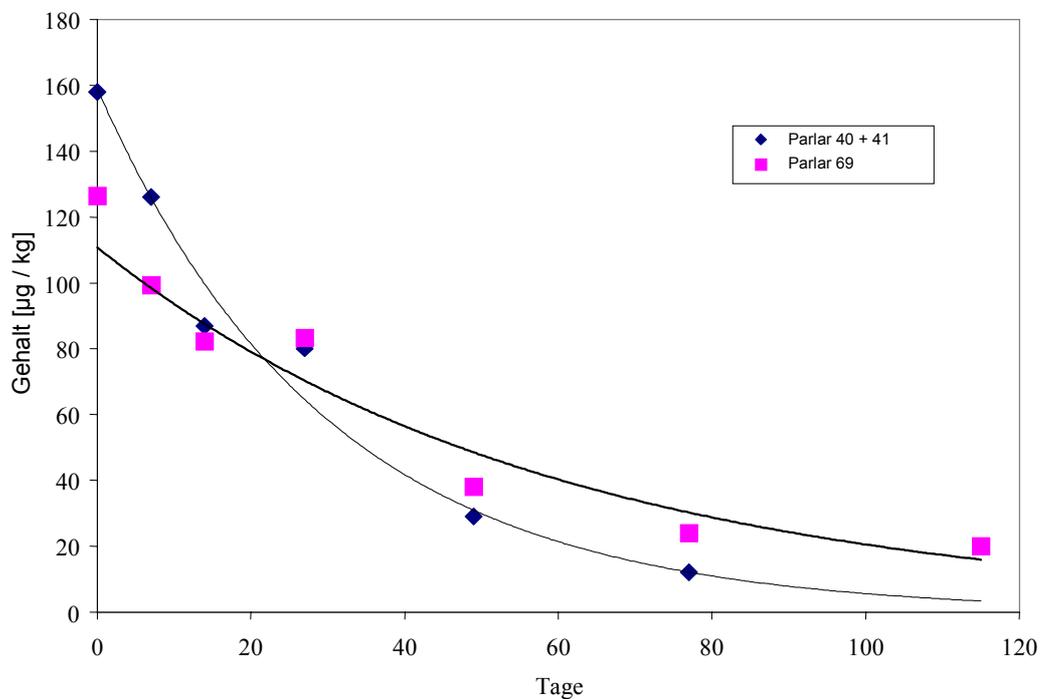


Abbildung 28: Abklingkurven für die Kongenere Parlar 40+41 und 69 im Fett von Legehennen

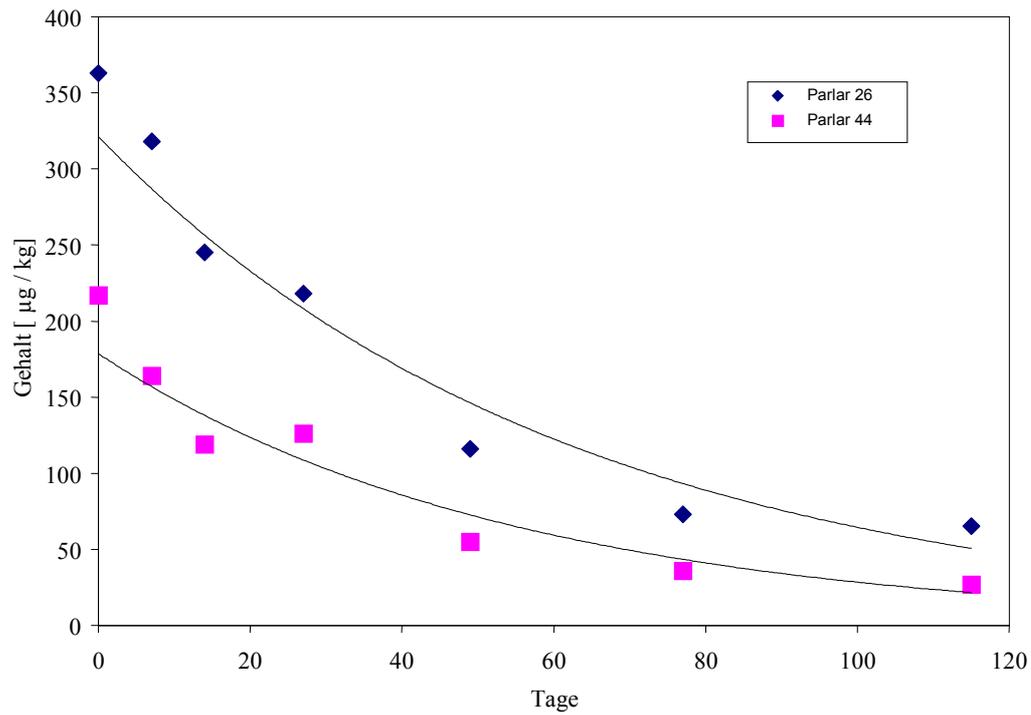


Abbildung 29: Abklingkurven für die Kongenere Parlar 26 und 44 im Fett von Legehennen

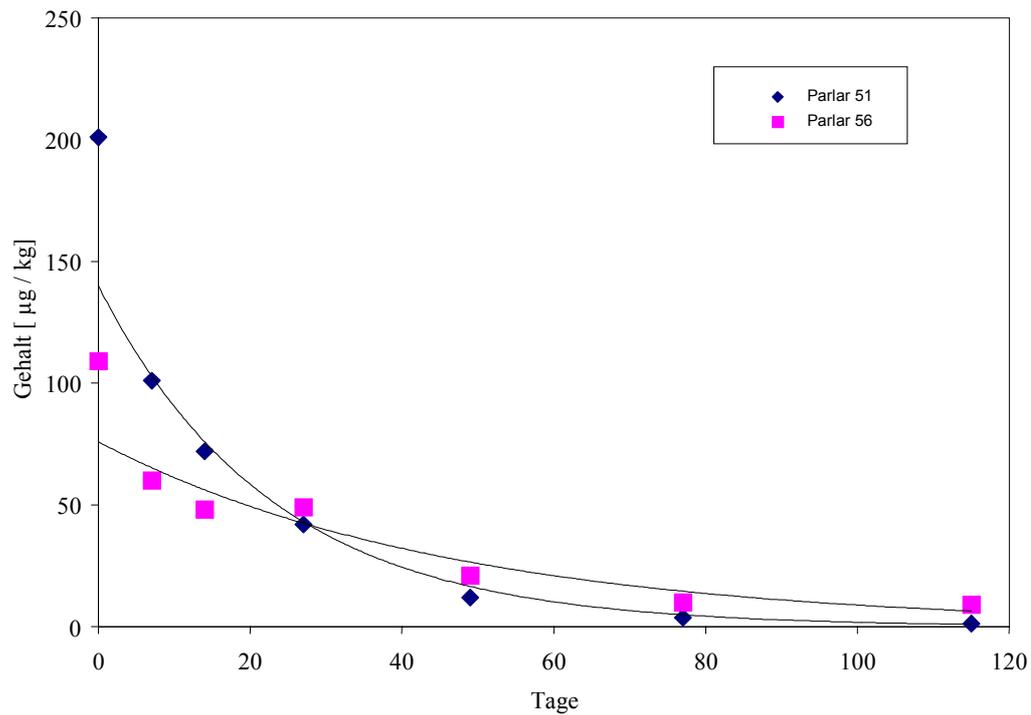


Abbildung 30: Abklingkurven für die Kongenere Parlar 51 und 56 im Fett von Legehennen

Tabelle 28: Gleichungen zu den in Abbildung 23 bis 30 abgebildeten Abklingkurven und der daraus berechneten biologischen Halbwertszeiten $T_{1/2}$. Die Signifikanz der ermittelten Korrelationskoeffizienten lag zwischen 95 und 99,9 %.

Kongener nach Parlar	Funktion der Abklingkurve	Korrelationskoeffizient	Biologische Halbwertszeit [Tage]
11	$y = 19 e^{-0,0247}$	0,9178	28
21	$y = 65 e^{-0,0365}$	0,9382	19
25	$y = 106 e^{-0,0382}$	0,9472	18
26	$y = 338 e^{-0,0174}$	0,9768	40
31	$y = 59 e^{-0,0515}$	0,9978	14
32	$y = 69 e^{-0,0439}$	0,9564	16
40	$y = 83 e^{-0,0583}$	0,9911	12
41	$y = 85 e^{-0,0252}$	0,9666	28
40+41*	$y = 150 e^{-0,0309}$	0,9680	22
42x	$y = 265 e^{-0,0401}$	0,9707	17
42y	$y = 272 e^{-0,0323}$	0,9727	21
42 gesamt*	$y = 536 e^{-0,0355}$	0,9718	20
42 gesamt	$y = 682 e^{-0,0277}$	0,9856	25
44	$y = 189 e^{-0,0199}$	0,9761	35
50	$y = 682 e^{-0,0192}$	0,9749	36
51	$y = 159 e^{-0,475}$	0,9957	15
56	$y = 81 e^{-0,0232}$	0,9666	30
58	$y = 436 e^{-0,0191}$	0,9847	36
59	$y = 68 e^{-0,0355}$	0,9867	20
62	$y = 682 e^{-0,0165}$	0,9638	42
63	$y = 38 e^{-0,0174}$	0,9768	40
69	$y = 116 e^{-0,0180}$	0,9735	38

*Die Halbwertszeiten dieser gekennzeichneten Kongenere beruhen auf den Werten, die mit der Gaschromatographiesäule Optima 17 ermittelt wurden.

Bei der graphischen Auftragung der Konzentrationsabnahme gegen die Zeit wurden Abklingkurven erhalten, die, wie erwartet, einer Exponentialfunktion ähnelten. Für einige Verbindungen wurde zu Beginn der Abklingphase eine stärkere Abnahme als gegen Ende der Abklingphase verzeichnet. Grund hierfür könnten sich gegenseitig beeinflussende Vorgänge sein, die in der Diskussion näher betrachtet werden sollen. Abklingkurven von Kongeneren, die dieses Verhalten aufwiesen, wichen natürlich stärker vom Verlauf einer echten Exponentialfunktion ab. Bis zum vierten Messpunkt (bis zum 35sten Tag) wurde eine steil verlaufende Kurve registriert, die ab dem vierten Messpunkt in eine flachere überging.

Für Kongenere mit solch einem Abklingverhalten könnten somit zwei Abklingkurven postuliert werden, aus denen im ersten Teil eine kürzere Halbwertszeit resultiert als im zweiten Kurvenverlauf.

Bei einigen Kongeneren war ein solcher Verlauf des Abklingverhaltens sehr deutlich zu sehen (Bsp. Kongenere Parlar 50 und 62), während bei anderen Kongeneren (z.B. Parlar 58) kaum eine Trennung in zwei Kurven zu erkennen war.

Um das differenzierte Abklingverhalten der Kongenere deutlicher zu machen, wurden die Halbwertszeiten aus den zwei Kurvenverläufen ermittelt und in der Tabelle 29 wiedergegeben. Als problematisch erwies sich jedoch, daß eine Trennung in zwei getrennte Kurven nicht exakt möglich war. Der vierte Messpunkt konnte dabei nicht immer eindeutig einer einzigen Kurve zugeordnet werden. Aus diesem Grunde wurden für beide Abklingkurven die sich ergebenden Halbwertszeit aus drei bzw. vier aufeinanderfolgenden Messpunkten berechnet.

Tabelle 29: Halbwertszeiten nach Trennung der Abklingkurve im Depotfett von Legehennen in zwei Kurvenverläufen in Tagen [d]

Kongener nach Parlar	$T_{1/2}$ [alle sieben Messpunkte]	$T_{1/2}$ [ersten drei Messpunkte]	$T_{1/2}$ [ersten vier Messpunkte]	$T_{1/2}$ [letzten drei Messpunkte]	$T_{1/2}$ [letzten vier Messpunkte]
26	40	25	36	84	53
40*	12	8	12	n.b	n.b
41*	28	15	24	178	79
40+41	22	11	27	169	46
42x*	17	11	14	216	41
42y*	21	14	17	198	46
42 a+b	25	22	34	41	29
44	35	16	35	66	53
50	36	26	37	81	56
58	36	22	42	45	43
62	42	47	62	112	59
69	38	23	47	79	48

Werden für die Berechnung der Halbwertszeit statt vier nur drei Messpunkte herangezogen, ändern sich die daraus resultierenden Halbwertszeiten.

Wie aus der Tabelle 29 weiter ersichtlich ist, bestehen zwischen der Halbwertszeit aus den ersten 4 Messungen und der Halbwertszeit aus allen Messpunkten nur geringe Unterschiede. Deutlicher werden die Unterschiede bei Betrachtung der Halbwertszeit aus den letzten drei bzw. vier Messpunkten mit der Halbwertszeit aus allen Messpunkten. Hier ist bei fast allen erfassten Kongeneren eine sehr deutliche Zunahme der Halbwertszeit zu verzeichnen. Lediglich die Kongenere Parlar 42a+b und 58 und nicht ganz so deutlich Parlar 44 zeigten einen geringeren Unterschied in den aufgeführten Halbwertszeiten.

Im Depotfett ergibt sich für die Halbwertszeit (aus allen Messpunkten) der untersuchten Kongenere folgende Reihung (Da die Peaks 42x und 42y nicht dem Standard 42a und 42 b zuzuordnen sind, wird hier auf eine exakte Bezeichnung verzichtet):

$$40 < 31 < 51 < 32 < 42x < 25 < 21 < 59 < 42y < 11 = 41 < 56 < 44 < 50 = 58 < 69 < 63 < 26 < 62$$

Aus der angeführten Reihenfolge zeigt sich deutlich, dass überwiegend Kongenere, die später von der Gaschromatographiesäule eluieren, zu denen gehören, die höhere Halbwertszeiten aufweisen. Kongener Parlar 11 wurde nur in niedrigen Konzentrationen in den Proben nachgewiesen, was die Bestimmung einer zuverlässigen Halbwertszeit nicht zulässt. Zudem war eine exakte Anordnung der Integrationslinien für diesen Peak nicht immer einwandfrei festzulegen, was ebenso zu erhöhten Fehlern führen kann. Dieses Kongener wird daher im weiteren Verlauf der Untersuchung nicht weiter betrachtet.

Parlar 40 und 41 waren mit der DB-5- Phase nicht zu trennen. Bei der Ermittlung der Halbwertszeiten mit der Optima 17 konnte aber gezeigt werden, dass das Kongener Parlar 40 deutlich schneller abgebaut wurde als das Kongener 41.

Für die folgenden Matrizes sollen deshalb nur noch Halbwertszeiten vorgestellt werden, die einwandfrei zu detektieren sind und die aufgrund ihre Konzentration der betreffenden Kongenere im Gewebe als wichtig erscheinen. Eine Reihenfolge der unter diesen Kriterien zu betrachteten Verbindungen, geordnet nach Halbwertszeiten, lautet:

$$40 < 42x < 42y < 41 < 44 < 50 = 58 < 69 < 26 < 62$$

5.3.2 Abklingverhalten und biologische Halbwertszeiten von Toxaphenkongeneren in den Nieren von Legehennen

Wie unter Punkt 5.1.2 schon erwähnt wurde, zeigten die Chromatogramme der Nierenproben ein einheitliches Toxaphenmuster während der Abklingphase. Zudem wurde in den Nierenproben ein durchaus ähnliches Abklingverhalten der Toxaphenkongenerie wie in den Fett-, Fleisch- und Dotterproben festgestellt. Das Kongener Parlar 69 konnte in den Nierenproben, anders als in den Fettproben, jedoch nur in deutlich geringeren Konzentrationen detektiert werden. Eine zuverlässige Berechnung der Halbwertszeit für dieses Kongener in der Probenmatrix „Niere“ konnte deshalb nicht durchgeführt werden.

Die in den Nieren- und Leberproben in besonders erhöhten Konzentrationen vorkommende unbekannte Verbindung U1 (Retentionszeit ca. 13:06 Minuten), zeigte in den Nierenproben ein langsames Abbauverhalten als in den Fettproben, jedoch ein schnelleres als in den Leberproben. Da für diese Verbindung kein Standard zur Verfügung stand, konnten die Konzentrationen dieser Verbindung in den verschiedenen Probenmatrizes nicht ermittelt werden. Nach Abschätzungen aus den Chromatogrammen sollte das Abklingverhalten dieses Kongeners in den Nierenproben jedoch in etwa dem des Kongeners Parlar 42 entsprechen. Eine Halbwertszeit für die weiteren unbekanntes Verbindungen U2 und U3 wurden aus demselben Grund ebenfalls nicht ermittelt; nach Abschätzungen sollten diese jedoch in erster Näherung im Bereich des Kongeners Parlar 62 liegen.

Graphische Darstellung des Abklingverhaltens von Toxaphen in Nieren

Wie bereits erwähnt, sollen für die Gewebe Niere, Leber, Muskelfleisch und Eidotter nur noch ausgewählte Kongenerie genauer beschrieben werden. Die angeführten Kongenerie waren dabei mit ausreichender Sicherheit auch noch gegen Ende der Abklingphase gut zu identifizieren und quantifizieren, zudem gehörten diese Verbindungen zu den persistenteren Kongeneren, die deshalb auch in den Chromatogrammen der Abklingphase dominierten. Da die nun folgenden Halbwertszeiten mit einer DB-5 GC-Säule ermittelt wurden, ist eine Angabe der Halbwertszeiten für die Kongenerie Parlar 40 und 41, sowie der Kongenerie Parlar 42a und 42b nicht möglich. Die Gehalte in den folgenden Graphiken

beziehen sich auf das Frischgewicht.

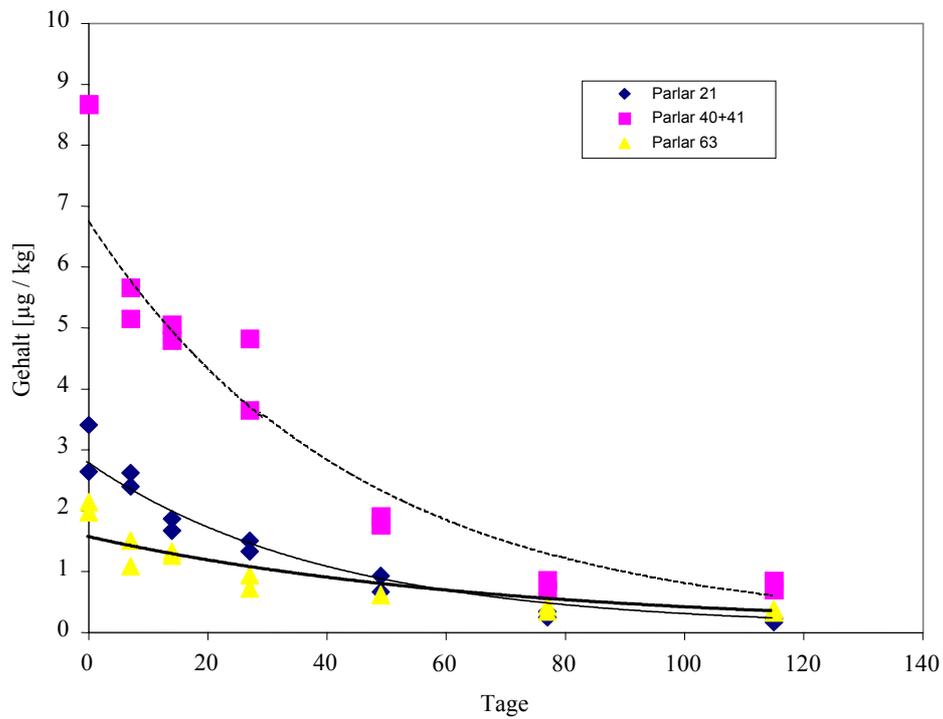


Abbildung 31: Abklingkurve für die Kongenere Parlar 21, 40+41 und 63 in den Nieren von Legehennen

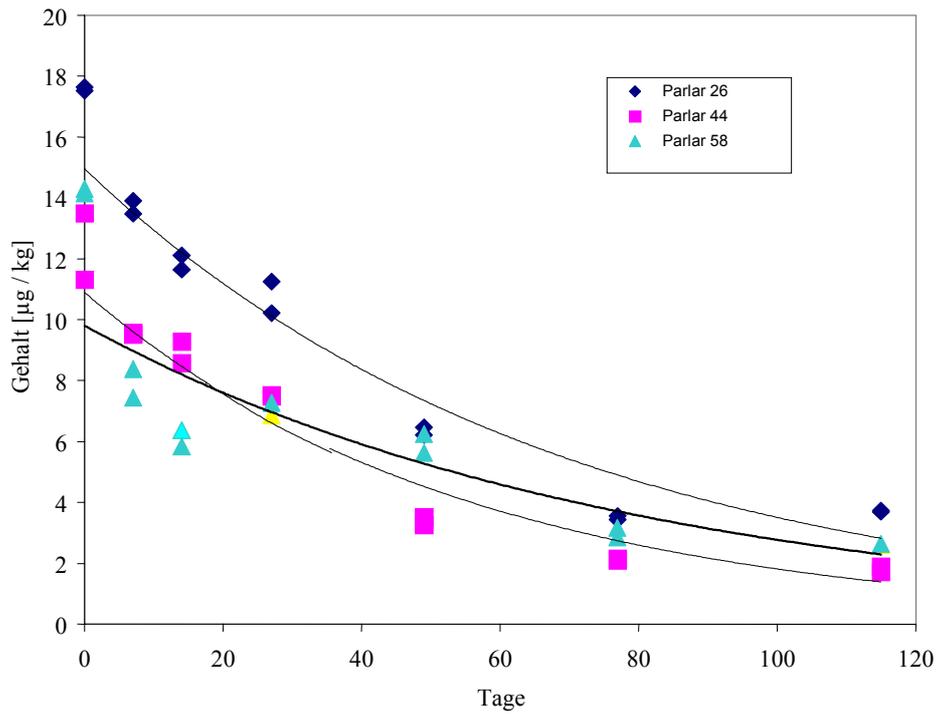


Abbildung 32: Abklingkurve der Kongenere Parlar 26, 44 und 58 in den Nieren von Legehennen

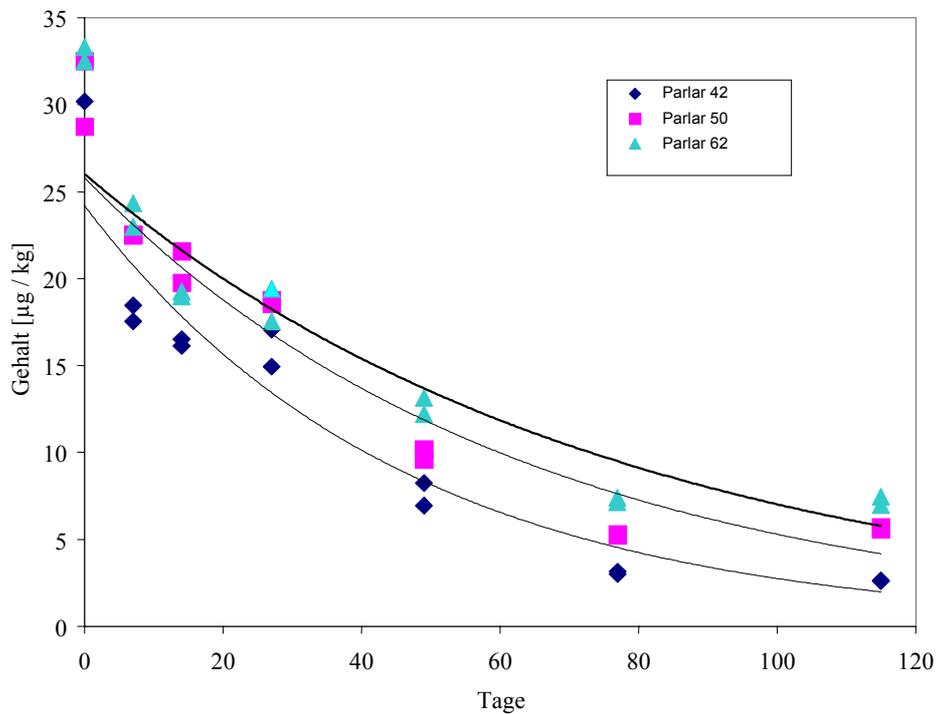


Abbildung 33: Abklingkurve der Kongenere Parlar 42, 50 und 62 in den Nieren von Legehennen

Tabelle 30: Gleichungen der in den Abbildungen 25 bis 27 dargestellten Abklingkurven mit der daraus berechneten biologischen Halbwertszeit $T_{1/2}$. Die Signifikanzen der errechneten Korrelationskoeffizienten betragen 99,9 %.

Kongener nach Parlar	Funktion der Abklingkurve	Korrelationskoeffizient	Biologische Halbwertszeit [d]
21	$y = 2,9 e^{-0,0268}$	0,9861	26
26	$y = 15 e^{-0,01584}$	0,9654	44
40+41	$y = 7,3 e^{-0,02417}$	0,9664	29
42 a+b	$y = 25 e^{-0,02362}$	0,9742	29
44	$y = 12 e^{-0,01949}$	0,9754	36
50	$y = 27 e^{-0,01729}$	0,9624	40
58	$y = 10 e^{-0,01368}$	0,9223	51
62	$y = 27 e^{-0,01428}$	0,9624	49
63	$y = 1,5 e^{-0,01620}$	0,9473	43

Wie aus den Graphiken zu erkennen ist, ergibt sich für alle Kongenere ein exponentieller Kurvenverlauf. Eine so deutliche Zweiteilung der Abklingkurven, wie sie in den Fettproben zu erkennen war, konnte bei den Nierenproben nicht festgestellt werden.

Eine rechnerische „Zweiteilung“ der Abklingphase ergab für beide Abklingkurven nur unwesentlich andere biologische Halbwertszeiten als in Tabelle 30 dargestellt, was für einen nahezu exakt exponentiellen Kurvenverlauf spricht. In den Graphiken ist eine Konzentrationszunahme vom vorletzten zum letzten Schlachttermin zu beobachten.

Ob es sich definitiv um eine Zunahme der Toxaphenkonzentration handelt, kann hier nicht eindeutig beantwortet werden, da die Werte im Schwankungsbereich der Messgenauigkeit liegen.

5.3.3 Abklingverhalten und biologische Halbwertszeiten von Toxaphen in Lebern von Legehennen

Für das Abklingverhalten von Toxaphenkongeneren in den Lebern der Legehennen konnte je nach Kongener keine eindeutig exponentiell verlaufende Abklingkurve festgestellt werden. Lediglich die Kongenere Parlar 42 und 44 wiesen einigermaßen charakteristische Kurvenverläufe während der Abklingphase auf. Die meisten anderen Kongenere nahmen in der Konzentration zuerst ab, dann wiederum zu, um dann wieder in der Konzentration abzunehmen. Besonders deutlich wurde dies bei den Kongeneren Parlar 58 und 62 festgestellt. Um dieses Verhalten deutlich zu machen, sollen die Abklingkurven der Kongenere 42, 44, 58 und 62 stellvertretend hierfür dargestellt werden.

Graphische Darstellung des Abklingverhaltens von Toxaphen in Lebern

In den Abbildungen aufgetragene Gehalte verstehen sich auf das Frischgewicht bezogen.

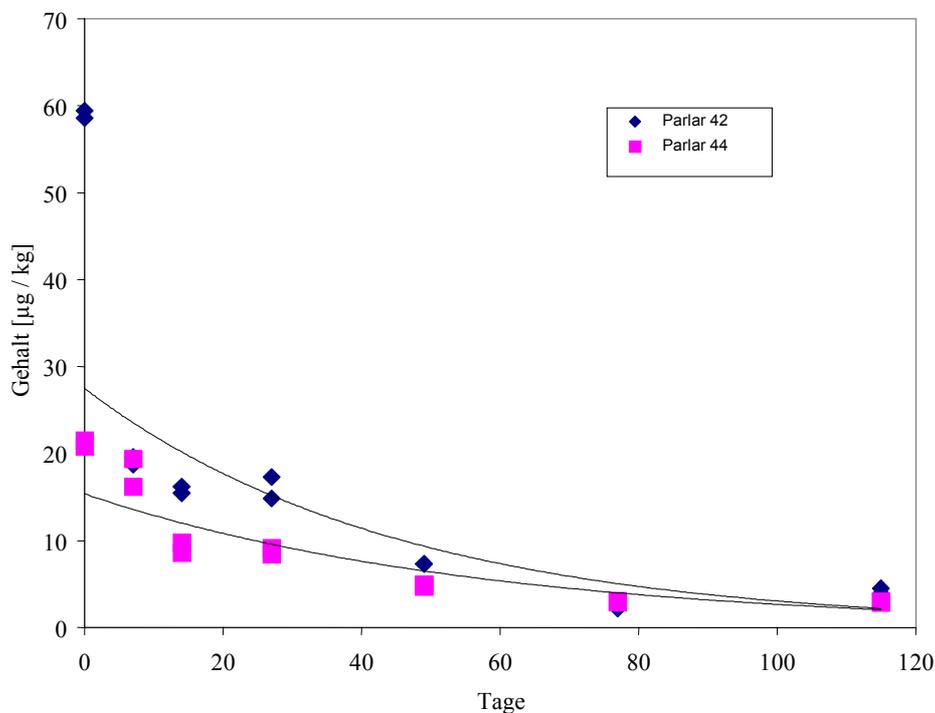


Abbildung 34: Abklingkurven der Kongenere Parlar 42 und 44 in den Lebern von Legehennen

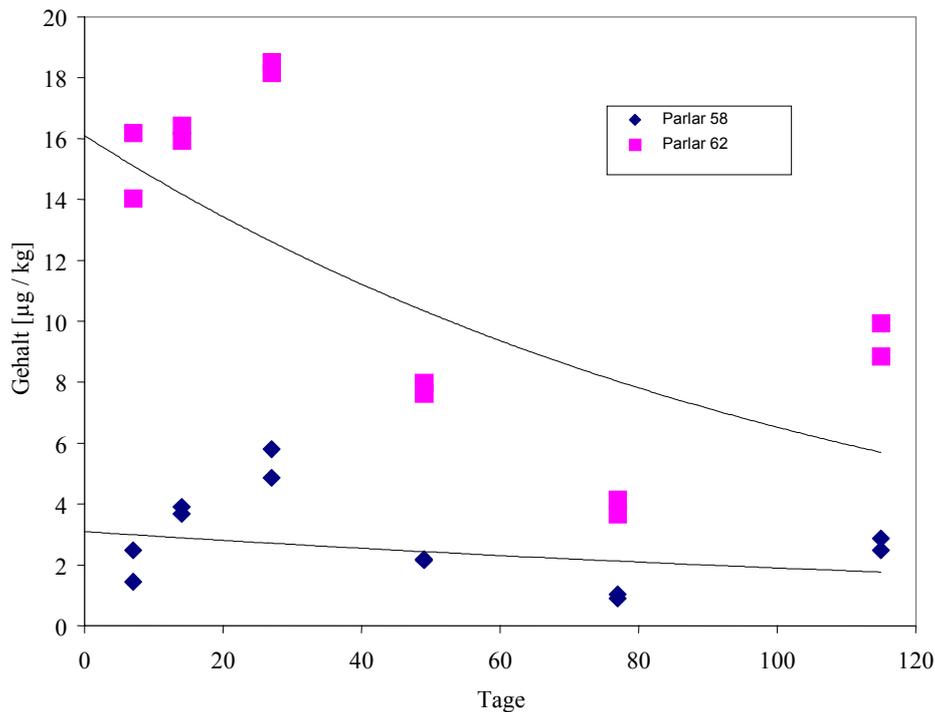


Abbildung 35: Abklingkurven der Kongenere Parlar 58 und 62 in den Lebern von Legehennen (um die Schwankungen der Konzentration besser deutlich zu machen, wurde gegenüber der Abbildung 28 jeweils auf die Auftragung des ersten Messpunktes verzichtet)

In der Abbildung 34 ist die sehr schnelle Konzentrationsabnahme des Toxaphenkongeners Parlar 42 nach dem ersten Schlachttermin zu erkennen. Danach wird das Toxaphen langsamer abgebaut. Für die Kongenere Parlar 58 und 62 zeigte sich sogar eine Zunahme in der Toxaphenkonzentration während der Abklingphase. Nach dem vierten Messpunkt nahm die Konzentration für diese Kongenere ab und am letzten Messpunkt wieder zu. Aufgrund dieser dargestellten Schwankungen war es für die meisten Kongenere nicht möglich, korrekte Halbwertszeiten zu ermitteln. Lediglich für das Kongener Parlar 42 konnte eine Halbwertszeit von 29 Tagen und für das Kongener Parlar 44 eine Halbwertszeit von 36 Tagen ermittelt werden.

Für die Kongenere Parlar 26, 40+41 und 50 konnten ebenfalls keine eindeutig exponentiell verlaufenden Abklingkurven beobachtet werden; die Konzentrationsschwankungen dieser Kongenere in der Leber waren jedoch nicht so extrem, wie die der Kongenere Parlar 58 und 62.

5.3.4 Abklingverhalten und biologische Halbwertszeiten von Toxaphenkongeneren im Muskelgewebe von Legehennen

Da Toxaphen sich vor allem in fettreichem Geweben anreichert [101], sind die Konzentrationen der Rückstände aufgrund des geringen Fettgehaltes der Fleischproben (ca. 1-4%) naturgemäß sehr gering. Nur Blut- und Kotproben weisen noch niedrigere Toxaphenrückstände auf. In den Fleischproben konnten gegen Ende des Versuches nur noch die Kongenere Parlar 26, 40+41, 42, 44, 50, 58, 62 und 63 detektiert werden.

In diesen Proben waren die Konzentrationen der angeführten Kongenere jedoch sehr nahe an der Nachweisgrenze, was eine exakte Quantifizierung der Rückstände erschwerte.

Graphische Darstellung der Abklingkurven von Toxaphenkongeneren im Muskelgewebe von Legehennen

Die in den Abbildungen dargestellten Gehalte beziehen sich auf die Frischeinwaage.

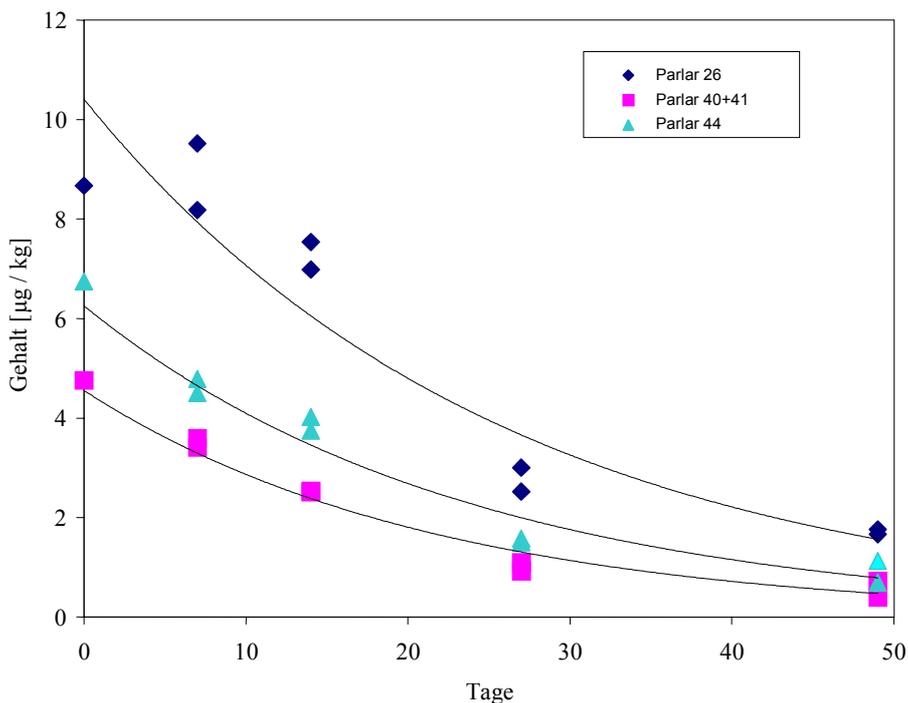


Abbildung 36: Abklingkurven für die Kongenere 26, 40+41 und 44 im Muskelgewebe von Legehennen

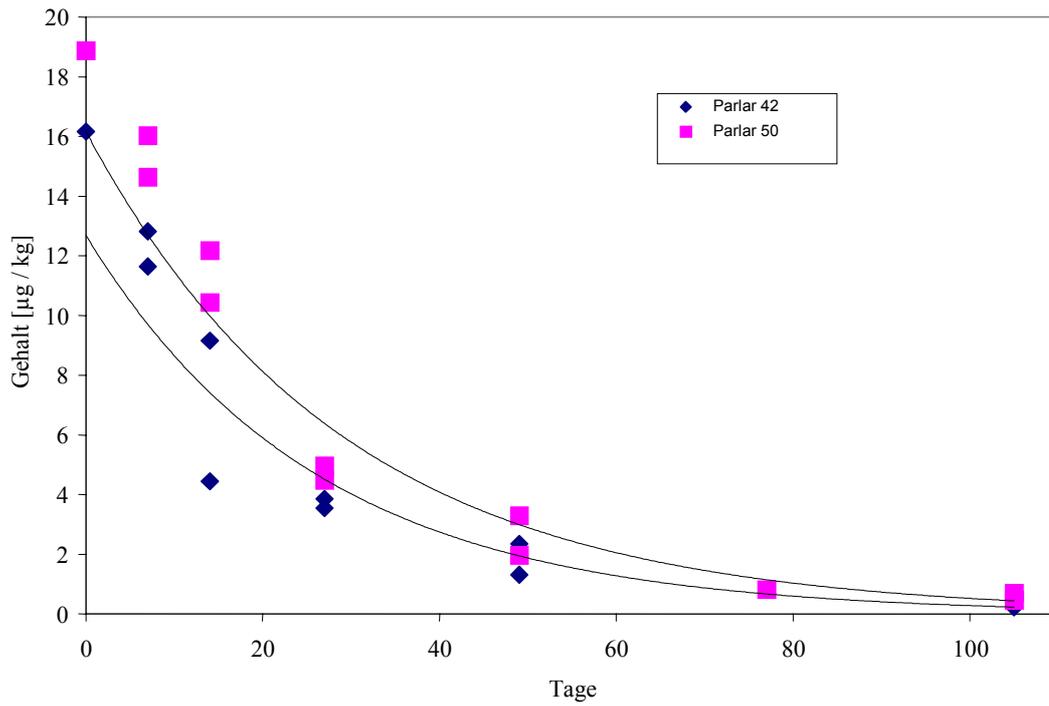


Abbildung 37: Abklingkurven für die Kongenere 42 und 50 im Muskelgewebe von Legehennen

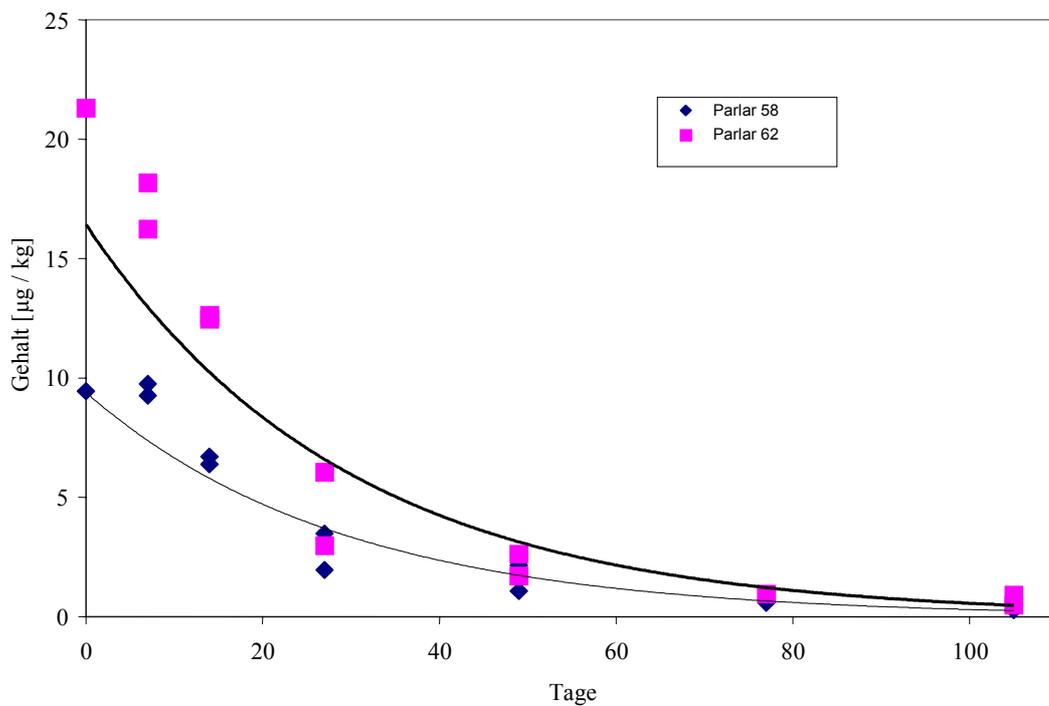


Abbildung 38: Abklingkurven für die Kongenere 58 und 62 im Muskelgewebe von Legehennen

Tabelle 31: Ermittelte Gleichungen der in Abbildung 36 bis 38 dargestellten Abklingkurven und daraus berechnete biologische Halbwertszeiten $T_{1/2}$. Die Signifikanz der ermittelten Korrelationskoeffizienten lag zwischen 95 und 99,9 %.

Kongener nach Parlar	Funktion der Abklingkurve	Korrelationskoeffizient	Biologische Halbwertszeit [d]
26	$y = 9,5 e^{-0,0327}$	0,9794	21
40+41	$y = 3,8 e^{-0,0361}$	0,9636	19
42a+b	$y = 13 e^{-0,0406}$	0,9714	17
44	$y = 5,2 e^{-0,0308}$	0,9730	22
50	$y = 16 e^{-0,0345}$	0,9789	20
58	$y = 3,1 e^{-0,0459}$	0,9667	15
62	$y = 17 e^{-0,03389}$	0,9607	21
63*	$y = 1,5 e^{-0,0566}$	0,9539	12
69*	$y = 2,8 e^{-0,0526}$	0,9110	13

* Funktionen dieser gekennzeichneten Kongenere wurden nur aus den ersten fünf Messpunkten berechnet, da diese Kongenere in den Proben gegen Versuchsende nicht mehr nachgewiesen werden konnten.

In Abbildung 36 wurden nur die ersten fünf Messpunkte aufgetragen, während in den Abbildungen 37 und 38 alle sieben Messpunkte in die Auswertung übernommen werden konnten. Da die Gehalte in den Proben aus den letzten beiden Schlachterminen aufgrund der Schwankungen stärker mit Fehlern behaftet sind, ist es schwierig, einen exakten Kurvenverlauf wie bei den Fettproben zu postulieren. Werden wie in Abbildung 36 nur fünf Messpunkte angeführt, so ist der für den Abbau typische exponentielle Verlauf der Abklingkurven zu erkennen. Werden für die Fleischproben jedoch wie bei den Fettproben Halbwertszeiten aus den letzten vier Messpunkten ermittelt, so ergeben sich keine so drastischen Zunahmen der Halbwertszeiten wie im Falle der Fettproben. Da die errechneten Halbwertszeiten aber aufgrund der letzten zwei Datenpunkte relativ ungenau werden, soll auf eine Angabe dieser Zahlenwerte an dieser Stelle verzichtet werden.

5.3.5 Abklingverhalten und biologische Halbwertszeiten von Toxaphenkongeneren im Eidotter von Legehennen

Das Abklingverhalten des Toxaphens im Eidotter ähnelt dem im Depotfett beobachteten. Aufgrund der höheren Anzahl an Probennahmen (und damit an Meßpunkten) gegenüber den Gewebeproben ist hier der Verlauf des Abklingens genauer darzustellen.

Graphische Darstellung der Abklingkurven von Toxaphenkongeneren im Eidotter von Legehennen

Die in den Graphiken aufgetragenen Gehalte beziehen sich auf die Frischeinwaage.

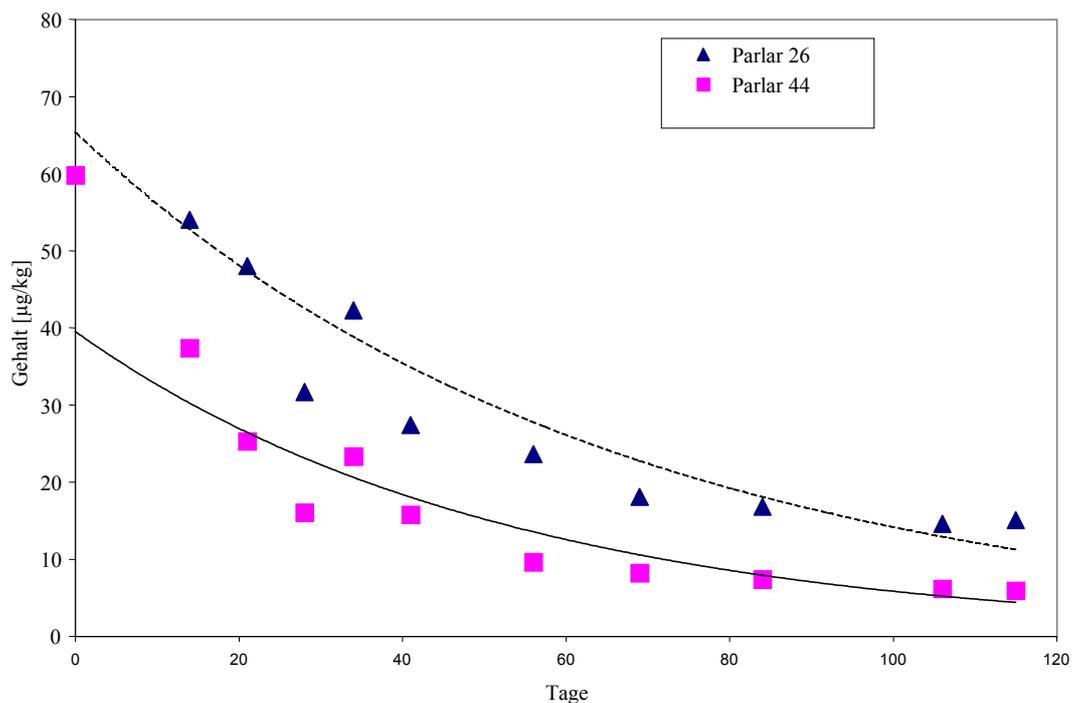


Abbildung 39: Abklingkurven für die Kongenere Parlar 26 und 44 im Eidotter von Legehennen.

Der Gehalt für das Kongener Parlar 26 bei Versuchsbeginn (Tag 0) betrug $105\mu\text{g}/\text{kg}$ FM, dieser Wert wurde jedoch, um eine zu starke Stauchung der Konzentrations-Achse zu vermeiden, nicht mit aufgetragen.

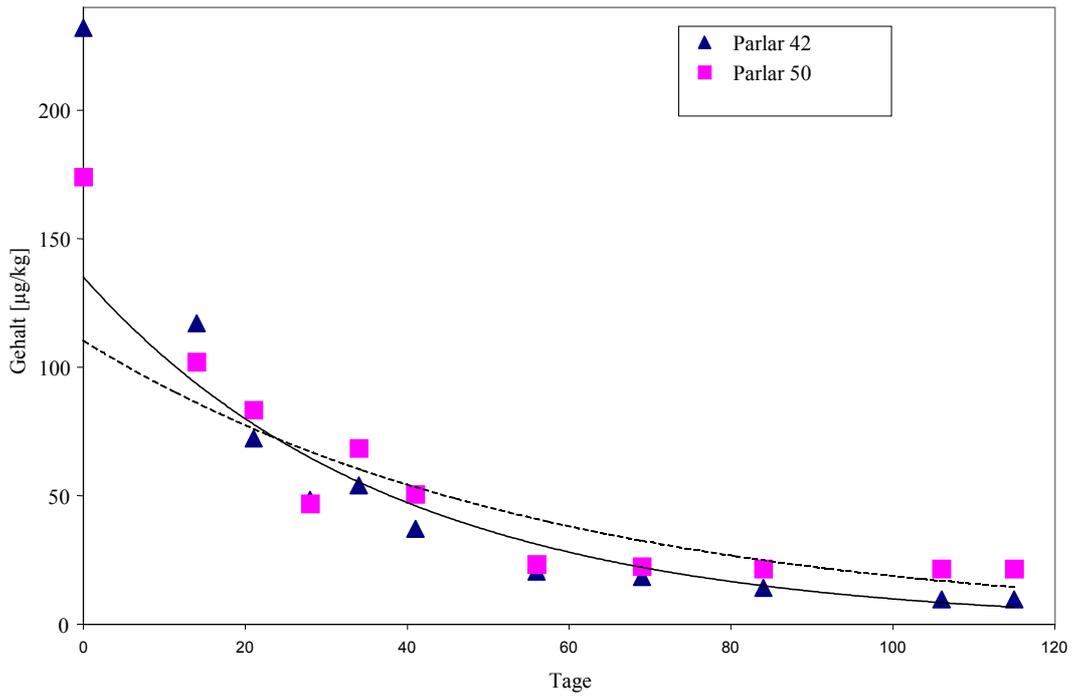


Abbildung 40: Abklingkurven für die Kongenere Parlar 42 und 50 im Eidotter von Legehennen

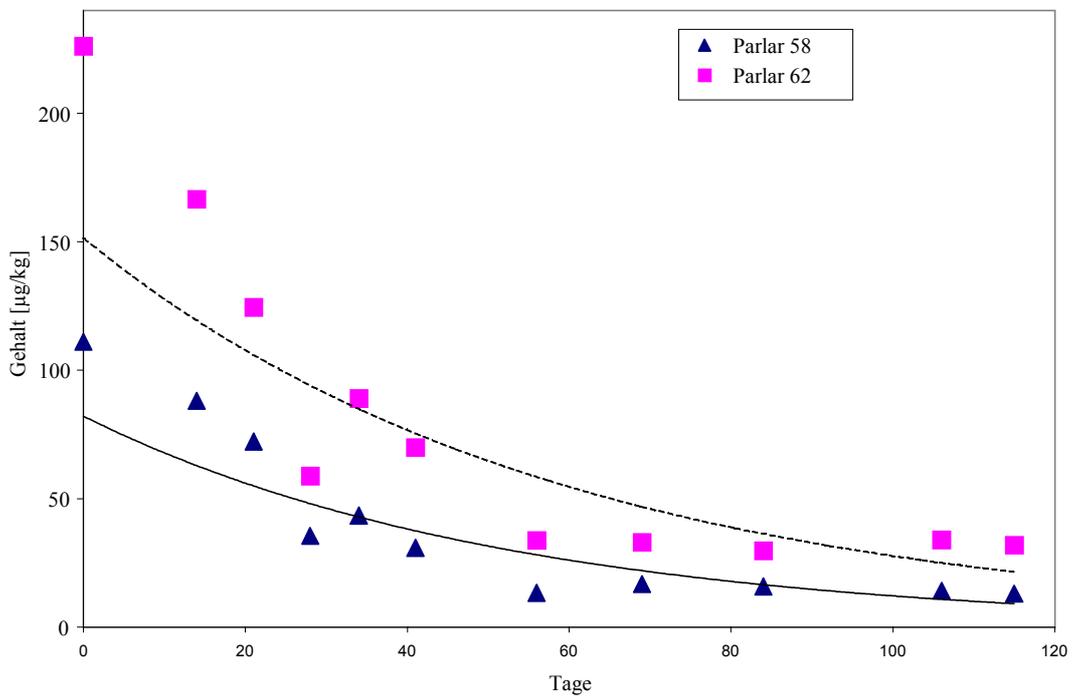


Abbildung 41: Abklingkurven für die Kongenere Parlar 58 und 62 im Eidotter von Legehennen

Tabelle 32: Gleichungen der Abklingkurven im Dotter mit den daraus berechneten biologischen Halbwertszeiten $T_{1/2}$. Die Signifikanzen der ermittelten Korrelationskoeffizienten liegen zwischen 95 und 99,9%.

Kongener nach Parlar	Funktion der Abklingkurve	Korrelationskoeffizient	Biologische Halbwertszeit [d]
26	$y = 58 e^{-0,01456}$	0,8939	48
40+41	$y = 28 e^{-0,02356}$	0,9464	29
42a+b	$y = 116 e^{-0,0248}$	0,9435	28
44	$y = 35 e^{-0,01798}$	0,9266	39
50	$y = 97 e^{-0,01749}$	0,8790	40
58	$y = 70 e^{-0,01695}$	0,8817	41
62	$y = 128 e^{-0,0157}$	0,8095	44
63	$y = 6,4 e^{-0,01782}$	0,8230	39
69	$y = 21 e^{-0,01929}$	0,6973	36

Bei einer ersten Betrachtung der Abklingkurven ergeben sich zwar exponentielle Kurvenverläufe, jedoch fallen die Schwankungen der Messwerte zum Ende des Versuches hin auf. So weist der Gehalt der Kongenere vom vierten zum fünften Messpunkt hin einen Anstieg auf, während bei den letzten fünf Messpunkten nur ein langsame Konzentrationsabnahme der Toxaphenkongenere zu erkennen ist. Besonders deutlich ist dies in den Abbildungen 40 und 41 zu sehen. Wie bei den Fettproben können daher auch im Datenkollektiv der Dotterproben zwei unterschiedliche Kurvenverläufe durch die einzelnen Messpunkte gelegt werden. Bei Betrachtung der ersten Messpunkte ist ein schneller Abbau der Toxaphenkongenere zu beobachten, bei den letzteren Messpunkten ein langsamerer.

Die Berechnung und Unterteilung der Abklingphase in zwei unterschiedliche „Halbwertszeit-Phasen“ ist für eine Anzahl ausgewählter Kongenere in Tabelle 33 dargestellt.

Tabelle 33: Differenzierbare Halbwertszeitverläufe zu Beginn und Ende des Abklingversuches im Eidotter von Legehennen

	Parlar	Parlar	Parlar	Parlar	Parlar	Parlar
	26	42	44	50	58	62
Halbwertszeit aus den ersten vier Messpunkten	15 Tage	12 Tage	14 Tage	15 Tage	15 Tage	13 Tage
Halbwertszeit aus den letzten fünf Messpunkten	76 Tage	40 Tage	55 Tage	76 Tage	77 Tage	110 Tage

5.3.6 Abschließende Betrachtung des Abbauverhaltens von Toxaphenkongeneren in Geweben von Legehennen sowie deren Eiern

In den Eiklarproben, die fast keinen Lipidanteil aufweisen, konnte Toxaphen nur in Spuren nachgewiesen werden. Die Kotproben, ebenso wie die Blutproben, zeigten keinen klaren Verlauf einer Toxaphenabnahme, hier waren größere Schwankungen in den Messwerten vorhanden, die eine Bestimmung von Halbwertszeiten unmöglich machten. Zudem waren die Konzentrationen der Toxaphenkongeneren in den Blut- und Kotproben nur während der ersten drei bis fünf Schlachtermine sicher nachzuweisen. Die Proben Eiklar, Blut und Kot werden daher an dieser Stelle nicht mit betrachtet.

Für eine abschließende Betrachtung werden die Halbwertszeiten von ausgewählten Kongeneren, die für eine Analytik relevanter sind, in der Tabelle 34 zusammengefasst.

Eine Bewertung dieser Ergebnisse wird in der Diskussion vorgenommen.

Tabelle 34: Halbwertszeiten im Gewebe und Eidotter von Legehennen

	Biologische Halbwertszeit $T_{1/2}$ in Tagen in			
	Depotfett	Eidotter	Niere	Muskelfleisch
Parlar 26	40	48	44	21
Parlar 40+41	22	29	29	19
Parlar 42	25	28	29	17
Parlar 44	35	39	36	22
Parlar 50	36	40	40	20
Parlar 58	36	41	51	15
Parlar 62	42	44	49	21
Parlar 63	40	39	43	12*
Parlar 69	38	36	----	13*

* Werte wurden nur aus fünf Messpunkten ermittelt

5.4 Metabolisierung von Toxaphenkongeneren in Leber und Nieren von Legehennen

In den Geweben Depotfett, Muskelfleisch und Eidotter konnten über den gesamten Versuchszeitraum hinweg keine Veränderungen im Toxaphenkongenerenmuster beobachtet werden. Die Leber- und Nierenproben zeigten aber von Schlachtttermin zu Schlachtttermin unterschiedliche Muster.

Nach einer Lagerung der Proben (bei -18°C) von mehr als sechs Monaten wurden einige Proben aller unterschiedlichen Gewebearten nochmals aufgearbeitet und quantifiziert. Dabei ließen sich in einigen der Leber- und Nierenproben Veränderungen im Toxaphenmuster gegenüber der vorangegangenen ersten Aufarbeitung feststellen. Die Veränderungen im Toxaphenmuster (Abb. 42) wurden vor allem in den Leber- und Nierenproben beobachtet, die mit ihrem Chromatogramm stark den Fett-, Fleisch- und Dotterproben ähnelten.

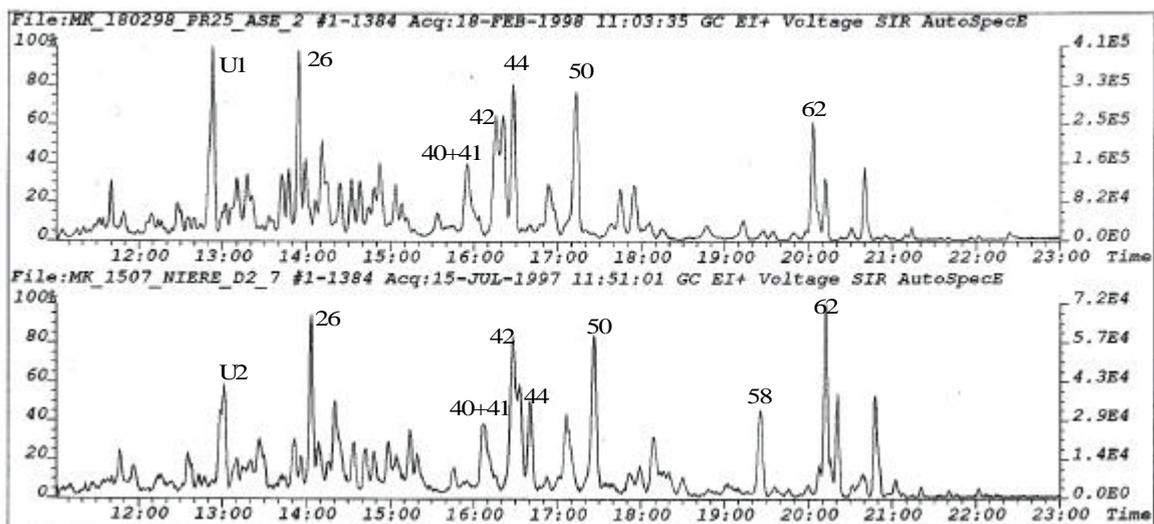


Abbildung 42: Nierenprobe vom 4.2.1997
oberes Chromatogramm: Kongenerenmuster nach halbjähriger Probenlagerung
unteres Chromatogramm: Kongenerenmuster nach sofortiger Aufarbeitung nach der Schlachtung

Im Chromatogramm ist eine Konzentrationszunahme für das Kongener Parlar 44 und der unbekanntem Verbindung U1 zu erkennen. Ebenso ist eine Abnahme der Konzentrationen

der Kongenere Parlar 42, 58 und 62 zu beobachten. Bei der Quantifizierung dieser Probe vor und nach der Lagerung ergaben sich die in Tabelle 35 gezeigten Gehalte.

Tabelle 35: Toxaphenkonzentrationen in einer Nierenprobe (Schlachttermin 4.2.1997) vor und nach einer halbjährigen Lagerungsdauer

Kongener	Konzentration in [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Fett] Vor der Lagerung	Konzentration in [$\mu\text{g}/\text{kg}$ Fett] nach der Lagerung
Parlar 42	377	189
Parlar 44	133	188
Parlar 58	172	38
Parlar 62	395	174
Parlar 69	15	2

Aus der Tabelle 35 ist der starke Konzentrationsrückgang des Kongeners Parlar 58 zu erkennen, die Kongenere Parlar 42 und 62 weisen nach Lagerung noch etwa die Hälfte ihres ursprünglichen Gehaltes auf. Für das Kongener Parlar 44 wurde eine Konzentrationszunahme von ca. 40 % durch die Lagerung festgestellt.

Diese extremen Konzentrationsveränderung konnte jedoch nicht in allen Lebern und Nieren beobachtet werden, die nach der halbjährlichen Lagerung aufgearbeitet wurden.

Eine weitere Veränderung fiel auf, als Proben nach einer etwa halbjährigen Lagerungsdauer mit einem ASE 200-Gerät (siehe Punkt 6.1) extrahiert wurden. Vergleiche mit dem Kongenerenmuster, das aus einer Soxhlet-Extraktion resultierte, ergaben die in Abbildung 43 gezeigten Änderungen.

In Abbildung 43 sind bei Vergleich des oberen und unteren Chromatogramms ähnliche Veränderungen zu erkennen, wie sie in Abbildung 42 zu erkennen waren. Hier sind die Veränderungen jedoch noch ausgeprägter, da es sich um eine Probe handelt, die aus einer Schlachtung gegen Ende des Abklingversuches stammt.

Zusätzlich zu den beschriebenen Veränderungen wurde bei einer Aufarbeitung der Nierenproben nach Lagerung und anschließender Extraktion mit dem ASE-Gerät zwei Peaks (Retentionszeit ca. 12:10 min) detektiert, die bis dato noch in keiner Probe mit solch hohen Responsefaktoren festgestellt werden konnten.

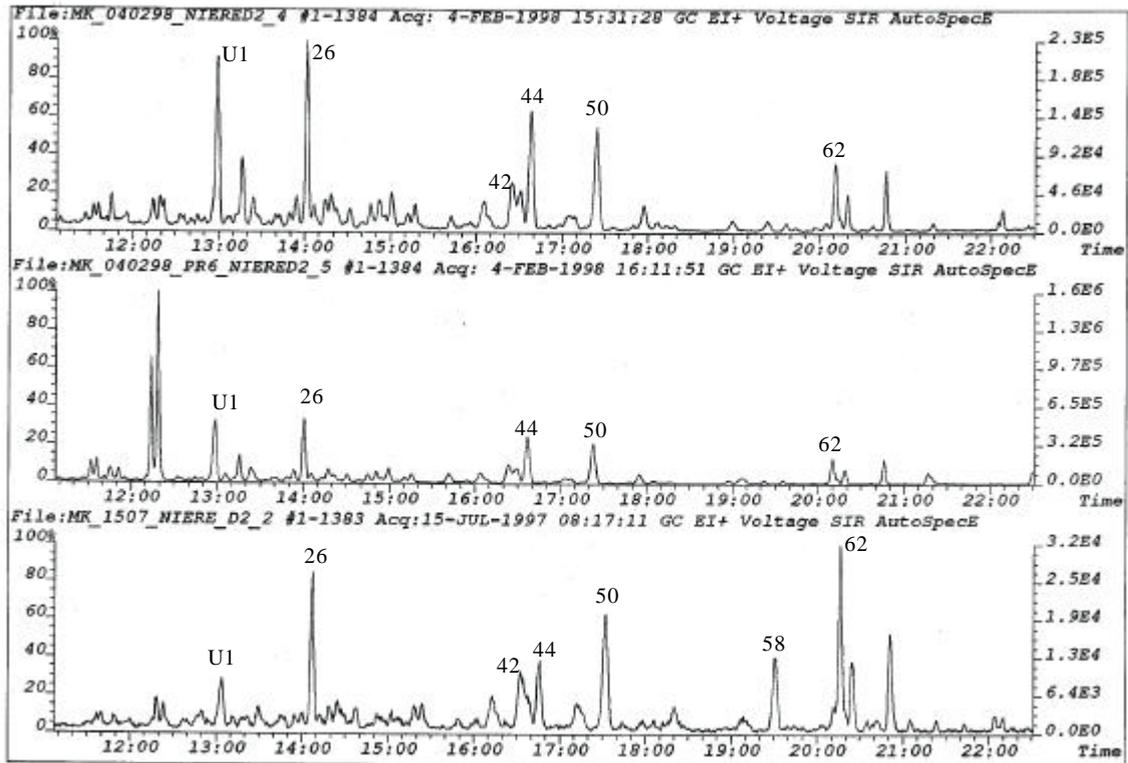


Abbildung 43: Nierenprobe vom 22.4.1997
 oberes Chromatogramm: Aufarbeitung nach halbjähriger Lagerung (Soxhlet-Extraktion)
 mittleres Chromatogramm: Aufarbeitung nach halbjähriger Lagerung (ASE-Extraktion)
 unteres Chromatogramm: Aufarbeitung nach Schlachtung (Soxhlet-Extraktion)

Beim Vergleich der Kongenerenkonzentrationen in dieser Probe ergaben sich infolge der Lagerungsdauer ähnliche Konzentrationsveränderungen, wie sie in der Tabelle 35 schon angeführt wurden. Bei Extraktion dieser gelagerten Nierenprobe mit ASE-Gerät konnten bis auf das Kongener Parlar 58 keine Unterschiede in den Gehalten, die aufgrund der Soxhlet-Extraktion ermittelt wurden, gefunden werden. Da dieser Unterschied in Abbildung 43 nicht zu erkennen ist, sollen die Gehalte für das Kongener Parlar 58 aufgeführt werden. In der gelagerten Nierenprobe betrug der Gehalt bei Soxhlet-Extraktion $0,73\mu\text{g} / \text{kg}$ Frischgewicht, und bei ASE-Extraktion $0,43\mu\text{g} / \text{kg}$ Frischgewicht.

6. Weitere Untersuchungen

6.1. Vorstellung einer alternativen Technik zur Soxhlet-Extraktion

Um lipophile Xenobiotika zu extrahieren oder den Fettanteil in Probenmaterial zu bestimmen, werden verschiedene Extraktionstechniken angewandt. Eine sehr häufig verwendete Methode, die zur Extraktion des Probenmaterials aus dem Fütterungsversuch eingesetzt wurde, ist die nach Soxhlet [72].

Die Extraktion nach Soxhlet ist eine unkomplizierte Methode, die jedes Analytiklabor durchführen kann. Den Anforderungen an eine moderne Extraktionstechnik wird diese Methode aufgrund des hohen Lösungsmittelverbrauches (50-500 ml pro Probe), der langen Extraktionszeiten (2-48 Stunden) [106] und dem niedrigen Automatisierungsgrad jedoch nicht mehr gerecht. Um eine moderne Extraktionsmethode für lipophile Schadstoffe aus tierischem Material zu testen, die eine Soxhlet-Extraktion ersetzen kann, wurden vergleichbare Extraktionen mit der ASE- Extraktionstechnik vorgenommen.

6.1.1 Vorstellung des Extraktionsgerätes ASE 200

Das Extraktionsgerät ASE 200 (Accelerated Solvent Extraction) der Firma Dionex zeichnet sich durch kurze Extraktionszeiten (ca. 5-15 min), einen geringen Lösungsmittelverbrauch (je nach Probeneinwaage zwischen 11 und 40 ml) und einen hohen Automatisierungsgrad aus [107, 108]. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen Übertragbarkeit der Extraktionsparameter, da die gleiche Probenvorbereitung und das gleiche Lösungsmittel wie für die Soxhlet-Extraktion eingesetzt werden kann.

Die kurzen Extraktionszeiten werden insbesondere durch die Verwendung von hohen Drücken (bis 20 MPa) und Temperaturen bis 200°C erreicht. Durch hohe Drücke wird das Sieden des Lösungsmittels oberhalb des Kondensationspunktes vermieden, das Lösungsmittel liegt unverändert in der flüssigen Phase vor. Die dadurch mögliche erhöhte Extraktionstemperatur bewirkt, dass die Extraktionskinetik stark beschleunigt wird. Sie

wird bei der Erhöhung einer Temperatur um 10°C verdoppelt bis verdreifacht, ein ähnlicher Faktor resultiert für die Verkürzung der Extraktionszeit [107].

In der Abbildung 44 ist der Extraktionsapparat ASE 200 schematisch dargestellt.

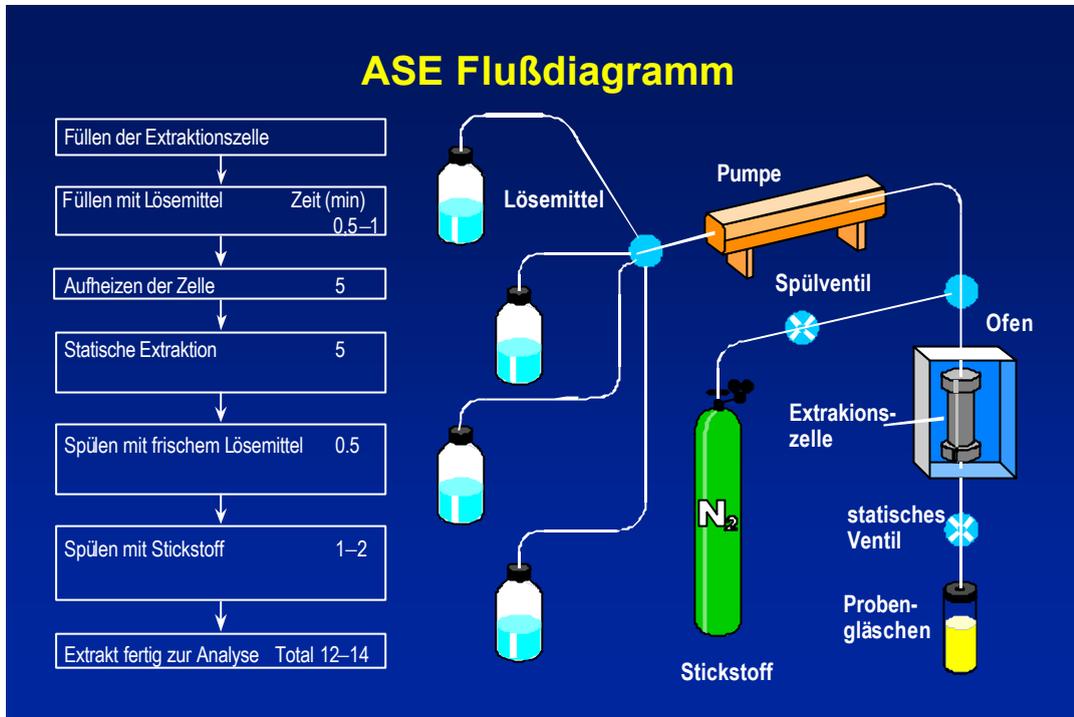


Abbildung 44: Schema der beschleunigten Lösemittlextraktion (aus Informationsbroschüre der Firma Dionex)

Die Methodik der Probenvorbereitung kann von der Soxhlet-Extraktion übernommen werden. Die Proben wurden mit Seesand und wasserfreiem Natriumsulfat vermengt und anschließend in eine Extraktionszelle aus Edelstahl überführt. Die Extraktionszellen werden dann in das Probenkarussell der Extraktionsapparatur eingestellt. Zu Beginn der Extraktion wird die Probe in solcher Zelle automatisch in den Ofen eingeführt und mit Lösungsmittel befüllt. Der Lösungsmittelverbrauch für die Extraktion richtet sich dabei nach der Größe der Zelle und ihrem Füllvolumen. Anschließend erfolgt die Einstellung des Extraktionsdruckes, gefolgt von einem Aufheizen der Probe unter konstantem Druck.

Nach Vorliegen einer konstanten Extraktionstemperatur beginnt die eigentliche statische Extraktion. Extraktionszeit, Extraktionstemperatur, Extraktionsdruck und Anzahl der

Extraktionszyklen sind hierbei frei wählbar. Nach erfolgter Extraktion wird der Extrakt automatisch in ein Probengläschen überführt und die Extraktionszelle wird mit Lösungsmittel nachgespült. Ein weiteres Überführen der letzten Lösungsmittelreste in das Probengläschen erfolgt durch Nachspülen mit Stickstoff. Der Extrakt ist nun für weitere Reinigungsschritte vorbereitet.

Bezüglich der Zahl der Extraktionszyklen ist anzumerken, dass es sich hierbei nicht um komplette Zyklen handelt, wenn mehr als einer gewählt wird. Werden z.B. zwei Zyklen gewählt, wird eine Probe nicht zweimal unter den gleichen Bedingungen extrahiert, sondern der Lösungsmittelverbrauch eines Extraktionszyklus wird in zwei gleiche Teile gesplittet und die Probe wird nacheinander mit diesen Mengen extrahiert. Dadurch kann eine Probe mehrmals extrahiert werden, ohne dass ein Mehrverbrauch an Lösungsmittel resultiert. Für eine so geführte Extraktion ergibt sich jedoch der doppelte Zeitbedarf wie für die Extraktion einer Probe mit nur einem Extraktionszyklus. Aufgrund der relativ kurzen Extraktionszeiten kann dies jedoch durchaus toleriert werden.

6.1.2 Methodenentwicklung für die Extraktion von tierischen Proben

Um die Soxhlet-Methode ersetzen zu können, muss eine dazu äquivalente Extraktionsmethode zwei wesentliche Anforderungen erfüllen:

Eine vollständige Extraktion des Analyten und eine möglichst vollständige Extraktion der Lipide aus dem Probenmaterial.

Zur Ermittlung der optimalsten Extraktionsparameter für die Fettextraktion wurde ein Stück Hühnerbrust homogenisiert. Von diesem Homogenat wurden ca. 4g mit ca. 20g wasserfreien Natriumsulfat und 10g Seesand verrieben. Das vermengte Extraktionsgut wurde dann in eine große Extraktionszelle (33 ml) überführt.

Die so vorbereiteten Proben wurden unter verschiedenen Bedingungen extrahiert. Die entsprechenden Extraktionsparameter sind in Tabelle 36 angeführt.

Tabelle 36: Fettextraktion aus einer Hühnerbrust unter Verwendung verschiedener Extraktionsparameter

	Soxhlet Extraktion	ASE 200 Extraktion, Z = Zyklen				
Extraktions- zeit	6 Stunden	15 min	15 min	15 min	15 min	15 min
ASE-Be- dingungen		100°C 100bar, 1Z.	150°C 100bar, 1Z	200°C 100 bar, 1Z	150°C 150 bar, 1Z	100°C 100 bar, 2Z.
Extrahierter Fettanteil [%]	1,47	1,00	1,25	1,42	1,18	0,97
Standard- abweichung	0,12	0,07	0,19	0,21	0,11	0,08
Vertrauens- bereich	0,30	0,17	0,47	0,52	0,27	0,20

Wie aus Tabelle 36 zu ersehen ist, kann die Menge der extrahierten Anteile überwiegend durch Temperaturerhöhung, weniger aber durch eine Druckerhöhung gesteigert werden.

Die ermittelten Vertrauensbereiche unter den verschiedenen ASE-Extraktionbedingungen überschneiden sich mit dem Vertrauensbereich aus der Soxhlet-Extraktion, so dass die Fett-Extraktion über Soxhlet-Extraktionstechnik gut durch die ASE-Technik ersetzt werden kann.

Aufgrund des geringen Fettanteils im Probenmaterial und den damit verbundenen Schwierigkeiten bei der Homogenisierung waren die Standardabweichungen der extrahierten Lipidanteile relativ groß. Die vergleichbarsten Ergebnisse mit einer Soxhlet-Extraktion (Lösungsmittel n-Hexan) wurden bei einer ASE- Temperatur von 200°C erzielt. Bei weiteren Proben (Eidotter ca. 30% Fett), die einen deutlich höheren Lipidgehalt als die verwendete Hühnerfleischproben besaßen, wurde bei 200°C deutlich mehr extrahiert als bei der Soxhlet-Extraktion. Die besten Übereinstimmungen mit der Soxhlet-Extraktion bezüglich des extrahierten Fettanteils wurden für Dotterproben bei einer ASE- Temperatur von 100°C erreicht.

Zur Extraktion von Fetten aus Proben tierischen Ursprungs, wie Dotter, Fleisch, Leber und Nieren, wurden deshalb im Routinebetrieb folgende Parameter verwendet:

Extraktionstemperatur:	100°C
Extraktionsdruck:	100 bar oder 10 MPa
Statische Extraktion:	10 min
Lösemittel-Spülung:	80 % des Zellvolumens
Stickstoff-Spülung:	1 MPa für 120 s
Extraktionsmittel:	Hexan
Extraktionszyklen:	1

Für Proben mit einem Fettanteil von weniger als 5 % wird eine Extraktionstemperatur von 150°C vorgeschlagen.

Die Menge an Natriumsulfat, die zum „Binden“ des Wassers aus der Probe notwendig ist, richtet sich nach dem Wassergehalt des Probenmaterials. Für sehr mageres Fleisch war ca. die sechsfache Menge der Probeneinwaage erforderlich. Die Probeneinwaage wird ausschließlich durch die Größe der verwendeten Extraktionszelle reglementiert. Bei Wahl der größten Extraktionszelle mit einem Volumen von 33 ml wird somit eine Einwaage von 4 bis 6 g Fleisch möglich.

Bei fetthaltigeren Proben kann die Menge des eingesetzten Natriumsulfates verringert werden. So wurde bei den Nierenproben nur die fünffache Menge an Natriumsulfat mit guten Ergebnissen verwendet und bei den Dotterproben nur die dreifache Menge, bezogen auf die jeweilige Matrixeinwaage [108]. Bei einer durchschnittlichen Einwaage von 3-4 g Eidotter konnte eine 22 ml Extraktionszelle befüllt werden, was den Lösungsmittelverbrauch senkte. Um mehr Probenmaterial in einer Extraktionszelle extrahieren zu können, könnten getrocknete Proben verwendet werden. Alternativ können auch zwei Extraktionszellen mit derselben Probe befüllt werden, um anschließend die Extrakte zu vereinigen.

6.1.3 Extraktion von Toxaphen mit dem ASE 200

Zum Vergleich der Extraktionseffektivität für Toxaphen mit ASE- und Soxhlet- Technik wurde folgendes Probenmaterial aus dem Fütterungsversuch herangezogen: Dotter, Fleisch, Fett, Leber und Niere. Die exakten Extraktionsparameter für die ASE wurden in 6.1.2 bereits beschrieben (Temperatur 100°C). Da das Gerät nur kurze Zeit zur Verfügung stand, wurde mit nur einem Extraktionszyklus bei jeder Extraktion gearbeitet (volles Lösungsmittelvolumen in einem Extraktionszyklus). Nach erfolgter Extraktion wurde das gleiche Clean-up Verfahren wie bei den Proben aus dem Fütterungsversuch nach der vorhergehenden Soxhlet-Extraktion angewendet.

Zu Beginn der Extraktionsversuchsreihe wurde überprüft, ob drastische Extraktionsbedingungen, wie Extraktionen bei 200°C und 150 bar, eine Änderung im absoluten Toxaphengehalt oder dem Kongenemuster hervorrufen. Bei der Extraktion von 2 unterschiedlichen Proben unter diesen Extrem-Bedingungen konnte keine Veränderungen im Muster und auch nicht im absoluten Toxaphengehalt festgestellt werden.

In einigen Leber- und Nierenproben zeigten sich jedoch bei Extraktion mit dem ASE-Gerät Unterschiede gegenüber der mit Soxhlet durchgeführten (siehe Punkt 5.4). Diese Veränderungen konnten jedoch nicht bei allen Leber- und Nierenproben beobachtet werden. In den angesprochen Proben traten jedoch auch Veränderungen während der Lagerungsdauer auf (Extraktion von zwei Proben mit Soxhlet in einem Abstand von einem halben Jahr).

Darüberhinaus wurde geprüft, ob nur ein Extraktionszyklus genügt, um Proben vollständig zu extrahieren.

Dazu wurde eine Probe zweimal hintereinander mit voller Lösungsmittelmenge extrahiert, wobei bei jedem Durchlauf der Extrakt getrennt gesammelt wurde. Zwar konnten im zweiten Extrakt noch geringe Mengen von Toxaphen festgestellt werden, doch lagen diese in Abhängigkeit vom jeweiligen Kongener unter 0,5 – 1 %, so dass die Extraktionseffektivität schon nach dem ersten Zyklus als durchaus ausreichend zu bezeichnen ist. Höhere Extraktionsausbeuten lassen sich möglicherweise mit einem zweiten Extraktionszyklus erreichen, was aber, wie bereits erwähnt, wegen der großen Zahl an zu

untersuchenden Proben in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht durchgeführt werden konnte.

Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse, die sich aus dem Vergleich der beiden Extraktionstechniken ergaben, vorgestellt werden.

Zeichenerklärung für die Abbildungen 45-48

P	Parlar Nr.
ASE	Extraktion mit ASE 200
Fl	Keine Extraktion, Probe wurde direkt auf die Florisil-Säule gegeben
Sox	Extraktion nach Soxhlet

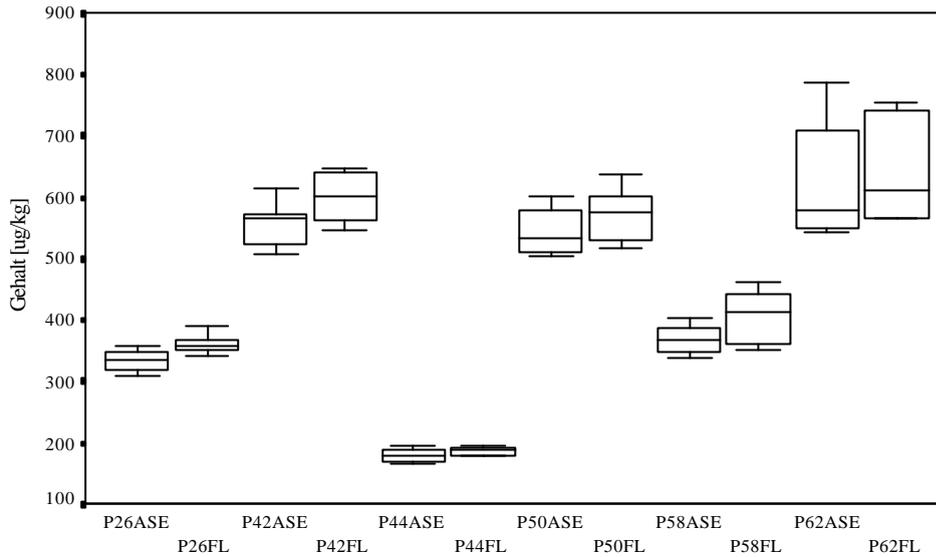


Abbildung 45 und Tabelle 37: Vergleich der Toxaphengehalte in einer Hühnerfettprobe nach Extraktion mit dem ASE-Gerät und nach Lösen in n-Hexan (ohne Soxhlet-Extraktion), n = 6 Messungen

Parlar Nr.	ASE-Extraktion			Soxhlet-Extraktion		
	Mittelwert	Standardabweichung	Vertrauensbereich	Mittelwert	Standardabweichung	Vertrauensbereich
25	194,4	5,0	5,2	209,8	15,0	15,7
26	335,1	18,3	19,2	361,5	17,4	18,3
31	131,6	7,9	8,3	152,0	14,5	15,2
32	138,9	7,7	8,1	153,5	16,4	17,2
40+41	158,4	12,1	12,7	169,3	20,2	21,2
42	559,5	39,3	41,3	600,4	45,6	47,8
44	180,17	11,5	12,1	184,8	14,2	14,9
50	544,5	39,7	41,7	572,8	44,2	46,4
51	189,1	11,7	12,3	200,5	21,7	22,8
58	369,9	26,3	27,6	407,3	43,4	45,6
59	69,4	4,7	4,9	78,5	7,4	7,8
62	624,4	101,3	106,3	642,4	87,3	91,6
63	32,25	4,5	4,7	35,1	4,8	5,0
69	96,13	3,72	3,9	109,5	12,4	13,0

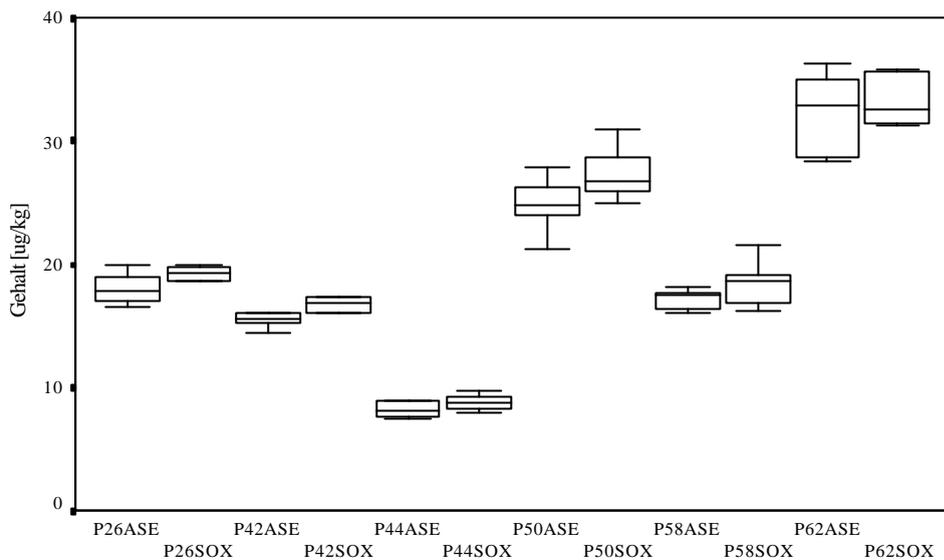


Abbildung 46 und Tabelle 38: Vergleich der Toxaphengehalte einer Dotterprobe (bezogen auf die Frischmasse FM) nach Extraktion mit dem ASE-Gerät und nach Extraktion mit Soxhlet-Technik, n = 6 Messungen

Parlar Nr.	ASE-Extraktion			Soxhlet-Extraktion		
	Mittelwert	Standardabweichung	Vertrauensbereich	Mittelwert	Standardabweichung	Vertrauensbereich
25	4,01	0,12	0,13	3,99	0,26	0,27
26	18,09	1,29	1,36	19,29	0,60	0,63
31	1,05	0,17	0,18	1,08	0,14	0,15
32	2,28	0,36	0,38	2,49	0,31	0,32
40+41	3,77	0,46	0,48	3,95	0,30	0,32
42	16,03	1,67	1,76	16,94	0,57	0,60
44	8,26	0,66	0,69	9,04	0,51	0,54
50	24,87	2,24	2,35	27,79	2,01	2,11
51	1,34	0,13	0,13	1,41	0,36	0,38
58	16,79	1,71	1,80	19,08	1,69	1,77
59	1,07	0,09	0,10	1,268	0,21	0,22
62	31,05	4,92	5,16	33,33	2,22	2,33
63	1,00	0,08	0,09	1,11	0,32	0,34
69	3,17	0,69	0,73	3,44	0,35	0,36

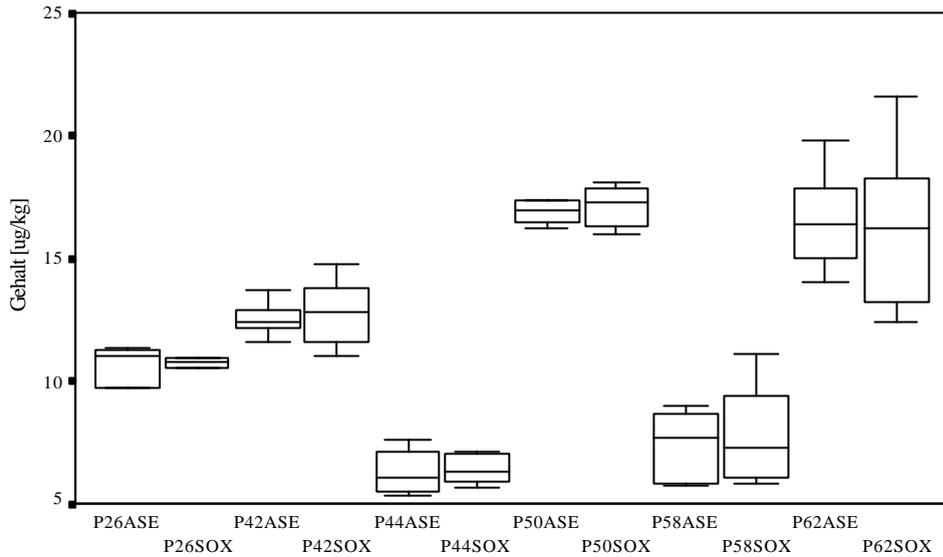


Abbildung 47 und Tabelle 39: Vergleich der Toxaphengehalte einer Muskelgewebsprobe (bezogen auf die Frischmasse FM) nach Extraktion mit dem ASE-Geräte und nach Extraktion mit Soxhlet- Technik, n = 6 Messungen

Parlar Nr.	ASE-Extraktion			Soxhlet-Extraktion		
	Mittelwert	Standard-abweichung	Vertrauens-bereich	Mittelwert	Standard-abweichung	Vertrauens-bereich
25	3,96	0,21	0,22	4,13	0,37	0,39
26	10,74	0,76	0,79	10,87	0,67	0,70
31	2,07	0,19	0,20	2,24	0,28	0,29
32	2,06	0,12	0,13	2,11	0,17	0,17
40+41	3,73	0,39	0,41	3,78	0,19	0,20
42	12,55	0,73	0,76	12,83	1,38	1,45
44	6,33	0,94	0,98	6,44	0,58	0,60
50	17,08	0,98	1,03	17,16	0,87	0,92
51	2,91	0,25	0,26	3,03	0,16	0,16
58	7,47	1,41	1,48	7,87	2,14	2,24
59	0,93	0,09	0,10	0,98	0,21	0,22
62	16,14	2,70	2,83	16,34	3,55	0,15
63	0,90	0,08	0,09	0,95	0,14	0,15
69	1,16	0,32	0,34	1,27	0,47	0,49

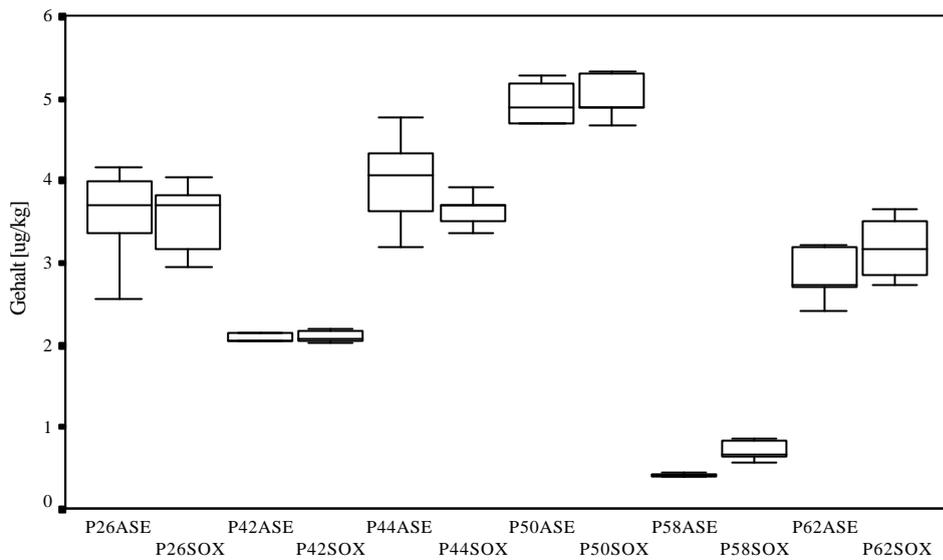


Abbildung 48 und Tabelle 40: Vergleich der Toxaphengehalte einer Nierenprobe (bezogen auf die Frischmasse FM) nach Extraktion mit dem ASE-Geräte und nach Extraktion mit Soxhlet-Technik, n = 6 Messungen

Parlar Nr.	ASE-Extraktion			Soxhlet-Extraktion		
	Mittelwert	Standardabweichung	Vertrauensbereich	Mittelwert	Standardabweichung	Vertrauensbereich
25	0,42	0,06	0,06	0,58	0,03	0,03
26	3,56	0,63	0,67	3,62	0,48	0,50
31	0,20	0,04	0,04	0,18	0,06	0,06
32	0,24	0,04	0,04	0,29	0,06	0,06
40+41	0,76	0,10	0,11	0,77	0,04	0,05
42	2,05	0,21	0,22	2,12	0,09	0,10
44	4,00	0,61	0,64	3,71	0,16	0,17
50	4,79	0,55	0,58	5,06	0,32	0,33
51	0,23	0,08	0,09	0,21	0,05	0,05
58	0,43	0,03	0,03	0,73	0,14	0,14
62	2,85	0,35	0,37	3,18	0,42	0,44

6.2 Untersuchung der Toxaphene mit verschiedenen GC-Säulen

Für die gaschromatographische Trennung mit anschließender Quantifizierung von Toxaphenrückständen werden meist Säulen mit der stationären Phase 5 % - Diphenyl - und 95 % Dimethylpolysiloxan verwendet, wobei die Säulenlängen von 30 bis 60 m variieren [109, 110]. Bei Säulen mit Belegung dieses Typs handelt es sich um unpolare Säulen, die unter Handelsnamen wie DB5, HP5, SE 52 und CP-Sil 8 von verschiedenen Herstellern erhältlich sind.

Die Auswahl stark polarer GC- Säulenphasen ist wegen ihres niedrigeren Temperaturmaximums begrenzt. Einige dieser polaren Säulentypen werden aber dennoch verwendet. So wurden bei der Analytik von Toxaphenkomponenten mit der multidimensionalen Gaschromatographie nach [68] eine DX 4-, eine FFAP- und eine Rtx 2330- Trennsäule eingesetzt. Bei Verwendung einer stark polaren Rtx 2330-Trennsäule wurden jedoch teilweise Zersetzungsreaktionen von Toxaphenkongeneren beobachtet [110]. Auf einer DX 4-Trennsäule wurde ebenfalls Zersetzung der Kongenere Parlar 26 und 62 festgestellt [111]. Diese Zersetzungsreaktionen konnten bei der multidimensionalen Gaschromatographie nicht beobachtet werden; eine mögliche Erklärung hierfür ist nach [68] in einer kürzeren Säulenlänge und einer niedrigeren Endtemperatur von 215°C zu sehen.

Von Vetter et al. wurde eine CP-Sil 2 Trennsäule (unpolarer als die DB 5) eingesetzt. Beim Einsatz dieser Säule wurde das vom Hersteller empfohlene Temperaturlimit von 200°C bei der Chromatographie von Toxaphenrückständen (Endtemperatur des Chromatographieprogrammes 290°C) zwar deutlich überschritten, dies führte jedoch zu keinen Problemen [112]. Aber auch mit dieser GC- Säule ist keine komplette Trennung des 22 Komponenten-Standards möglich (Coelution der Kongenere Parlar 39 und 40).

Mit allen angeführten und getesteten GC- Säulen war es nicht möglich, den 22 Komponenten-Standard komplett in alle 22 Peaks zu trennen.

Trotz aller Bemühungen und unterschiedlicher GC-Säulen ist es wohl nicht möglich, alle Kongenere des technischen Toxaphens auf einer derzeit kommerziell erhältlichen GC-Säule zu trennen. Es muß daher bei der Chromatographie von Toxaphenrückständen wohl auch in Zukunft immer mit Coelutionen von Kongeneren gerechnet werden.

In den nachfolgenden Untersuchungen auf zwei GC-Säulen unterschiedlicher Polarität sollten die Ergebnisse aus dem Fütterungsversuch bestätigt und die Trenneigenschaften der Säulen

für Toxaphenkongenere aufgezeigt werden. In diesem Zusammenhang wurde der 22 Komponenten-Standard und einige Proben aus dem Fütterungsversuch vermessen.

6.2.1 Messung der Toxaphene auf einer Trennsäule des Typs XLB (30 m x 0,25 mm x 0,25µm) der Firma J + W

Bei dieser GC- Säule wird die exakte Zusammensetzung der stationären Phase aus Wettbewerbsgründen nicht genannt. Laut Hinweis der Herstellerfirma ist diese Säule besonders für die Trennung von Chlorpestiziden geeignet. Für die Messungen wurde das gleiche Temperaturprogramm verwendet wie zur Analyse der Proben aus dem Fütterungsversuch.

Bei der Chromatographie des 22 Komponentenstandards zeigte sich im Vergleich zur DB 5- Säule für zwei Kongenere eine andere Elutionsreihenfolge. Die Reihenfolge der Kongenere Parlar 25 und 26 dreht sich auf der XLB um, hier eluiert die Komponente Parlar 26 vor 25. Zusätzlich konnten auf dieser Säule die Kongenere Parlar 40 von Kongener Parlar 41, Kongener Parlar 42 a von Kongener Parlar 42 b, und Kongener Parlar 62 von Kongener Parlar 63 getrennt werden. Da die Verbindungen 42 a und 42 b aber nicht als Einzelstandard vorlagen, kann keine Aussage über die tatsächliche Elutionsreihenfolge dieser Kongenere getroffen werden. Um Verwechslungen bei der Zuordnung zu vermeiden, wurden die Kongenere mit den Zusätzen x und y versehen, wobei das Kongener 42 x vor dem Kongener 42 y eluiert. Eine Coelution tritt bei der XLB-Phase zwischen den Kongeneren Parlar 51 und 56 auf (siehe Abb.49).

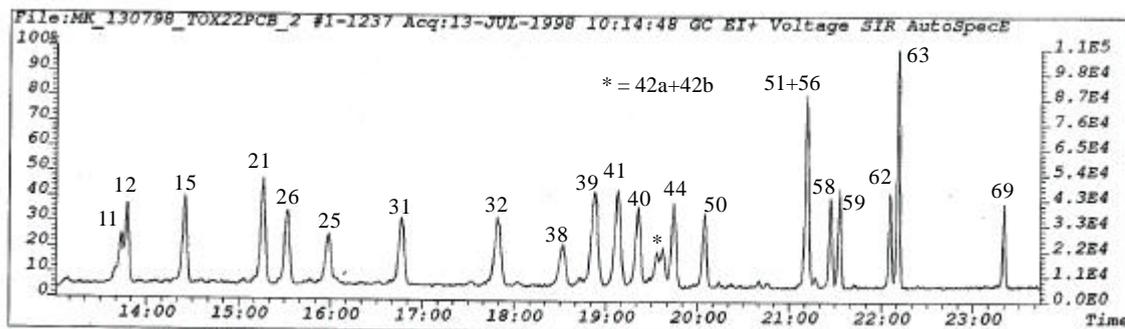


Abbildung 49: Chromatogramm des 22 Toxaphen-Komponentenstandards auf einer XLB (30m x 0,25mm x 0,25µm), Temperaturprogramm siehe Punkt 3.2

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus dem Fütterungsversuch wurden Wiederholungsmessungen mehrerer Proben durchgeführt. In der Abbildung 50 sind die Chromatogramme der Probe (Matrix: Fett gegen Ende des Abklingversuches) auf der DB 5 und der XLB zu sehen.

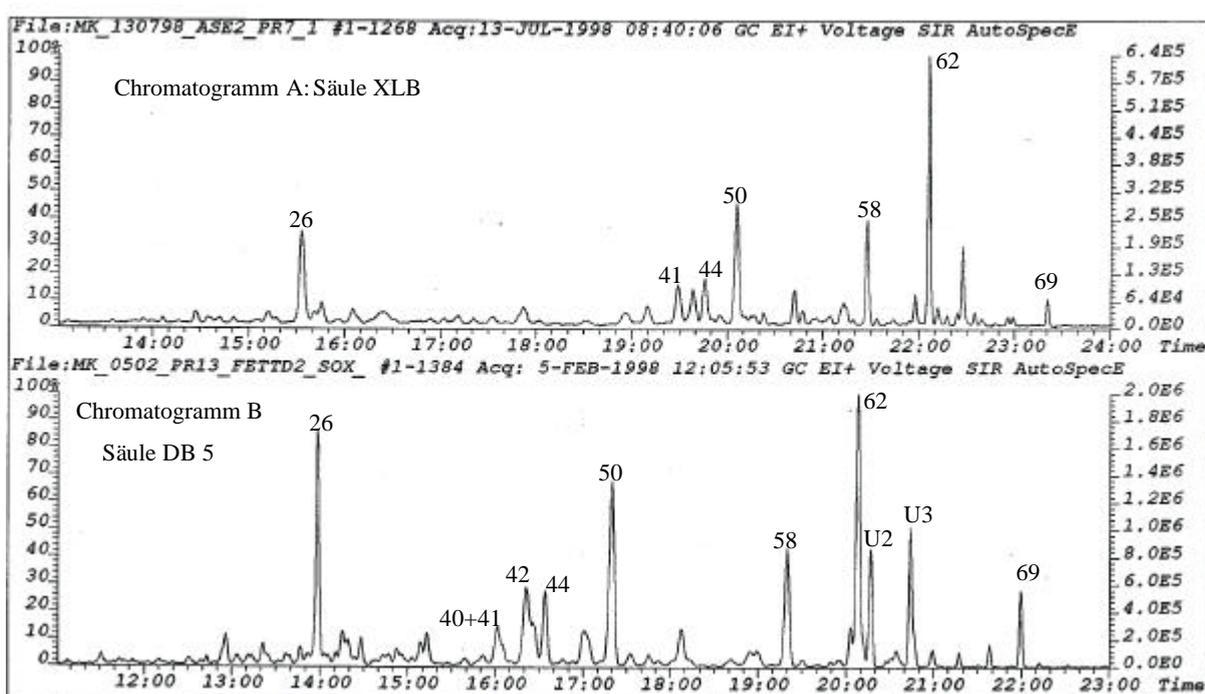


Abbildung 50:

Chromatogramm A: Fettprobe gegen Ende des Abklingversuches (22.4.1997) auf der XLB

Chromatogramm B: Fettprobe gegen Ende des Abklingversuches (22.4.1997) auf der DB 5

Für beide Chromatographieläufe wurde dasselbe Temperaturprogramm (Punkt 3.2) verwendet.

Auf der XLB konnten die Kongenere Parlar 40 und 41 voneinander getrennt werden. In der Probe konnte auf der XLB nur noch das Kongener 41 nachgewiesen werden. Das Kongener Parlar 40 war nur noch in Spuren zu quantifizieren. Für die Kongenere 42 x und y war nur ein Peak zu erkennen, verursacht dadurch, dass Kongener 42 x in deutlich höheren Konzentrationen vorlag als 42 y. Ein weiterer Unterschied in der Trennleistung der XLB zur DB 5 ergibt sich für die zwei unbekanntes Toxaphenpeaks U2 und U3. Auf der XLB-Trennsäule ist nur noch ein Peak, der nach Parlar 62 eluiert, zu sehen. Da diese Verbindungen nicht als Einzelverbindungen vorlagen, konnte leider keine Aussage über eine mögliche Umkehr der Elutionsreihenfolge dieser Verbindungen auf der XLB-Trennsäule gemacht

werden. Eine weitere Auffälligkeit ergab sich für die Komponente Parlar 26. In dem mit der XLB-Phase aufgenommenen Chromatogramm gehört diese Verbindung nicht mehr zu denen mit den höchsten Responsewerten.

Für die Bestätigung der Quantifizierungsergebnisse auf den unterschiedlichen Säulen wurden die Kongenere Parlar 21, 25, 26, 31, 32, 40 + 41 (bei der XLB-Säule Summe aus 40 und 41), 42 (bei der XLB-Säule Summe aus 42 x und 42 y), 44, 50, 58, 59, 62, 63 und 69 miteinander verglichen. Hierzu wurde eine Fettprobe aus der Abklingphase auf beiden Säulen mehrmals vermessen.

Für die Kongenere 42, 44, 50, 59, 62, 63 und 69 wurden auf der XLB Gehalte gemessen, die sehr gut mit den auf der DB 5 ermittelten vergleichbar waren. Auch für die Kongenere 40 + 41 waren die Abweichungen tolerierbar, jedoch war die Komponente Parlar 40 auf der XLB-Säule aufgrund einer Coelution nur sehr schwer zu bestimmen. Auf der XLB-Phase wurden deswegen etwa 15% geringere Konzentrationen gefunden; aufgrund der relativ großen Standardabweichung überschneiden sich aber die Vertrauensbereiche aus beiden Messungen eindeutig.

Für die Kongenere Parlar 21, 25, 31 und 32 waren auf der XLB-Phase die Peakintegrationsgrenzen nur sehr schwer zu bestimmen, so dass für diese Kongenere nur begrenzt eine Aussage getroffen werden kann. Klar ist jedoch, dass die Komponenten Parlar 21, 25 und 31 auf der DB 5-Phase offensichtlich überschätzt werden. Bei Kongener 32 zeigt sich auf der XLB-Säule eine Coelution mit einem unbekanntem Kongener. Für das Kongener Parlar 58 überschneiden sich zwar die Vertrauensbereiche, jedoch sind diese aufgrund von Messschwankungen sehr groß. So wurde mit der XLB deutlich weniger quantifiziert (bis zu 20%). Auch Kongener Parlar 26 wurde auf der XLB-Phase deutlich weniger gefunden. Hier wurden nur $55,4 \pm 7,2 \mu\text{g} / \text{kg}$ gemessen, während mit der DB 5 $76,33 \pm 5,7 \mu\text{g} / \text{kg}$ ermittelt wurden. Dies deutet auf die Coelution einer unbekanntem Verbindung mit dem Kongener Parlar 26 auf der DB 5 hin.

Bei der vergleichenden Chromatographie einer Probe (Matrix Fett) aus dem Anfütterungsversuch ergab sich bis auf wenige Ausnahmen bei den Kongeneren die gleiche Bewertung wie oben. Abweichend zu der Probe aus dem Abklingversuch wurde das Kongener Parlar 42 x und y, sowie Parlar 62 hier mit der XLB stark überschätzt.

6.2.2 Messung der Toxaphene auf einer Optima 17 (50 m x 0,25 mm x 0,25 µm) – GC-Säule der Firma Machery und Nagel

Die Proben wurden mit folgendem Temperaturprogramm gemessen:

70°C (2min) - 180°C (15°C/min) - 250°C (1,5°C/min, 5min) - 290°C (10°C/ min, 15 min) [82].

Die Elutionsreihenfolge der Kongenere im Standardgemisch entspricht der, wie sie auf der XLB-Phase beschrieben wurde. Zusätzlich ist auf der Optima 17 noch die vollständige Trennung der Kongenere Parlar 11 und 12 möglich. Mit dieser Säule lassen sich sehr gute Ergebnisse erzielen [113]. Ein Chromatogramm des 22 Komponentenstandards ist in der Abbildung 51 zu sehen.

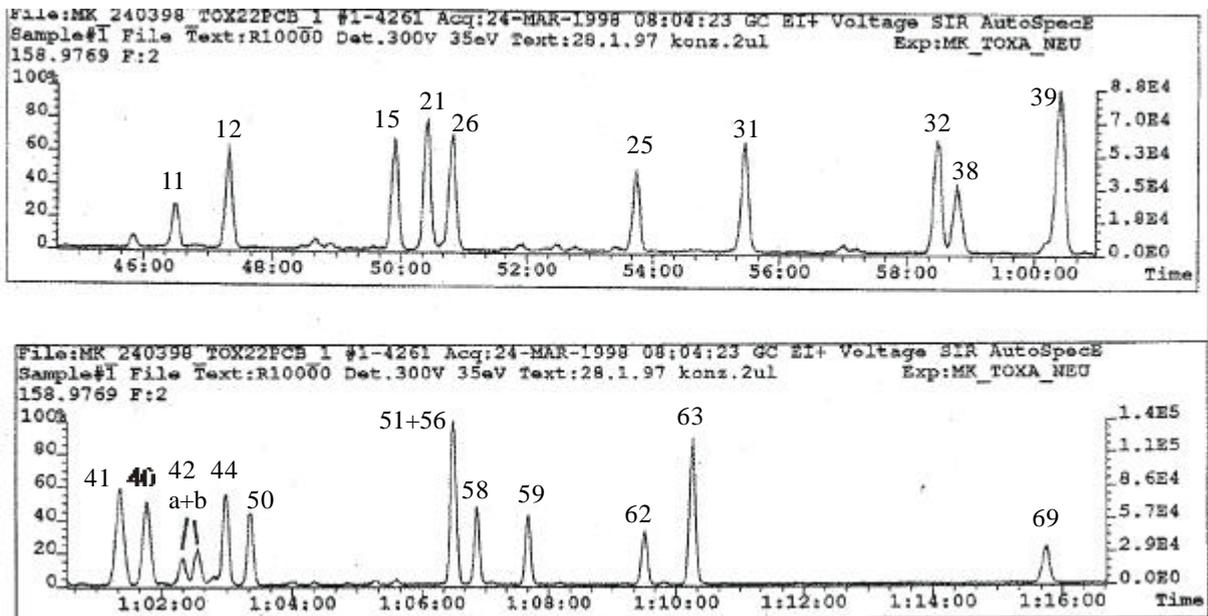


Abbildung 51: Trennung des 22 Komponentenstandard auf einer Optima 17 von Machery-Nagel

Bei der Quantifizierung einer Probe aus dem Anfüterungsversuch ergab sich ein ähnliches Resultat wie mit der XLB.

Bei der Quantifizierung der Probe stimmten die Werte der meisten Kongenere gut mit den auf der DB 5-Phase ermittelten überein. Parlar 25, 31, 32, 38 und 39 wiesen aber geringere Werte auf, während hier das Kongener Parlar 44 deutlich höhere Werte als mit der DB 5 ergab. Für

die meisten Kongenere wie 40 + 41, 50, 58, 59, 62, 63 und 69 ergeben sich jedoch gute Übereinstimmungen auf beiden Säulen. Mit der Optima 17-Säule wurden Kontrollmessungen durchgeführt, die die auf der DB5-Phase ermittelten Halbwertszeiten überprüfen sollten. Dabei ergaben sich nur geringe Unterschiede in den Halbwertszeiten auf den beiden GC-Säulen. Auffällig bei der Überprüfung der Proben aus dem Abklingversuch war, dass die Kongenere Parlar 26 und 42 zu Beginn mit der Optima 17 und gegen Ende des Versuches mit der DB 5 überschätzt wurden. Grund hierfür könnten Coelutionen von Toxaphenkongeneren sein, die deutlich andere Halbwertszeiten als die genannten Kongenere aufweisen.

Bei den Messungen der Proben aus dem Carry over Versuch fiel auf, dass im Retentionsbereich, in dem die Kongenere Parlar 38 bis 44 eluieren, mehrere unbekannte Peaks auftreten, was auf eine bessere Trennung der Toxaphekongenere in diesen Bereich mit der Optima 17 hindeutet.

6.3 Messungen von Toxaphenkongeneren auf weitere Fragmentationenspuren nach Elektronenionisation

Hiermit sollte geprüft werden, ob sich neben dem Dichlortropyliumion noch weitere Fragmentationen für eine zuverlässige Analytik der wichtigsten Toxaphenkongeneren eignen. Mit diesen Fragmentationen sollten die Ergebnisse aus dem Fütterungsversuch durch Kontrollmessungen einiger Proben überprüft werden.

EI-Massenspektren von Toxaphenkongeneren zeichnen sich durch eine große Komplexität im Fragmentierungsmuster aus. Aufgrund der Vielzahl der Einzelverbindungen im technischen Toxaphen ist es schwierig, charakteristische Fragmentationen zu finden, also solche Ionen, die von allen Toxaphenkongeneren gebildet werden. Intensive Bruchstücke mit den Massen 83, 159, 195 und 231 sind in den Massenspektren der meisten Kongeneren festzustellen [77]. Ein weiteres Charakteristikum ist, dass die meisten Bornane in ihren EI-Spektren kein Molekülion aufweisen [77].

6.3.1 Untersuchung von Fragmentationen im Massenbereich über m/z 300

Sehr intensive Fragmentationen erhält man in den höheren Massenbereichen über ($m/z = 300$) infolge der Eliminierung von Cl, HCl, HCl_2 , CHCl_2 und Cl_2HCl [77,86,113,115]. Aufgrund der Tatsache, dass bei den Chlorbornanen das Molekülion nicht sichtbar ist, ist das $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ -Fragment dasjenige, welches die höchste Masse im EI-Spektrum aufweist. Dieses Fragment wird von allen Bornanen aus dem 22 Komponentenstandard gebildet. Es wird aber von den verschiedenen Kongeneren in deutlich unterschiedlichen Intensitäten gebildet. Leider ist die Intensität dieser Fragmentationen für einige Verbindungen, vor allem die höher chlorierten Verbindungen, wie Parlar 50 und 62, sehr gering.

Da Chlorbornane im EI-Massenspektrum kein Molekülion bilden, stellt dieses $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ -Fragmentation also eine wichtige Informationsquelle über den Chlorierungsgrad der vorliegenden Kongeneren dar.

Bei der Registrierung des $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ -Fragmentations war zu beobachten, dass höher chlorierte Toxaphen-Kongeneren Fragmentationen bilden, die auf den Massenspuren der niedriger chlorierten Verbindungen zusätzliche Signale ergeben [Abb.52]. So überlagern Ionen der Masse 410,8, die aus der Verteilung des $[\text{M}-\text{Cl}-\text{HCl}]^+$ -Fragmentations der

Decachlorbornane stammen, das $[M-Cl]^+$ - Fragmentation der Nonachlorbornane (m/z 410,8). Analog dazu besitzt das Fragmentation der Nonachlorbornane $[M-Cl-HCl]^+$ mit (m/z 376,8) dieselbe Masse wie das $[M-Cl]^+$ - Fragmentation der Octachlorbornane. Bei einer Messung des $[M-Cl]^+$ - Fragmentes mit niederauflösender Massenspektrometrie kommt es daher zu Überlagerungen.

Wie aus der nachfolgenden Tabelle 41 zu sehen ist, unterscheiden sich die Massen der typischen Fragmentationen auf der zweiten Stelle nach dem Komma, was somit eine Trennung der Fragmente mit hochauflösender Massenspektrometrie zulässt. Mit einer Auflösung von ca. 20.000 können diese Fragmentationen aufgetrennt werden [77].

Tabelle 41: Massen von verschiedenen Fragmentationen der Chlorbornane.

Die jeweils drei intensivsten Peaks aus der Ionenmassenverteilung sind aufgeführt. In den eckigen Klammern ist das theoretische Isotopenverhältnis in %, jeweils bezogen auf den Basispeak im Fragment, angegeben.

	Hexachlor- Bornane	Heptachlor- Bornane	Octachlor- bornane	Nonachlor- bornane	Decachlor- bornane
$[M-Cl]^+$	308,9352 [100]	342,8963 [100]	376,8573 [100]	412,8154 [100]	446,7764 [100]
	310,9324 [64]	344,8934 [80]	378,8544 [96]	410,8183 [89]	444,7793 [78]
	306,9382 [62]	340,8992 [52]	380,8544 [52]	414,8125 [64]	448,7735 [75]
$[M-HCl]^+$		341,8884 [100]	375,8495 [100]	411,8076 [100]	445,7686 [100]
		343,8855 [80]	377,8466 [96]	409,8105 [89]	443,7715 [78]
		339,8914 [52]	379,8436 [51]	413,8047 [64]	447,7657 [75]
$[M-Cl-HCl]^+$		306,9196 [100]	340,8806 [100]	374,8416 [100]	410,7997 [100]
		304,9225 [64]	342,8777 [80]	376,8387 [96]	408,8027 [89]
		308,9167 [62]	338,8835 [52]	378,8358 [52]	412,7968 [64]
$[M-CHCl_2]^+$			328,8806 [100]	362,8416 [100]	398,7997 [100]
			330,8777 [80]	364,8387 [96]	396,8027 [89]
			326,8835 [52]	366,8358 [51]	400,7968 [64]
$[M-Cl-2-HCl]^+$				338,8650 [100]	372,8260 [100]
				340,8621 [80]	374,8231 [96]
				336,8679 [52]	376,8202 [52]

6.3.1.1 Messung des $[M-Cl]^+$ -Fragmentions

Zur Messung des $[M-Cl]^+$ -Fragmentes wurden die zwei intensivsten Massen aus der Fragmentionisotopenverteilung der entsprechenden Verbindungen detektiert. Die Massen können der Tabelle 41 entnommen werden. In der Abbildung 52 ist das Chromatogramm des 22 Komponentenstandards zu sehen. Für jeden Chlorierungsgrad (6 bis 10) wurde eine Massenspur aufgezeichnet.

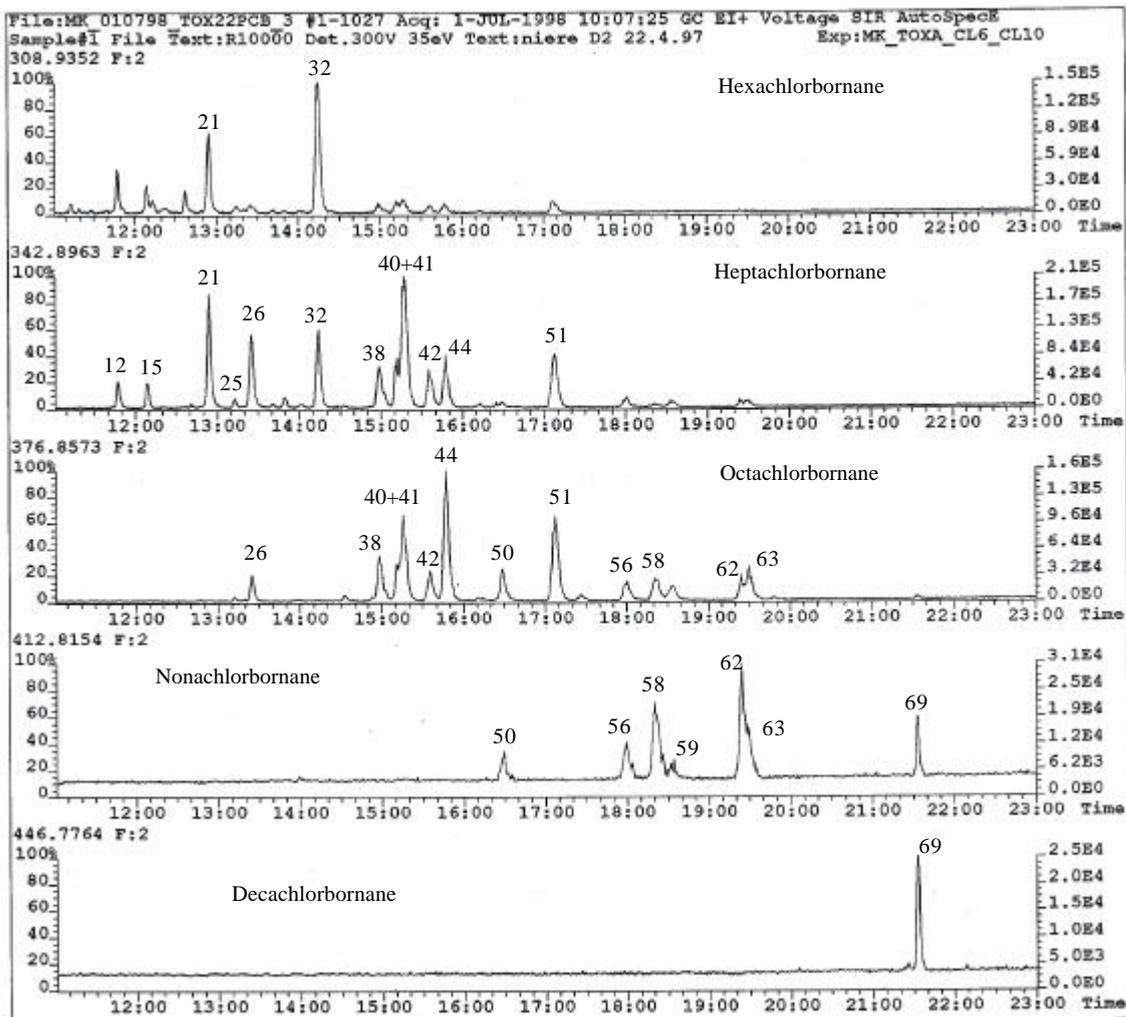


Abbildung 52: Chromatogramm des 22 Komponentenstandards mit Registrierung des $[M-Cl]^+$ - Fragments bei $R = 10.000$

Wie in Abbildung 52 zu sehen ist, sind Interferenzen von höher chlorierten Verbindungen auf den Massenspuren der jeweils um ein Chlor niedriger chlorierten Verbindungen bei einer Auflösung von 10.000 nicht auszuschließen. Erst bei einer höheren Auflösung von ca. 20.000 können die Toxaphenkongenere nach ihrem Chlorierungsgrad getrennt werden. Wie aber in der Abbildung zu sehen ist, können dann aber nicht mehr alle Toxaphenkongenere detektiert werden, da durch die höhere Auflösung die Nachweisgrenze verschlechtert wird.

Desweiteren werden bei dieser Messung die Camphene nicht oder nur zu einem geringen Teil erfasst. Der Grund hierfür liegt im anderen chemischen Grundgerüst der Camphene. Die Camphene besitzen aufgrund der Doppelbindungen andere Massen, so dass sich bei der Abspaltung von einem Chloratom Massen ergeben, die sich von denen der entsprechenden Bornane bereits im Bereich ganzer Masseneinheiten unterscheiden.

Für die Detektion von Fragmentationen in der genannten Weise ergeben sich beim Sektorfeldgerät meßtechnische Probleme. Die Massenbereiche, die zur Messung aller Toxaphenkongenere mit einem Chlorierungsgrad von 6-10 registriert werden müssen, sind zu groß, um im Routinebetrieb gut reproduzierbare Resultate zu erhalten, da sie fast an die Grenzen messtechnisch realisierbarer Möglichkeiten eines Sektorfeld-MS heranreichen.

6.3.1.2 Messung weiterer Fragmente

Aufgrund der geschilderten Problematik bei der Messung des $[M-Cl]^+$ - Fragmentions soll nun ein Messverfahren mit verschiedenen Fragmentationen erläutert werden, mit dessen Hilfe man die Toxaphenkongenere nach ihrem Chlorierungsgrad unterscheiden kann und mit dem Toxaphenrückstände auch routinemäßig quantitativ bestimmt werden können.

Bei den Messungen ergab sich, dass die Auswahl der folgenden Fragmente die günstigste war (Dabei wurde darauf geachtet, dass die Massendifferenzen zwischen den einzelnen Fragmenten nicht allzu groß war, um ein starkes Absenken der Beschleunigungsspannung zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde auch darauf verzichtet, die Hexachlorbornanfragmentationen und Fragmentationen chlorierter Camphene zu registrieren):

Verbindung	Masse	Fragment
Heptachlorbornane	342,8963	[M-Cl] ⁺
	344,8934	
Octachlorbornane	340,8806	[M-Cl-HCl] ⁺
	338,8835	
Nonachlorbornane	374,8416	[M-Cl-HCl] ⁺
	376,8387	
Decachlorbornane	372,8260	[M-Cl-2HCl] ⁺
	374,8231	

Als interner Standard für die Quantifizierung wurde das M⁺-Ion des ¹³C₁₂-markierten PCB 169 mit den Massen 371,8817 und 373,8788 ausgewählt und die Toxaphengehalte über Responsefaktoren bestimmt.

Bei der Aufnahme des Ionenchromatogramms der Standardverbindungen bei einer Auflösung von 10.000 sind nur geringe Interferenzen mit den höher chlorierten Verbindungen auf den Fragmentionspuren der niederchlorierten Verbindungen zu erkennen (ca.10%). Eine Ausnahme bilden dabei nur die octachlorierten Verbindungen, welche deutliche Signale auf der Heptachlorbornanspur ergeben (siehe Abbildung 53). Bei Messung des Standards bei einer Auflösung von 15.000 waren diese Interferenzen deutlich geringer, bis gar nicht zu erkennen. Für die Bestimmung des Chlorierungsgrades kann auch mit einer Auflösung von 20.000 gearbeitet werden, im Routinebetrieb bereitet aber solch eine hohe Auflösung große Probleme (schlechtere Nachweisgrenzen, erhöhter Aufwand bei Einstellung der Auflösung und der Fokussierung des Ionenstrahls).

Mit Hilfe der diskutierten Ionenmassen bei einer Auflösung von 10.000 sollen nun die Toxaphenkonzentrationen einiger Proben aus dem Carry over Versuch bestimmt werden. Diese Ergebnisse sollen dann mit denen, die sich aus der Bestimmung über das Dichlortropylium-Fragment ergaben, verglichen werden.

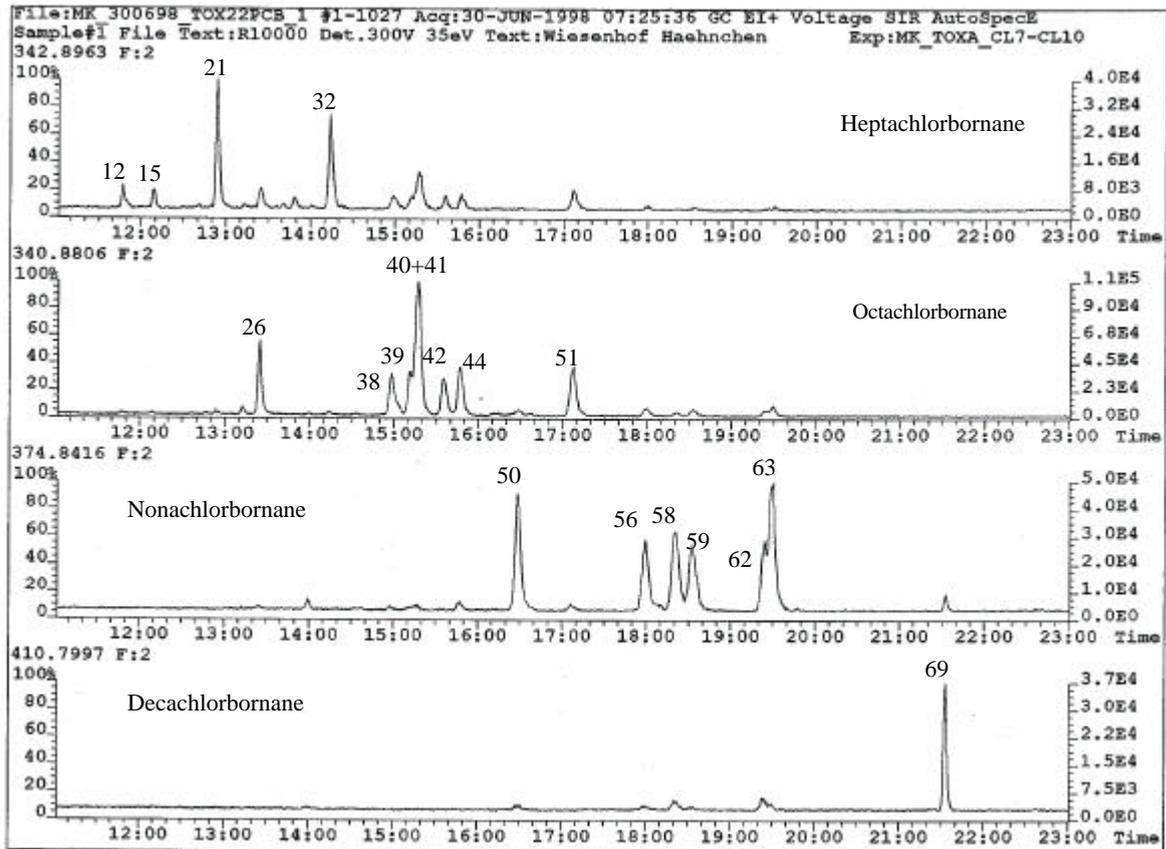


Abbildung 53: Messung des 22 Komponentenstandards auf ausgewählte Fragmentionen

Tabelle 42: Gegenüberstellung der Ergebnisse der Bestimmung von Toxaphenkongeneren in einer Hühnerfettprobe über das Dichlortropyliumfragmention und die weiteren Fragmentionen (Anzahl der Messungen n = 6)

Parlar Nr.	Quantifizierung auf der Dichlortropyliumionspur		Quantifizierung mit neuem Messprogramm	
	Gehalt in [µg / kg]	Standard-abweichung	Gehalt in [µg / kg]	Standard-abweichung
21	2,9	0,3	2,6	0,4
26	74,3	5,2	66,0	4,9
40+41	13,1	1,7	15,4	2,1
42	50,0	3,3	53,9	5,5
44	31,3	3,2	36,3	3,1
50	115,2	14,2	100,2	5,9
58	78,1	7,8	68,6	3,5
62	160,4	16,1	162,68	12,5
69	19,7	4,3	25,5	4,7

Die ermittelten Gehalte aus beiden Messungen stimmen für alle Kongenere gut überein. Anhand dieser Ergebnisse kann die Aussage getroffen werden, dass sich beide Verfahren für eine zuverlässige quantitative Toxaphenanalytik eignen. Mit diesem Messverfahren können Toxaphenverbindungen zusätzlich nach ihrem Chlorierungsgrad unterschieden werden. Zur Verdeutlichung dieser Tatsache ist das Chromatogramm einer Probe in der Abbildung 54 zu sehen.

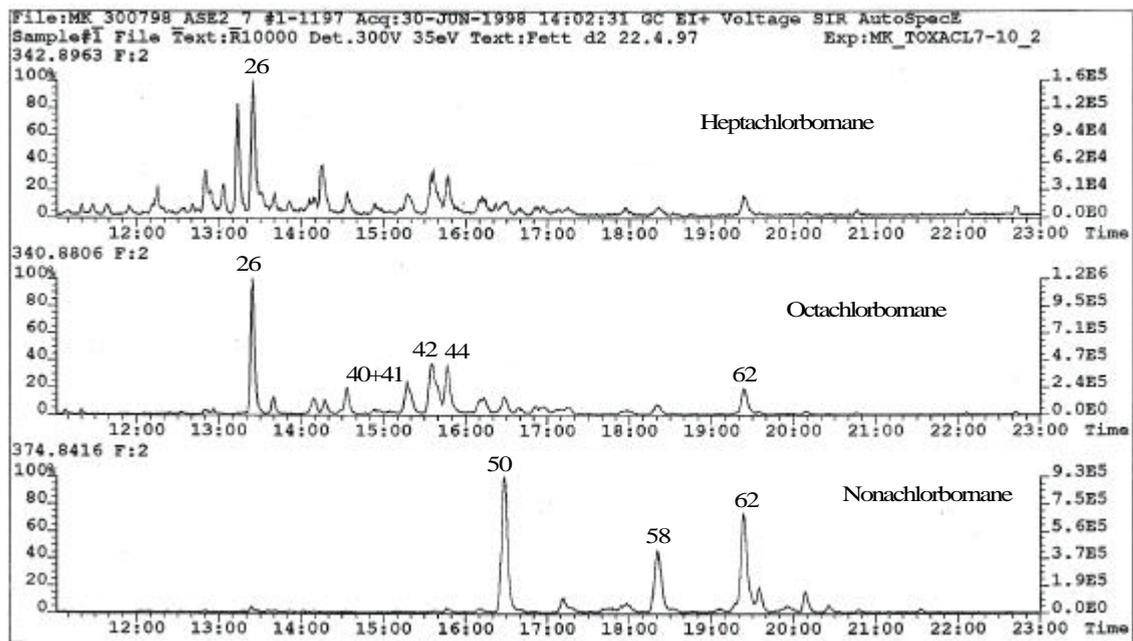


Abbildung 54: Messung einer Fettprobe aus dem Abklingversuch (22.4.1997) auf die ausgewählten Fragmentionen (R = 10.000)

6.3.2 Messung des Moleküliions der chlorierten Camphene

Toxaphene bilden bei der Elektronenionisation keine Moleküliionen. Diese Aussage bezog sich jedoch nur auf die Bornane. Im folgenden sollte nun überprüft werden, ob die Camphene ebenfalls kein Moleküliion bilden. Die Camphene besitzen folgende Summenformel: $C_{10}H_{16-n}Cl_n$

Tabelle 43: Molekülmassen für die Chlorcamphenverbindungen (in den eckigen Klammern ist das Isotopenverhältnis in % bezogen auf den Basispeak im Moleküliion aufgeführt).

Hexachlorcamphene	Heptachlorcamphene	Octachlorcamphene
339,8914 [52]	373,8524 [45]	407,8134 [35]
341,8884 [100]	375,8495 [100]	409,8105 [89]
343,8855 [80]	377,8466 [96]	411,8076 [100]
345,8826 [34]	379,8436 [52]	413,8047 [64]

Bei der Überprüfung auf ein detektiertes Molekülion bei Chlorcamphenen in dem vorliegenden Toxaphen-Mischstandard konnte für alle vorliegenden Camphen-Verbindungen (Parlar Nr. 11, 12, 15, 25 und 31) ein Signal detektiert werden.

Im folgenden sind die Peakflächen für diese Verbindungen dargestellt. Die Zahl in den eckigen Klammern gibt die gemessenen Isotopenverhältnisse in % an.

Tabelle 44: Gemessene Peakflächen der in Tabelle 43 aufgeführten Fragmentionen. In den eckigen Klammern ist die aus den Peakflächen berechnete Isotopenverteilung in % angegeben.

	Peakfläche Signal 1	Peakfläche Signal 2	Peakfläche Signal 3	Peakfläche Signal 4
Parlar 11 Hexachlorcamphen	297000 [55]	544000 [100]	476000 [88]	190000 [35]
Parlar 12 Hexachlorcamphen	75400 [50]	151000 [100]	105000 [70]	51000 [34]
Parlar 15 Hexachlorcamphen	354000 [52]	689000 [100]	543000 [79]	236000 [34]
Parlar 21 Heptachlorcamphen	24400 [41]	59900 [100]	58100 [97]	31000 [52]
Parlar 32 Octachlorcamphen	9890 [30]	24000 [73]	33000 [100]	20600 [63]

Beim Vergleich der gemessenen und der berechneten Isotopenverhältnisse wurde eine sehr gute Übereinstimmung gefunden. Damit kann belegt werden, dass alle Chlorcamphene in dem 22 Komponentenstandard ein Molekülion bilden. Jedoch ist an den Peakflächen zu erkennen, dass die Intensitäten, mit denen diese Ionen von den verschiedenen Camphenen gebildet werden, sehr unterschiedlich sind (alle Camphene hatten im Standardgemisch die gleiche Konzentration von 38,4 ppb).

6.3.3 Bestimmung von Toxaphenkongeneren über die Fragmentionen m/z 195 und m/z 231

In der Literatur sind weitere „typische“ Fragmentationen für Toxaphenkongeneren aufgeführt, wie die Massen m/z 195 für $C_7H_6Cl_3$ und m/z 231 für $C_7H_7Cl_4$ [77].

Bei der Registrierung der oben genannten Fragmente im 22-Komponentenstandard zeigten sich folgende Ergebnisse (siehe Abbildung 55). Bei der Aufnahme der Masse (m/z 195) wurden bis auf Parlar 69 alle Kongeneren aus dem Standard mit guter Empfindlichkeit detektiert. Jedoch variiert hier das Responseverhalten der Kongeneren im Vergleich zur Bestimmung über das Dichlortropyliumion sehr viel stärker. Besonders das Kongener Parlar 31 zeigt einen höheren Response.

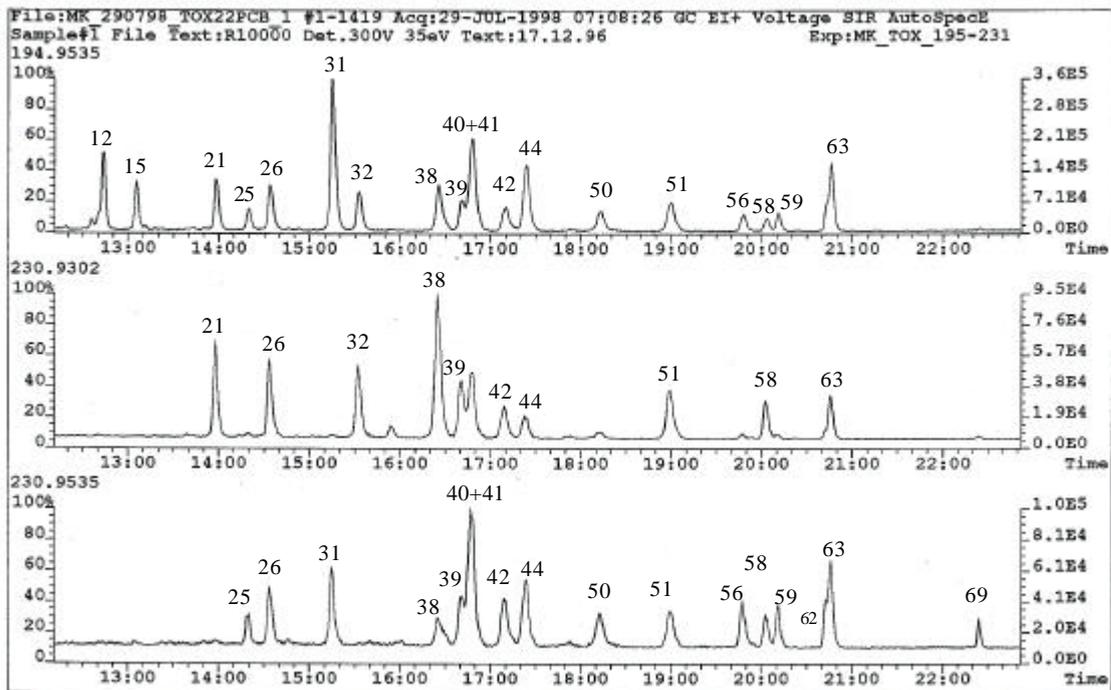


Abbildung 55: Bestimmung weiterer Fragmentionen im 22 Komponenten-Standard

oberes Chromatogramm: Registrierung des $[C_{10}H_6Cl_3]^+$ - Fragment [m/z 197,9535]

mittleres Chromatogramm: Registrierung des $[C_7H_7Cl_4]^+$ - Fragment [m/z 230,9302]

unteres Chromatogramm: Registrierung des $[C_{10}H_6Cl_3]^+$ - Fragment [m/z 230,9535]

Das Fragmention $C_7H_7Cl_4^+$ mit der Masse m/z 231 (bzw. für die hochauflösende Massenspektrometrie 230,9302) wird nicht von allen Kongeneren gebildet. Mit diesem

Fragmentation können die Kongenere Parlar 11, 12, 15 und 31 (alles Camphene) nicht detektiert werden.

Zudem zeigen viele Kongenere eine geringere Intensität als bei der Masse m/z 195, besonders die Nonachlorbornane sind mit dieser Ionenmasse schlecht detektierbar.

Bei Aufnahme eines anderen Fragmentions $C_{10}H_6Cl_3^+$ mit der Masse m/z 231 (für die hochauflösende Massenspektrometrie m/z 230,9535) ließen sich zwar ebenfalls nicht alle Kongenere detektieren, aber dennoch war das Responseverhalten für die meisten Kongenere besser als bei der Registrierung des $C_7H_7Cl_4$ - Fragmentions.

Nach Stern [114] wird das $C_7H_7Cl_4$ -Fragmentation nur von Octachlorbornanen gebildet, während das Fragmention $C_{10}H_6Cl_3$ sowohl von einem Octachlorbornan T2 (entspricht Parlar 26) als auch einem Nonachlorbornan T12 (entspricht Parlar 50) gebildet wird. Zur Detektion von ausgewählten Kongeneren (Bsp. Parlar 26) sind alle drei vorgestellten Fragmentionen einsetzbar. Für die Aufnahme von allen Toxaphenkongeneren eignet sich neben dem häufig verwendeten Dichlortropyliumion die vorgestellten Fragmentionen nur bedingt.

6.4 Untersuchungen von weiterem tierischen Probenmaterial

In diesem Versuchsteil sollte festgestellt werden, ob es Hinweise gibt, die eine Belastung von terrestrischen Nahrungsketten mit Toxaphen annehmen lassen. Hierzu wurden unterschiedliche Proben auf Toxaphenrückstände hin untersucht. Neben verschiedenen Tierarten wurden auch Fleischerzeugnisse auf Toxaphen untersucht. Im folgenden sollen die Ergebnisse vorgestellt werden. Da es sich hierbei allerdings um keine repräsentativen Untersuchungen handelt, können die hier dargestellten Ergebnisse auch nur eine lokale Momentaufnahme für die Verunreinigung von tierischen Lebensmitteln mit Toxaphen darstellen.

Im Rahmen einer Studie zu den Möglichkeiten der Provenienzfestlegung von Hühnerfleisch aufgrund des Pesitzidmusters wurden Proben aus folgenden Ländern untersucht:

Aus Thailand wurden 8 Proben, aus Brasilien 13 Proben, aus China 18 Proben und aus der Bundesrepublik Deutschland 37 Proben untersucht. Die Proben aus Deutschland stammten aus Mastbetrieben in den Bundesländern Sachsen-Anhalt, Bayern, Niedersachsen und Schleswig-Holstein.

In keiner der untersuchten Proben konnte Toxaphen nachgewiesen werden, wobei die Nachweisgrenze je Kongener ca. bei 0,5 µg / kg (ppb) Frischgewicht lag. Bei den Hähnchenproben aus Deutschland konnte neben dem Muskelfleisch auch Unterhautfett untersucht werden. Hier lag die Nachweisgrenze für jedes Kongener nochmals um den Faktor 10 niedriger. Aber auch hier konnte kein Toxaphen nachgewiesen werden.

Im Rahmen weiterer Untersuchungen wurden folgende ebenfalls nicht repräsentative Proben auf Toxaphen untersucht:

- 6 Proben Nierenzapfenfett von Mufflonschafen. Das Alter der Tiere variierte von einem bis zwölf Jahre. Die Tiere stammten aus Plauen.
- 30 Proben Nierenzapfenfett von Rindern. Das Alter und die Herkunft der Tiere war identisch mit dem der Schafe.
- 3 Proben Rehkeulen aus China, Deutschland und Ungarn.
- Mehrere Fettproben aus einer Tierkörperverwertungsanstalt in Oberfranken.
- Zehn Gewebeproben von Steinmardern, davon stammten drei aus Südbayern, zwei aus Chemnitz und fünf aus dem deutsch-tschechischen Grenzgebiet.

- Zusätzlich wurden 22 verschiedene Wurstsorten auf Toxaphen untersucht.

Bei allen untersuchten Proben konnte kein Toxaphen nachgewiesen werden, wobei die Methodennachweisgrenze je nach Einwaage zwischen 0,1 und 1,0 µg / kg pro Kongener bezogen auf Frischgewicht lag. Bei weiteren untersuchten Proben konnten geringe Toxaphenrückstände nachgewiesen werden.

- Von 16 Schwarzwildproben aus Tharandt (Erzgebirge) konnten in fünf Proben Rückstände von Toxaphen festgestellt werden. Ferner wurden Toxaphenkongenerere in 2 von 25 Wildschweinen aus Brandenburg nachgewiesen. Als Probenmaterial wurde von diesen Tieren Nierenzapfenfett verwendet. Dabei wurden die in Tabelle 45 angeführten Gehalte gefunden.

Tabelle 45: Gehalt an Toxaphen in wild lebenden Tieren. Gehalt in [µg/kg] Fett.

Kongener	Schwarz- wild 1	Schwarz- wild 2	Schwarz- wild 3	Schwarz- wild 4	Schwarz- wild 5	Wild- schwein 1	Wild- schwein 2
Parlar 26	0,12	0,13	0,09	0,19	0,06	0,03	0,25
Parlar40+41	0,49	0,46	0,05	0,23	0,06	0,09	0,28
Parlar 42	n.n	n.n	n.n	0,10	n.n	n.n	0,1
Parlar 44	n.n	0,06	0,04	0,09	n.n	n.n	n.n
Parlar 50	0,75	0,89	0,13	0,46	0,09	0,13	0,45
Parlar 58	0,14	0,21	n.n	0,08	n.n	n.n	n.n
Parlar 62	0,41	0,57	n.n	0,25	n.n	n.n	0,33

Die Nachweisgrenze pro Kongener lag bei dieser Messreihe deutlich unter 0,01 µg / kg.

- Desweiteren wurden einzelne Süßwasserfische untersucht, in denen überraschenderweise Toxaphen nachgewiesen werden konnte. Es handelte sich dabei um zwei Weißfische und zwei Forellen, die aus einem privat bewirtschafteten Teich in Oberfranken stammten; zusätzlich wurde auch das verwendete Forellenfutter untersucht.

In der Abbildung 56 sind die Ergebnisse der Untersuchung dargestellt.

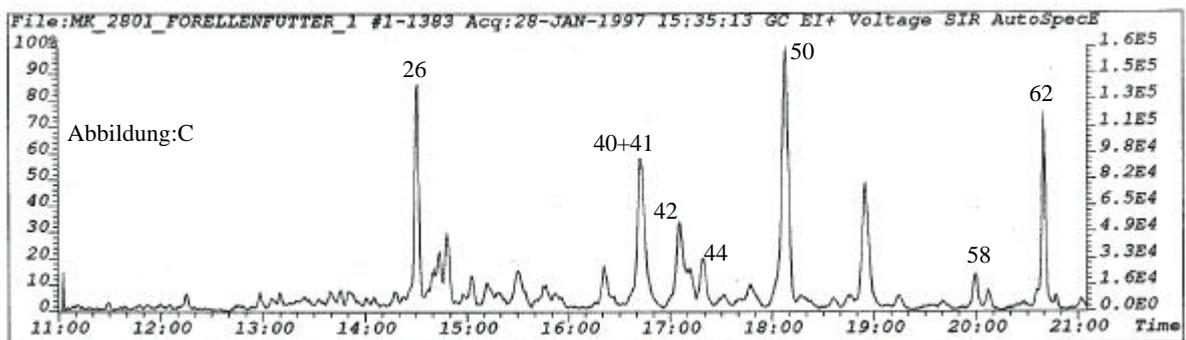
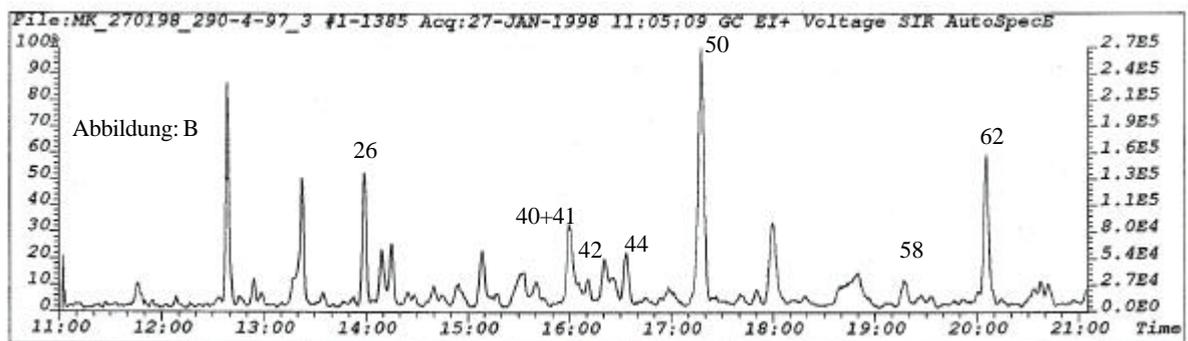
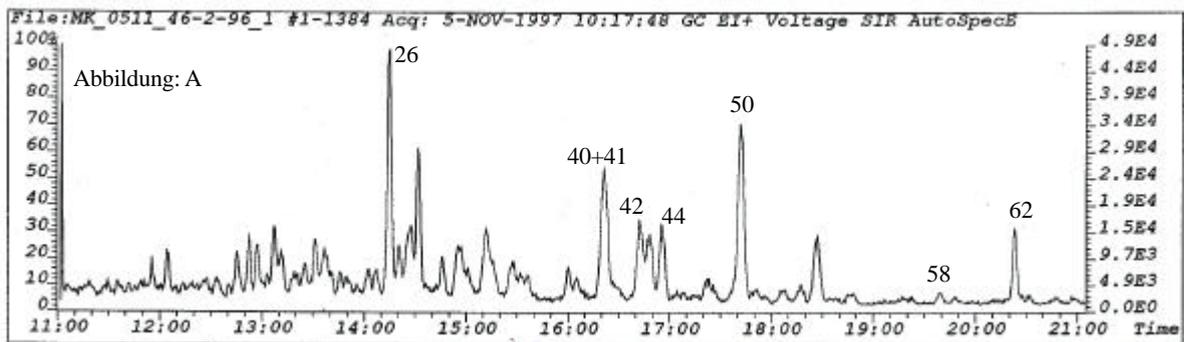


Abbildung 56: Chromatogramme von mit Toxaphen kontaminierten Fischen und deren Futter

Abbildung A: Toxaphenrückstände in einer Forelle

Abbildung B: Toxaphenrückstände in einem Weißfisch

Abbildung C: Toxaphenrückstände im untersuchten Forellenalleinfutter

Die festgestellten Toxaphenrückstände in den untersuchten Proben sind in der Tabelle 46 vorgestellt.

Tabelle 46: Rückstände an Toxaphen in Fischen (Filet) und Fischfuttermittel

Kongener	Forelle 1 [µg / kg] Fett	Forelle 2 [µg / kg] Fett	Weißfisch 1 [µg / kg] Fett	Weißfisch 2 [µg / kg] Fett	Forellenallein -futter [µg / kg] Fett
Parlar 26	4,7	3,8	6,9	1,3	17,9
Parlar 40+41	2,6	2,5	3,2	0,8	18,4
Parlar 42	3,0	2,2	2,8	n.n	16,4
Parlar 44	1,7	1,7	2,4	n.n	6,8
Parlar 50	7,8	5,2	11,8	2,3	58,6
Parlar 58	n.n	0,3	1,9	n.n	7,6
Parlar 62	3,8	2,1	6,8	1,2	36,2

7. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, einen kongenerenspezifischen Grenzwert für Toxaphen in tierischen Lebensmitteln vorzuschlagen. Nach Erarbeitung einer Analysenmethode, die es erlaubt, die einzelne Kongenere des Toxaphens zu erfassen, wurden Proben aus einem Fütterungsversuch mit Hühnern untersucht, die das Rückstandsverhalten von technischem Toxaphen präsentierten. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Datenmaterial zu schaffen, das es erlaubt tolerierbare Höchstgehalte von Toxaphen in Hühnerfutter vorzuschlagen zu können.

7.1 Extraktion von Toxaphenrückständen mittels ASE 200

Für den Vergleich wurden nur Toxaphenkongenere (Nummerierung nach Parlar) ausgewählt, die in allen Proben ohne Interferenzen zu detektieren waren. Beim Vergleich der Fettgewebeproben fällt auf, dass die Wiederfindung nach ASE nur wenig geringer war als bei derselben Probe ohne Extraktionsschritt. Die Vertrauensbereiche in beiden Meßreihen überschneiden sich deutlich (siehe Tab.37 und Abb.47). Da der eine Teil der Werte für die Fettproben ohne vorherigen Extraktionsschritt ermittelt wurde, handelt es sich somit quasi um einen Wiederfindungsversuch für die untersuchten Toxaphenkongenere nach ASE-Extraktion. Die Wiederfindung liegt für alle Kongenere oberhalb von 90 % und ist daher als gut bis sehr gut zu bezeichnen.

Bei den Dotterproben wurden nach der Extraktion mit der ASE-Technik zwar tendenziell etwas geringere Werte als bei der Extraktion nach Soxhlet gefunden, aber auch hier überschneiden sich die Vertrauensbereiche, so dass die Gehalte, die sich aus den verschiedenen Extraktionen ergeben, als sehr ähnlich zu bewerten sind. Bei den Muskelfleischproben zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Werte aus Soxhlet- und ASE-Extraktion. Hier konnten im Rahmen der methodenbedingten Fehlergrenzen keine Unterschiede in den ermittelten Gehalten festgestellt werden.

Dies traf auch weitgehend auf die Toxaphen-Extraktion aus Nieren- und Lebergeweben zu. Nur bei wenigen Proben wurden mit ASE-Extraktion für zwei Kongenere abweichende Werte zu der Soxhlet-Extraktion festgestellt.

Proben, die diese Auffälligkeiten zeigten, wiesen auch Veränderungen im Chromatographiemuster durch Lagerung auf, so dass diese Veränderungen noch weitergehend untersucht werden müssen.

Aus den vergleichbaren Toxaphenkongenergehalten in allen extrahierten Proben folgt, dass die ASE im Bereich der Extraktion von Toxaphen aus unterschiedlichen biologischen Geweben eine Soxhlet-Extraktion ersetzen kann.

Bei der Bestimmung des Fettanteiles in den Geweben durch ASE- und Soxhlet-Technik zeigen sich jedoch Unterschiede. Während der Lipidanteil in Fettgewebe- und Fleischproben mit ASE (unter den beschriebenen Bedingungen) sehr ähnlich zur Soxhlet-Extraktion extrahiert wurde, zeigten sich bei den Dotterproben Unterschiede bezogen auf den extrahierten lipophilen Anteil. Bei der Gegenüberstellung überschneiden sich die Vertrauensbereiche aus beiden Versuchsreihen zwar nicht (ASE: 32,3%-33,1% Fett; Soxhlet: 30,6%-31,1% Fett), die Abstände liegen jedoch in einer Größenordnung, dass auch die Dotterproben unter den beschriebenen Parametern mit noch tolerablen Abweichungen extrahiert werden können. Bei Nieren- und Leberproben ergaben sich jedoch zum Teil gravierende Abweichungen bezüglich des extrahierten Fettanteils. So wurden beispielsweise in einer Probe mit ASE $6,3 \pm 0,8$ % und mit Soxhlet Extraktion $10,5 \pm 1,2$ % Fett gefunden. Ob veränderte ASE-Parameter, vor allem eine gesteigerte Extraktionstemperatur, zu einer Angleichung der ASE-Werte mit der Soxhlet-Extraktion führt, muss weiteren Untersuchungen vorbehalten sein.

7.2 Analytik von Toxaphenrückständen

Anhand der ermittelten Daten konnte gezeigt werden, dass die Toxaphenrückstände in den Proben mit der vorgestellten Methode reproduzierbar erfasst wurden. Aufgrund der selektiven Erfassung der Toxaphene durch die hochauflösende Massenspektrometrie und der Messung von Kontrollproben des Fütterungsversuches konnten Coelutionen von Rückständen, die nicht von der Fütterung mit Toxaphen stammen, ausgeschlossen werden.

Differenzen bei der Quantifizierung der Ergebnisse auf unterschiedlichen Chromatographiesäulen können daher nur auf Coelutionen von verschiedenen Toxaphenkongeneren untereinander zurückgeführt werden. Um Unterschiede durch verschiedene Coelutionen zu minimieren oder zu vermeiden, ist die richtige Auswahl des zu messenden Fragmentions und die Auswahl der Chromatographiesäule von entscheidender Wichtigkeit.

Es konnte gezeigt werden, dass weitere Chromatographiesäulen neben der DB 5 den 22 Komponentenstandard ebenfalls gut trennen können. Die Chromatographiesäulen XLB und Optima 17 konnten die Coelutionen der Kongenere 40 von 41 sowie 42a von 42b, welche auf

der DB 5 auftreten, trennen. Die Kongenere 62 und 63 wurden mit diesen beiden Säulen sogar basislinien-getrennt. Die Kongenere 51 und 56 zeigten gegenüber der DB 5 auf der XLB und der Optima 17 jedoch eine Coelution.

Beim Vergleich einzelner Proben, deren Toxaphenrückstände auf allen drei Säulen ermittelt wurden, zeigte sich, dass mit der DB 5 gegenüber der XLB und der Optima 17 einige Kongenere überschätzt wurden. Hierzu zählten die Kongenere Parlar 21, 25, 26, 31, 32 und 38. Die aufgeführten Kongenere sind bis auf Parlar 26 alle Kongenere mit geringem Anreicherungsverhalten und kurzen Halbwertszeiten und sind somit für die Bestimmung von Toxaphenrückständen von geringerem Interesse.

Eine Überschätzung einzelner Kongenere tritt ebenfalls bei der Verwendung der XLB bzw. der Optima 17, verglichen zur DB 5, auf.

Eine geeignete Trennsäule für die Trennung aller Toxaphenkongenere zu finden ist äußerst schwer, um nicht zu sagen fast unmöglich. Die Problematik besteht darin, dass es in verschiedenen Proben unterschiedliche Muster in den Rückständen gibt, die somit auch unterschiedliche Coelutionen verschiedener Toxaphenkongenere untereinander aufweisen. Zudem weisen die Toxaphenkongenere unterschiedliche Halbwertszeiten auf, so dass je nach dem Zeitpunkt der Untersuchung vorliegende Coelutionen sich anteilmäßig ständig verändern.

Werden nur ausgewählte Verbindungen, wie die Indikatorverbindungen Parlar 26, 50 und 62, quantifiziert, so scheint es eher möglich, geeignete Phasen für die Trennung zu finden [116]. Jedoch zeigt die Analyse von Toxaphenrückständen mit der multidimensionalen Gaschromatographie, dass dies nicht so einfach ist. So zeigen gerade auch die ausgewählten Indikator-Verbindungen bei der Analyse mit verschiedenen Trennsäulen, dass unter diesen Verbindungen mehrere unbekannte Verbindungen liegen [89, 117]. In der Literatur wurde jedoch nicht festgehalten, ob es sich bei diesen Verbindungen um weitere Toxaphenkongenere oder um andere Organochlorverbindungen handelt.

Eine gut geeignete Methode, um Toxaphenrückstände genau durch Ausschluss von Coelutionen quantifizieren zu können, wäre die multidimensionale Gaschromatographie, gekoppelt mit einem selektiven Detektor. Hier können Interferenzen am besten ausgeschlossen werden. Diese Art der Analyse ist jedoch sehr aufwendig, so dass sie sich für den Routinebetrieb nicht durchgesetzt hat. Neben der multidimensionalen Gaschromatographie wurde desweiteren die Tandem-Säulenchromatographie erprobt [118]. Diese Analyse birgt jedoch die Schwierigkeit, dass die auf der ersten Säule getrennten

Verbindungen durch eine Umkehr der Retentionsreihenfolge wieder teilweise coeluiieren können. Diese ebenfalls sehr aufwendige Analysenmethode wird sich wohl kaum im Routinebetrieb durchsetzen.

Da in der vorliegenden Arbeit die Ermittlung eines Grenzwertvorschlages im Sinne einer worst-case Studie erfolgen soll, sind Coelutionen in diesem Fall akzeptabel.

7.3 Auswahl von geeigneten Fragmentionen zur Messung von Toxaphenrückständen

Es konnte gezeigt werden, dass neben dem Dichlortropyliumion auch andere Fragmentionen für eine quantitative Toxaphenanalytik geeignet sind. Jedoch besitzen einige Fragmentionen den Nachteil, dass sie nicht von allen Toxaphenkongeneren des 22 Komponentenstandards gebildet werden. Die unter Punkt 6.3.3 vorgestellten Fragmentionen können alternativ für die Toxaphenanalytik eingesetzt werden, jedoch weisen bestimmte Einzelkongenere aus dem Standard, verglichen mit einer Quantifizierung zum eingesetzten Dichlortropyliumion, recht unterschiedliche Responsefaktoren auf. Dies kann sich in einer schlechteren Reproduzierbarkeit äußern.

Der unternommene Versuch einer Quantifizierung über das $[M-Cl]^+$ -Fragmention bringt keine entscheidenden Vorteile, da hier die für eine Rückstandsanalytik wichtigen niedrigen Nachweisgrenzen für die Nonachlorbornane fehlen. Das $[M-Cl]^+$ -Fragmention wird bei der EI-Ionisation nicht mit ausreichender Intensität gebildet.

Mit der unter Punkt 6.3.1.2 vorgestellten Analytik (Messung im höheren Massenbereich) wurden gute Ergebnisse erzielt, jedoch müssen hier zusätzlich mehrere Massenspuren aufgenommen werden, denn es können nicht alle Kongenere über eine Massenspur erfasst werden. Vorteil dieser Detektion bei sehr hoher Auflösung (20000) ist eine mögliche Information über den Chlorierungsgrad der untersuchten Verbindungen. Jedoch sind die Nachweisgrenzen bei solch einer hohen Auflösung messtechnisch bedingt schlechter.

Die Analytik der Toxaphene auf der Basis des Dichlortropyliumions bietet bei der Verwendung eines hochauflösenden Massenspektrometers eindeutig die meisten Vorteile. Hier können alle wichtigen Toxaphenkongenere auf nur einer Massenspur mit relativ gleichmäßigem Responseverhalten detektiert werden. Eine Detektion von Analyten auf ein und derselben Massenspur bringt für das Absenkenverhalten der Beschleunigungsspannung bei Sektorfeldgeräten entscheidende Vorteile in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Ein Nachteil bei der Quantifizierung von Toxaphenrückständen mittels des Dichlortropyliumions

ist jedoch, dass einige Organochlorverbindungen (Bsp. Chlorfenac, Endosulfan 2- Brom-1,3 dichlorbenzen) bei der Fragmentierung ebenfalls dieses Ion bilden [77]. Durch die Messung der Kontrollproben aus dem Fütterungsversuch konnten diese Interferenzen jedoch ausgeschlossen werden. Im Bedarfsfall kann auf die unter Punkt 6.3.1.2 vorgestellte Methode zur Überprüfung und Erhöhung der Nachweissicherheit zurückgegriffen werden.

7.4 Diskussion der Ergebnisse aus der Fütterungsstudie

Über das Rückstandsverhalten von Toxaphen in Fischen, Schalen- und Krustentieren existiert umfangreiches Datenmaterial. Die Belastung von landwirtschaftlichen Nutztieren und deren Produkten mit Einzelverbindungen des Toxaphens wurde in der Vergangenheit weniger untersucht.

Fütterungsstudien mit technischem Toxaphen wurden bereits seit den fünfziger Jahren durchgeführt. Es wurde dabei festgestellt, dass sich das Kongenerengemisch im Fettgewebe von verschiedenen Tierarten anreichert [3, 25, 37, 69, 70, 119, 120, 123, 124, 125].

Eine kongenerenspezifische Untersuchung über mehrere Einzelverbindungen des technischen Toxaphens (22 Kongenere) in tierischen Lebensmitteln wurde vor dieser Arbeit noch nie durchgeführt. Durch die vorliegende Arbeit konnte bewiesen werden, dass sich die untersuchten Toxaphenkongenere ausschließlich im Fettanteil des tierischen Gewebes anreichern. Werden die unterschiedlichen Probenmatrizes nach ansteigendem Anreicherungsverhalten aufgelistet, so ergibt sich folgende Reihenfolge:

Fleisch < Niere, Leber < Dotter < Fettgewebe.

Vergleichende Fütterungsstudien von Toxaphen an Legehennen und Broilern wurden von Bush et. al. durchgeführt [119, 120]. In diesen Studien wurde für Toxaphen ein Carry over-Faktor von 3-4 (Legehennen) bzw. 4,9 (Broiler) im Fettgewebe ermittelt. Die ermittelten Carry over-Faktoren beziehen sich dabei jedoch auf das Gesamttoxaphen.

In dieser vorgelegten Arbeit wurden im Fettgewebe die Carry over-Faktoren der Einzelverbindungen mit einer starken Variationsbreite zwischen 1 und 14 ermittelt. Wird daraus ein theoretischer Mittelwert gebildet, so ergibt sich rein rechnerisch ein Carry over-Faktor von 6,3.

Es konnte durch die Ermittlung der Einzelwerte gezeigt werden, dass nicht alle Einzelverbindungen des Toxaphens gleichmäßig im Fettgewebe akkumuliert werden. Als Kongenere, die nur ein sehr geringes Akkumulierungspotential im Fett besitzen, konnten die Verbindungen Parlar 11, 31, 32, 38, 39 und 59 ermittelt werden. Bei einer Betrachtung des Gesamttoxaphens werden diese Kongenere daher deutlich überschätzt. Kongenere, bei denen ein sehr starkes Akkumulationspotential beobachtet wurde (Parlar 26, 42, 44, 50, 58, 62 und 63), werden hingegen unterbewertet.

Bei einem ökochemischen Vergleich von Toxaphen mit anderen Schadstoffen sollte daher immer eine kongenerenspezifische Betrachtung erfolgen. Der Vergleich des Carry over-Faktors von Gesamttoxaphen mit anderen Organochlorpestiziden ergibt für Toxaphen ein geringeres Anreicherungsverhalten. Betrachtet man die anreicherungsfähigsten Kongenere des Toxaphens einzeln (Bsp. Parlar 50, Carry over Faktor 14), so ergeben sich ähnliche Akkumulationsfaktoren und beim Vergleich mit Lindan sogar höhere Werte (Bsp. Hexachlorbenzol 12-30, Heptachlorepoxyd 17, Dieldrin 17 und Lindan 3) [120].

Der für die vorliegende Promotionsarbeit benötigte Fütterungsversuch wurde mit 87 Legehennen durchgeführt. Broiler wurden in diese Studie nicht mit einbezogen. Eine Fütterungsstudie mit PCB an Legehennen sowie an Broilern ergab signifikante Unterschiede im Anreicherungsverhalten bezogen auf das Geschlecht. Die Carry over-Faktoren (Fett) der Kongenere PCB 52, 138, 153 und 180 wurden in Legehennen um den Faktor 2 – 3 höher ermittelt als in Broilern. Einzige Ausnahme war PCB 101, welches in Broilern ein höheres Akkumulationspotential besitzt als in Legehennen [121].

Da Toxaphen ebenso wie PCB lipophile Eigenschaften hat, liegt die Vermutung nahe, daß sich Toxaphen ebenfalls in Legehennen stärker anreichert als in Broilern.

Bush et al. haben in ihren Untersuchungen mit Toxaphen ebenfalls unterschiedliche Akkumulationspotentiale zwischen Broilern und Legehennen festgestellt, wobei jedoch die Broiler ein etwas höheres Anreicherungspotential besitzen [119, 120]. Wie in der Bilanzierung (Kapitel 5.3.3) dargestellt, werden Toxapheneinzelverbindungen stark durch das Ei eliminiert. Da Broiler über dieses Ausscheidungsorgan nicht verfügen, wäre dies ein Hinweis auf die Richtigkeit der Untersuchungen von Bush et al.. Ob sich die Carry over-Faktoren von Einzelverbindungen des Toxaphens in Broilern und Legehennen jedoch wirklich unterscheiden, kann aber nur mit einer weiteren Fütterungsstudie belegt werden.

Durch die Ermittlung der Carry-over Raten (Kapitel 5.3.3) konnte festgestellt werden, dass nicht der Gesamtgehalt an aufgenommenem Toxaphen wiedergefunden werden konnte. Für die anreicherungsfähigsten Kongenere (Parlar 26, 42, 44, 50, 58, 62 und 69) wurden zwischen 22 und 37 % der aufgenommenen Menge über das Ei, respektive den Dotter, ausgeschieden. Bei der Eliminierung von Toxaphen über den Kot konnten nur geringe Mengen an unmetabolisierten Kongeneren nachgewiesen werden (2 bis 6 %). Auch ein größerer Verbleib von Toxaphen im Tierkörper der Legehennen konnte nicht festgestellt werden (3 bis 10 %). Eine ähnliche Verteilung der Eliminierung bzw. Speicherung wurde bei einem Fütterungsversuch mit PCB beobachtet [121], jedoch ergaben sich bei diesem Versuch Wiederfindungsraten der aufgenommenen Menge je Kongener von 75 bis 130 % (Ausnahme PCB 52 und 101, Wiederfindungsrate ca. 10 %). Für die anreicherungsfähigsten Toxaphenkongenere konnten in der vorliegenden Arbeit lediglich Anteile von 27 bis 49 % der aufgenommenen Toxaphenmenge wiedergefunden werden. Mögliche Gründe hierfür sind nicht erfasste Ausscheidungswege von unmetabolisiertem Toxaphen, z.B. Fettabscheidungen an das Gefieder, sowie die Metabolisierung zu Verbindungen, welche mit der beschriebenen Analytik nicht erfasst werden konnten. Da die Proben dunkel gelagert wurden, können abiotische Prozesse für eine Metabolisierung ausgeschlossen werden.

Eine komplette Ausscheidung der relativ hohen restlichen Toxaphenmenge (51 bis 73 %) in unmetabolisiertem Zustand über das Gefiederfett erscheint unwahrscheinlich. Es liegt die Vermutung nahe, dass der Großteil der aufgenommenen Toxaphenmenge über Metaboliten eliminiert oder gespeichert wird.

Die Metabolisierung von Toxaphen wurde u.a. von Ohsawa et. al. [122] untersucht. Die Untersuchung einer oralen Gabe von Toxaphen an Ratten hat gezeigt, dass nur etwa 3 % des aufgenommenen Toxaphens unverändert mit dem Kot ausgeschieden wurden. Als mengenmäßig größter Metabolit wurde das Chlorid mit etwa 50% festgestellt. Neben dem Chlorid wurden ca. 27 % der Aktivität in teilweise dechlorierten Metaboliten festgestellt [122].

Analog zu dieser Studie konnte in der vorliegenden Promotionsarbeit ebenfalls nur eine geringe Ausscheidung an unmetabolisierten Toxaphenkongeneren direkt über den Kot nachgewiesen werden.

Zur Untersuchungen der Metabolisierung von Toxaphen durch Hühner, Mäuse, Ratten, Hamster, Meerschweinchen, Kaninchen und Affen wurde deren Fett und Kot nach einer Toxaphengabe untersucht [123]. Dabei wurde Toxaphen vom Huhn im Vergleich zur Ratte und zum Affen deutlich weniger metabolisiert. In der vorliegenden Arbeit konnten in den

Toxaphenmustern der Gewebe im Vergleich zu dem Toxaphenmuster im technischen Toxaphen Übereinstimmungen gefunden werden, was auf den ersten Blick auf eine geringe Metabolisierung schließen lässt. Die durch die Bilanzierung festgestellte Differenz der aufgenommenen zur anschließend nachgewiesenen Menge an Toxaphenkongeneren deutet jedoch auf einen relativ hohen Anteil an Metaboliten hin, der mit der verwendeten Analytik nicht erfasst wurde.

Bei Metabolisierungsuntersuchungen wurde festgestellt, dass das Chloridion nicht der einzige Metabolit des Toxaphens ist. Ohsawa et al. konnten im Rattenurin Sulfat- und Glucuronid-Konjugate nachweisen, was auf eine Detoxifizierung in der Leber schließen lässt [122]. Dass ein rascher Abbau in der Leber stattfindet, konnte durch die Studie von Maiorino et al. belegt werden [126]. Toxaphen wurde in dieser Untersuchung relativ schnell zu dechlorierten, dehydrochlorierten und oxidierten Produkten abgebaut. Verbindungen, die weniger schnell dechloriert wurden, wurden in der Leber gespeichert und konnten als Peaks mit kürzeren Retentionszeiten festgestellt werden.

Ein schnellerer Abbau von Toxaphen in den Lebern gegenüber anderen Geweben konnte nur teilweise beobachtet werden. So zeigten einige Leberproben zu Beginn der Studie im Vergleich zu den Fettproben im Peakmuster ein geringeres Anreicherungsverhalten der Verbindungen der Kongenere ab Parlar 42 (Elutionsreihenfolge betrachtet). Gegen Ende des Versuches glich das Peakmuster der Leberproben denen der Fett-, Dotter- und Fleischproben. Bei geringen Toxaphenkonzentrationen (wie zu Beginn des Fütterungsversuches) sind die Metabolisierungseffekte deutlich zu erkennen, während gegen Ende des Versuches die hohe vorherrschende Toxaphenkonzentration ablaufende Metabolisierungen überlagert.

Nach halbjähriger Lagerung konnte bei einigen Proben eine Veränderung im Toxaphenmuster festgestellt werden. Die Proben die eine Veränderung durch die Lagerung aufzeigten, wiesen nun wieder ein ähnliches Toxaphenmuster wie zu Beginn des Versuches auf. In Übereinstimmung mit [126] waren auch hier Peaks zu erkennen, die nun kürzere Retentionszeiten aufwiesen. Durch den Zeitfaktor konnten Metabolisierungseffekte wieder hervortreten. Besonders deutlich wird dies, wenn die Gehalte vor und nach der Lagerung verglichen werden. Die Gehalte der Kongenere Parlar 42, 58, 62 und 69 (Tabelle 37) nehmen deutlich während der Lagerung ab, eine Ausnahme bildet Parlar 44, hier ist eine Zunahme des Gehaltes zu verzeichnen. Dies könnte durch eine Chloreliminierung von Parlar 62 erklärt werden. Bei den Kongeneren Parlar 44 und 62 handelt es sich um nahezu identische Moleküle, der einzige Unterschied besteht im Chlorierungsgrad. Parlar 62 ist neunfach

chloriert, während Parlar 44 achtfach chloriert ist. Ein Beweis für diese Hypothese könnte jedoch nur durch den Einsatz markierter Verbindungen geführt werden.

Die unter Punkt 5 berechneten Halbwertszeiten für Toxaphenkongenerere wiesen in den fettreicheren Geweben (Depotfett, Dotter und Niere) untereinander ähnliche Werte auf. Die Eliminierung aus dem Muskelgewebe verläuft fast doppelt so schnell. Zwischen den Geweben Depotfett, Dotter und Niere ist eine Abstufung schwierig vorzunehmen, da die Werte sich nur geringfügig unterscheiden. Auffallend ist aber die hohe Halbwertszeit von 51 Tagen für das Kongener Parlar 58 in der Niere.

Bei der Betrachtung von ausgewählten (den anreicherungsfähigsten) Kongeneren zeigt sich, dass die Kongenerere Parlar 26 und 62 in Fett und Proben mit hohem Fettanteil (Eidotter 30 %; Niere 10 %) die längsten Halbwertszeiten haben, danach folgen die Kongenerere Parlar 44, 50 und 58 mit sehr ähnlichen Halbwertszeiten von 35 bis 36 Tagen. Die kürzesten Halbwertszeiten der betrachteten Kongenerere besitzen die Kongenerere Parlar 40 + 41 und 42a+42b. Im Zusammenhang mit den Kongeneren 40 + 41 ist zu erwähnen, dass diese beiden Verbindungen aufgrund einer Coelution nur in den Fettproben sauber getrennt erfasst werden konnten. Aus den Ergebnissen der Fettproben war klar zu erkennen, dass das Kongener Parlar 40 mehr als doppelt so schnell abgebaut wird wie das Kongener Parlar 41. Bei Berücksichtigung dieses Sachverhaltes ergibt sich für das Kongener Parlar 41 somit eine Halbwertszeit, die nur geringfügig unter denen der Kongenerere Parlar 44, 50 und 58 liegt.

Eine Reihenfolge der Kongenerere nach Halbwertszeiten im fettarmen Gewebe (Muskelfleisch) ist aufgrund der geringen Differenzen der Halbwertszeiten nicht sinnvoll. Die verschiedenen Kongenerere wurden fast gleich schnell abgebaut.

Aufgrund der mit dieser Arbeit erzielten Ergebnisse kann die Aussage getroffen werden, dass Toxaphen am schnellsten aus Gewebe mit geringem Fettgehalt eliminiert wird.

Während der Abklingphase im Carry over Versuch konnte beobachtet werden, dass der tatsächliche Abbau der Toxaphenkongenerere keinem exakt exponentiellen Verlauf folgt. Die Eliminierung von Toxaphen konnte in einigen Probenmatrizes in eine erste schnelle und eine zweite langsamere Abbauphase unterteilt werden. Für die Leberproben konnten aufgrund von Schwankungen keine Halbwertszeiten bestimmt werden. Die Schwankungen bei den Leberproben ergaben, sich wie bereits erläutert, wahrscheinlich aus weitergehenden Metabolisierungsreaktionen in den Proben, die auch bei einer Lagerung der Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ stattfinden können.

Die beschriebene Teilung der Abklingphase in zwei unterschiedliche Phasen war vor allem bei den Proben aus dem Depotfett und dem Eidotter zu beobachten. Die Nierenproben zeigten einen nahe zu exponentiellen Kurvenverlauf.

Für dieses Verhalten, vor allem im fettreichen Gewebe, sind zwei sich gegenseitig beeinflussende Vorgänge verantwortlich. Im ersten Teil der Abklingphase (bis 40 Tage) ergab sich eine steil verlaufende Kurve, die eine Toxaphenabnahme im Gewebe darstellt, während im zweiten Teil der Abklingphase eine flach verlaufende Abklingkurve auf eine Reverteilung von Toxaphen hinweist.

Für die Resorption und Verteilung bei der Aufnahme von Xenobiotika gehören die Leber, wegen ihrer hohen Perfusionsrate, und das Muskelgewebe, aufgrund seines Volumens, zu den ersten Depots [102]. Da Muskelfleisch und die Leber von Hühnern nur einen geringen Fettanteil besitzen, erfolgt nach einer gewissen Zeit, aufgrund der Lipophilie von Xenobiotika, eine Reverteilung der Kontamination ins Fettgewebe.

Diese Reverteilung fand wie beobachtet vor allem ins Depotfett und in den Eidotter statt. Nach der Eliminierung aus dem Fettgewebe erfolgte die Neueinlagerung von Toxaphen aus dem fettärmeren in das fettreichere Gewebe. Dieser Rückeinbau wird vor allem gegen Ende des Versuches sichtbar, da durch die Konzentrationsabnahme in den Geweben geringe Veränderungen in den vorliegenden Gewebekonzentrationen nun deutlicher sichtbar werden. Aufgrund des geringeren Lipidanteils in den Nieren gehört dieser Gewebetyp nicht zu den bevorzugten sekundären Depots der Reverteilung.

Zu den größeren Schwankungen in den Dotterproben ist anzumerken, dass neben der Reverteilung, die Eier der Hühner, ebenso wie der Kot, eine Möglichkeit zur Eliminierung von Schadstoffen aus dem Körper der Tiere darstellen. Da die Eier einem nicht immer konstant ablaufenden Aufbauprozess im Tierkörper unterliegen, ergeben sich hieraus Schwankungen, die neben den messtechnischen Bedingungen die Schwankungsbreite der Toxaphenkonzentrationen im Ei erklären können.

Nach den Untersuchungen von Busch et al. [119] wurden Halbwertszeiten von Toxaphen im Fettgewebe von 20 bis 41,5 Tagen ermittelt. Die unterschiedlichen Daten resultieren aus verschiedenen Gruppen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Toxaphen im Futter. Für die Eier wurden Halbwertszeiten von 15,7 bis 20 Tagen gefunden. Bei den Halbwertszeitwerten von 20 Tagen zeigte sich im Vergleich zur kongenerenspezifischen Analytik wieder die deutliche Unter- bzw. Überschätzung bestimmter Einzelverbindungen. Die im Vergleich dazu relativ hohen Halbwertszeiten von 41 Tagen für eine Toxaphengruppe mit 5 ppm kann an dieser Stelle nicht erklärt werden. Verglichen mit den Halbwertszeiten von

Dieldrin (247 Tage), Heptachlor (71 Tage) und DDT (55 Tage) in Fettgewebe, zeigte sich, dass einige Toxaphenkongeneren ähnlichen persistenten Charakter besitzen wie DDT.

Durch die ausgeführten Experimente konnten somit Ergebnisse über die Aufnahme, Verteilung, Exkretion und Einlagerung von Toxaphen aus dem Futter in das Gewebe von Legehennen und ihre Eier erhalten werden. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auf diesen Ergebnissen eine Basis zu schaffen, die es erlaubt, Vorschläge zu Höchstwerten von Einzelkongeneren in Futtermitteln und in Lebensmitteln tierischer Herkunft (am Beispiel des Gewebes von Legehennen) machen zu können.

Für Lebensmittel tierischer Herkunft außer Fisch gilt ein Grenzwert von 0,1 mg Gesamttoxaphen/kg bezogen auf das Fettgewicht [21]. Die quantitative Bestimmung des Gesamttoxaphengehaltes erweist sich aufgrund der bekannten analytischen Probleme jedoch als sehr schwierig und stark fehlerbehaftet. Aus diesem Grund ist es in der Vergangenheit auch nie zu Beanstandungen von mit Toxaphen kontaminierten Proben gekommen [94].

Wie in der vorliegenden Arbeit belegt wurde, können auch bei Lebensmitteln von warmblütigen Tieren Toxaphenrückstände anhand von Indikatorverbindungen bestimmt werden. Mit dieser Methode könnte nun eine rechtlich einwandfreie Beurteilung des Rückstandsgehaltes vorgenommen werden. Entsprechende Vorschläge zur Festlegung von Rückstands-Höchstmengen wurden von der Bundesanstalt für Fleischforschung den entsprechenden Behörden in einem Bericht vorgelegt [100]. Im folgenden sollen diese Vorschläge erläutert werden.

Für die Ermittlung des Gehaltes an Toxaphenrückständen in Hühnern wurde vorgeschlagen, die folgenden Indikatorverbindungen Parlar 26, 44, 50, 58 und 62 heranzuziehen. Diese Verbindungen besitzen das höchste Akkumulationspotential. Die Kongeneren Parlar 41 und 42 weisen ebenfalls ein hohes Akkumulationspotential auf, jedoch können bei der analytischen Bestimmung dieser Kongeneren Probleme in Form von Coelutionen auftreten, die beim Einsatz von GC/ECD-Messsystemen vermehrt zu Fehlern führen können.

Für eine Beurteilung der Höchstmengen in Fisch werden Gehalte an den Indikatorverbindungen Parlar 26, 50 und 62 bestimmt und aufsummiert.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass mit der Bestimmung dieser drei Indikatorverbindungen nur etwa 30 bis 40 % (bezogen auf den 22 Komponentenstandard) des Gesamttoxaphens erfasst werden. Ermittelt man zusätzlich noch die Gehalte der Kongeneren Parlar 42, 44 und 58, so erhöht man den erfassten Anteil an Gesamttoxaphen auf

60 bis 70 % (bezogen auf den mit dem 22 Komponentenstandard quantifizierten Anteil). Aufgrund der genannten analytischen Schwierigkeiten in Verbindung mit dem Kongener Parlar 42 sollten also für die Beurteilung von Rückständen die Kongenere Parlar 44 und 58 mit herangezogen werden.

Zur Ableitung von Grenzwertvorschlägen für Lebensmittel von Warmblütern ist die Kenntnis über den entsprechenden ADI-Wert von ausschlaggebender Bedeutung. Bis dato existieren jedoch noch keine wissenschaftlich abgeleiteten ADI-Werte für Toxaphenkongener. Um einen Grenzwert vorschlagen zu können, wurde von einer tolerablen Gewebekonzentration von 100 µg Toxaphenkongener / kg Frischgewicht ausgegangen. Dieser Wert ist nicht toxikologisch begründet sondern nur empirisch festgesetzt und ist im Sinne einer „worst case“ Betrachtung, mit Blick auf chemisch verwandte Problemstoffe, wie beta- HCH, gewählt worden.

Unter der Annahme, dass in erster Näherung pro Toxaphen-Kongener eine Gewebekonzentration von 100 µg/kg in Legehennen (bezogen auf die Gewebe-Frischmasse) toleriert wird, dürfen die in der Tabelle 49 aufgenommen Rückstandskonzentrationen im Alleinfutter von Legehennen nicht überschritten werden.

Die als tolerabel angenommene Gewebekonzentration von 100 µg / kg Frischmasse wird zuerst im Fettgewebe erreicht. Aus den ermittelten Dosisgewebekonzentrationskurven ergibt sich, dass sie für die Kongenere Parlar 26, 44, 50, 58 und 62 bereits bei einer Futterkonzentration von 10 µg / kg lufttrockenem Futter erreicht wird.

Aufgrund der physiologischen Streubreite der Gewebekonzentrationen in den Tieren, die durch die Gewebepoolung teilweise unterdrückt wird, kann es dennoch auch bei Einhaltung der Grenzwerte aus der Tabelle zu Überschreitungen der Höchstwerte in Gewebe und in den Eiern kommen. Deshalb wurden die Werte dem Bundes Ministerium für Landwirtschaft mit einem Sicherheitsfaktor von 10 vorgeschlagen. Dies ist ebenfalls aus der Tabelle 49 ersichtlich. Durch Einberechnung des Sicherheitsfaktors kann so sichergestellt werden, dass bei kontaminiertem, lufttrockenem Alleinfuttermittel, bei Einhaltung der maximalen Konzentration von je 1 µg / kg für die Kongenere Parlar 26, 44, 50, 58 und 62, die tolerable Gewebekonzentration von 100 µg / kg nicht überschritten wird.

Tabelle 49: Futtermittelhöchstwerte für eine tolerierbare Gewebekonzentration in Legehennen und Eiern von 100 ppb

Gewebe	Kongener (Parlar Nr.)	Zulässiger Futtermittelhöchstwert für eine Gewebekonzentration von 100 ppb Frischmasse [µg/kg lufttrockenem Futter]	Zulässiger Futtermittelhöchstwert mit einem Sicherheitsfaktor von 10 für eine Gewebekonzentration von 100 ppb Frischmasse [µg/kg lufttrockenem Futter]
Fett	26	10	1
	42	20	2
	44	10	1
	50	10	1
	58	10	1
	62	10	1
Fleisch	26	190	19
	42	340	34
	44	260	26
	50	210	21
	58	230	23
	62	250	25
Eidotter	26	40	4
	42	60	6
	44	40	4
	50	40	4
	58	40	4
	62	40	4

Die in der Tabelle angeführten Werte sind rechnerisch ermittelte Werte. Für eine weitergehende Bewertung ist eine Aufrundung nach internationalen Gepflogenheiten noch vorzunehmen

Nach heutigem Kenntnisstand kann davon ausgegangen werden, dass eine Kontaminierung von Hühnern mit Toxaphen vor allem über das Futtermittel erfolgt. Beinhalten diese Futtermittel Fischöl oder Fischmehl, kann eine Kontaminierung der gefütterten Hühner mit Toxaphen stattfinden. Untersuchungen haben ergeben, dass Fischmehl und Fischöl je nach Produktherkunft mehr oder weniger stark mit Toxaphen verunreinigt sind. Fischöle aus Nordeuropa sind stärker belastet als solche aus Südamerika. Die untersuchten Gehalte der Fischöle ergab für die Kongenere Parlar 26, 50 und 62 einen Summenwert von 20 bis 170 µg / kg Fett [127]. Nach heutiger Fütterungspraxis kann alleinige Geflügelfütterung mit Fischprodukten nahezu ausgeschlossen werden. Neben Fischprodukten können im Futtermittel verwendete verunreinigte Ölsaaten aus osteuropäischen Ländern, in denen Toxaphen noch immer eingesetzt wird, zu einer Toxaphenkontamination beitragen. Aus

diesem Grunde ist neben der Toxaphenuntersuchung von Lebensmitteln von warmblütigen Tieren die Kontrolle der Futtermittel von ausschlaggebender Bedeutung.

Mit dem Carry over Versuch wurde grundlegendes Datenmaterial zum Verhalten von Toxaphen in Legehennen erarbeitet. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse können jedoch nicht auf weitere tierische Lebensmittel übertragen werden. Vor allem bei höher entwickelten Tieren, wie Schweinen, Schafen oder Rindern, können sich andere Metaboliten und Anreicherungsfaktoren ergeben. So zeigten Fütterungsversuche, dass Toxaphen im Affenorganismus stärker metabolisiert als im Hühnerorganismus [123] und dass die Komponente Parlar 44 in Affen ein höheres Anreicherungspotential besitzt als in Hühnern und Fischen [125]. Aus diesem Grunde ist es zwingend notwendig, auch für andere Tierarten Carry over Versuche durchzuführen, um entsprechend sicheres Datenmaterial zu erhalten. Aus diesem Datenmaterial können dann Höchstwerte für die entsprechenden Tierarten und deren Futtermittel ermittelt werden.

8 Literatur

- [1] Parlar H, Michna A (1983) Chemosphere 12: 913-926
- [2] Parlar H, Kotzias D, Korte F (1983) Chemosphere 12: 1453-1458
- [3] Camphechlor (1984) WHO Environmental Health Criteria 45: 8-51
- [4] Saleh MA (1983) J Agric Food Chem 31:748-751
- [5] Parlar H (1991) Nachr. Chem. Tech. Lab. 39 Nr.1: 27-37
- [6] Casida JE, Holmstead RL, Khalifa S, Knox JR, Ohsawa T, Palmer KJ, Wong RY (1974) Science 183: 520-521
- [7] Holmstead RL, Khalifa S, Casida JE (1974) J Agric Food Chemistry 22: 939-944
- [8] Zhu J, Mulvihill M, Norstrom RJ (1994) J of Chromatography A 669: 103-117
- [9] Jansson B, Widequist U (1983) Intern J Environ Anal Chem 13: 309-321
- [10] Fürst P, Fürst C, Groebel W (1989) Dtsch Lebensmittel Rundschau 9:273-279
- [11] Parlar H, Müller R, Lach G (1989) Chemiker Zeitung 12: 357-370
- [12] Parlar H, Gäb S, Nitz S, Korte F (1976) Chemosphere 5: 333-338
- [13] Müller R (1988) Dissertation Technische Universität München
- [14] Lach G, Ständecke U, Pletsch B, Xu L, Parlar H (1991) Z Lebensm Unters Forsch 192: 440-44
- [15] Lach G, Parlar H (1990) Chemosphere 21: 29-34
- [16] Parlar H, Angerhöfer D, Coelhan M, Kimmel L (1995) Organohalogen Compounds 26: 357-362
- [17] Nikiforov VA, Tribulovich VG, Karavan VS (1995) Organohalogen Compounds 26: 379-382
- [18] Alder L, Beck H, Khandker S, Karl H, Lehman I (1995) Organohalogen Compounds 26: 323-328
- [19] Alder L, Bache H, Beck H, Parlar H (1995) Organohalogen Compounds 26: 369-374
- [20] Bundesgesetzblatt I (1997) 66:2370
- [21] Verordnung über Höchstmengen an Rückständen von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln, Düngemitteln und sonstigen Mitteln in oder auf Lebensmitteln und Tabakerzeugnissen vom 1.September 1994 (BGBl. I S.2299)
- [22] Mitteilung aus der BML-AG „Carry over“ vom 21/22. 01.1998
- [23] Hecht H, Schwind KH, Kaltenecker M, Ueberschär KH (1998) Bericht ans BML

- [24] Hecht H (1995) *Fleisch Gesundheit – Tierschutz – Umwelt*, Herausgeber: Bundesanstalt für Fleischforschung Kulmbach: 88-116
- [25] Saleh MA (1991) *Rev Env Cont Tox* 118:1-85
- [26] Heinisch E, Kettrup A, Jumar A, Wenzel-Klein S, Stechert J, Hartmann P, Schaffer P, (1994) *Schadstoffatlas Osteuropa*, Ecomed Verlag Landsberg
- [27] Korte F, Scheunert I, Parlar H (1979) *Prue & Appl Chem* 51: 1583-1601
- [28] Andrienas PA (1974) *Economic Resarch Service form the U.S. Department of Agriculture, Agriculture Economic Preport No. 252*
- [29] Parlar H, Kotzias D, Korte F (1983) *Chemosphere* 12: 1453-1458
- [30] Voldner EC, Li YF (1993) *Chemosphere* 27:2073-2078
- [31] Voldner EC, Li YF (1995) *Sci Total Environ* 160/161: 201-210
- [32] Lee G, Hughes R, Vieth G (1977) *Water Air Soil Pollut* 8: 479-484
- [33] Coelhan M, Fingerling G, Angerhöfer D, Parlar H (1998) *UWSF- Z Umweltchem Ökotox* 10: 37-59
- [34] *Toxaphene (1995) Drinking Water Health Advisory, Office of Water U.S. Environmental Protection Agency*
- [35] *Toxaphene Working Group (1977) Environmental Protection Agency 1. Report No. EPA-SPRD Arlington, VA Special Pesticide Review Div.*
- [36] *Römpp Chemielexikon (1999) 10. Auflage, Georg Thieme Verlag*
- [37] Eisler R, Jacknow J, (1985) *Biological report* 1.4
- [38] Saleh MA (1977) *J Agric Food Chem* 25:63-68
- [39] Murphy TJ, Mullin MD, Meyer JA (1987) *Environ Sci Technol* 21:155-162
- [40] Isnard P, Lambert S (1989) *Chemosphere* 17: 1837-1853
- [41] Burhenne J (1993) *Dissertation Gesamthochschule Universität Kassel*
- [42] Hainzel D, Burhenne, Parlar H (1993) *Chemosphere* 27: 1857-1863
- [43] Burhenne J, Hainzel D, Xu L, Vieth B, Alder L, Parlar H (1993) *Fresenius J Anal Chem* 346: 779-785
- [44] Hainzel D, Burhenne J, Barlas H, Parlar H (1995) *Fresenius J Anal Chem* 351: 271-285
- [45] Hainzel D, Burhenne J, Parlar H (1994) *GIT Fachz Lab* 4: 285-294
- [46] Nikiforov VA, Tribulovich VG, Karavan VS (1995) *Organohalogen Compounds* 26: 393-396
- [47] Stern G.A, Muir D.C.G, Ford C.A, Grift N.P, Dewailly E, Bidleman T.F, Walla M.D

- (1992) *Environ Sci Technol* 26:1838-1840
- [48] Vetter W, Luckas B, Oehme (1992) *Chemosphere* 25: 1643-1652
- [49] Vetter W, Scherer G, Schlabach M, Lukas B, Oehme M (1994) *Fresenius J Anal Chem* 349:552-558
- [50] Vetter W, Klobes U, Krock B, Luckas B, Glotz D, Scherer G (1997) *Environ Sci Technol* 31: 3023-3028
- [51] Krock B, Vetter W, Luckas B (1996) *Chemosphere* 33: 1005-1019
- [52] Landrum P.F, Pollock G.A, Seiber S.W, Hope H, Swanson K.L (1976) *Chemosphere* 5:63-69
- [53] Saleh M.A, Turner W.V, Casida J.E (1977) *Science* 198: 1256-1258
- [54] Turner W.V, Khalifa S, Casida J.E (1975) *J Agric Food Chem* 23: 991-994
- [55] Parlar H (1988) *Chemosphere* 17: 2141-2150
- [56] Chandurbar PS, Matsumura F (1979) *Bull Environm Contam Toxicol* 21: 539-547
- [57] Chandurbar PS, Matsumura F (1978) *Chemosphere* 7:123-130
- [58] Stern GA, Loewen MD, Miskimmin BM, Muir DCG, Westmore B (1996) *Environ Sci Technol* 30:2251-2258
- [59] Anagnostoupolos M.L, Parlar H, Korte F (1974) *Chemosphere* 2: 65-70
- [60] Parlar H, Korte F (1983) *Chemosphere* 12: 927-934
- [61] Matsumura F, Howard R.W, Nelson J.O (1975) *Chemosphere* 4:271-276
- [62] Palmer K, Wong RY, Lundin RE, Khalifa S, Casida JE (1974) *J American Chemical Society* 97:408-413
- [63] Wester PG, Geus HJ, Boer J, Brinkmann UATH [1997] *Chemosphere* 35:1187-1194
- [64] Coelhan M, Parlar H (1996) *Chemosphere* 32: 217-228
- [65] Coelhan M, Fingerling G, Christ G, Parlar H (1998) *UWSF – Z Umweltchem Ökotox* 10: 109-122
- [66] Andrews P, Vetter W (1995) *Chemosphere* 31: 3879-3886
- [67] Wester PG, Geus HJ, Boer J, Brinkmann UATH [1997] *Organohalogen Compounds* 33: 47-52
- [68] Boer J, Geus HJ (1997) *Environ Sci Technol* 31: 873-879
- [69] Bateman GQ, Biddulph C, Harris JR, Greenwood DA, Harris LE (1953) *J Agric Food Chem* 1: 322-324
- [70] Zweig G, Pye EL, Sitlani R, Peoples SA (1963) *J Agric Food Chem* 11: 70-72
- [71] Graupner AJ, Dunn CL (1960) *J Agric Food Chem* 8: 286-292

- [72] Beck H, Mathar W (1985) Bundesgesundheitsblatt 28: 1-11
- [73] Alder L, Vieth B (1996) Fresenius J Anal Chem 354:81-92
- [74] Specht W, Tilkes M (1980) Fresenius J Anal Chem 301: 300-307
- [75] Amtliche Sammlung von Untersuchungen nach § 35 LMBG L00.00.12
- [76] Krock B, Vetter W, Luckas B (1997) Chemosphere 35: 1519-1530
- [77] Lau B, Weber D, Andrews P (1996) Chemosphere 32: 1021-1041
- [78] Xu L, Hainzel D, Burhenne J, Parlar H (1994) Chemosphere 28: 237-243
- [79] Onuska FI, Terry KA, Seech A, Antonic M (1994) J of Chromatography A 665: 125-132
- [80] Muir DCG (1993) Chemosphere 27: 1827-1834
- [81] Lau B, Weber D, Andrews P (1994) Rapid Communications in Mass Spectrometry 8: 849-853
- [82] Bartha R, Vetter W, Luckas B (1997) Fresenius J Anal Chem 358: 812-817
- [83] Vetter W, Bartha R, Luckas B (1997) Organohalogen Compounds 33: 13-16
- [84] Hübschmann HJ (1995) GIT Fachz Lab 5: 434-438
- [85] Kaltenecker M, Schwind K-H, Ueberschär K-H, Hecht H, Petz M (1998) Organohalogen Compounds 35: 281-286
- [86] Santos FJ, Galceran MT, Caixach J, Rivera J, Huguet X (1997) Rapid Communications in Mass Spectrometry 11: 341-348
- [87] Chan HM, Zhu J, Yeboah F (1998) Chemosphere 36:2135-2148
- [88] De Boer J, De Geus HJ (1995) Organohalogen Compounds 26: 345-350
- [89] De Boer J, De Geus HJ (1996) Organohalogen Compounds 28: 363-368
- [90] De Geus HJ, Baycan-Keller R, Oehme M, De Boer J, Brinkmann U (1998) J High Resol Chromatogr 21: 39-46
- [91] Vetter W, Schuring V (1997) Journal of Chromatogr A 774: 143-175
- [92] Kaltenecker M, Schwind K-H, Hecht H, Petz M (1999) GIT Fachz Lab
- [93] Bundesgesetzblatt I (1994) 60: 2299
- [94] Persönliche Mitteilung von Herrn Alder 11.12.1998
- [95] Hecht H (1995) Fleisch Gesundheit – Tierschutz – Umwelt, Herausgeber: Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach: 88-116
- [96] Gill U.S, Schwartz H, Wheatley B, Parlar H (1995) Organohalogen Compounds 26: 383-388
- [97] Andrews P, Newsome, Boyle, Collins (1993) Chemosphere 27: 1865-1872

- [98] Oehme M (1996) Praktische Einführung in die GC/MS-Analytik mit Quadrupolen
Hüthig Verlag, Heidelberg
- [99] DFG-Senatskommission für Pflanzenschutz-, Pflanzenbehandlungs- und Vorratsschutzmittel:
Methodensammlung zur Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln XI ff. (1991)
- [100] K.-H. Schwind, M. Kaltenecker, K.-H. Ueberschär (1998) Bericht ans BML
- [101] K.-H. Schwind, M. Kaltenecker (1996) Jahresbericht der Bundesanstalt für
Fleischforschung 1995: 95
- [102] Heeschen W, Blüthgen A, Steiner J (1993) Zum Carry over von Polychlorierten Biphenylen
(PCB); Schriftenreihe des Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten
Heft 418: 33-43, Landwirtschaftsverlag Münster
- [103] Heeschen W, Ewers C, Blüthgen A (1993) Zum Carry over von Polychlorierten Biphenylen
(PCB); Schriftenreihe des Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten
Heft 418: 123-132, Landwirtschaftsverlag Münster
- [104] Hein H, Kunze W (1994) Umweltanalytik mit Spektrometrie und Chromatographie VCH
Verlag Weinheim 102-103
- [105] Höfler F, Ezzell J, Richter B (1995) Sonderdruck aus Laborpraxis Nr. 3/1995 und 4/1995
- [106] Höfler F (1996) Labor Praxis 12: 44-56
- [107] Richter B.E, Jones B.A, Ezzell J.L, Porter N.L, Avdalovic N, Pohl C (1995) Anal Chem 68:
1033
- [108] Kaltenecker M, Schwind K-H, Hecht H, Petz M (1999) GIT Laborfachzeitschrift 43: 742-
745
- [109] Baycan-Keller R, Oehme M (1997) Organohalogen compounds 33: 1-6
- [110] De Boer J, De Geus H-J, Besselink H, Brouwer A, Klungsoyr J, Mac Govern E,
Mac Hugh B, Nixon E, Rimkus G, Wester P (1998) Organohalogen Compounds 35: 217-
220
- [111] Alder L, Beck H, Khandker S, Karl H, Lehmann I (1997) Chemosphere 34: 1389-1400
- [112] Vetter W, Krock B, Luckas B (1997) Chromatographia 44: 65-73
- [113] Kaltenecker M, Schwind K-H, Ueberschär K, Hecht H, Petz M (1998) Organohalogen
compounds 35: 281-286
- [114] Stern G.A, Muir D.C.G, Westmore J.B, Buchannon W.D (1993) Biological Mass
Spectrometry 22: 19-30

- [115] Buser H-R, Oehme M, Vetter W, Luckas B (1993) *Fresenius J Anal Chem* 347: 502-512
- [116] Karlsson H, Oehme M (1996) *Organhalogen compounds* 28: 369-374
- [117] De Boer j, De Geus H-J (1997) *Environ Sci Technol* 31: 873-879
- [118] Baycan-Keller R, Oehme M, Galliker B (1998) *Organohalogen Compounds* 33: 229-23
- [119] Bush P, Kiker JT, Page RK, Booth NH, Flechter OJ (1977) *J Agric Food Chem* 25: 928-932
- [120] Bush P, Tanner M, Kiker JT, Page RK, Booth NH, Flechter OJ (1978) *J Agric Food Chem* 26: 126-130
- [121] K.-H. Ueberschär (1993) *Zum Carry over von Polychlorierten Biphenylen (PCB); Schriftenreihe des Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten Heft 418: 81-94, Landwirtschaftsverlag, Münster*
- [122] Ohsawa T, Knox JR, Khalifa S, Casida JE (1975) *J Agric Food Chem* 23: 98-106
- [123] Saleh MA, Skinner RF, Casida JE (1979) *J Agric Food Chem* 27: 731-737
- [124] Mohammed A, Eklund A, Östlund-Lindqvist A-M, Slanina P, (1990) *Arch Toxicol* 64: 38-42
- [125] Andrews P, Headrick K, Pilon J-C, Bryce F, Iverson F (1996) *Chemosphere* 32: 1043-1053
- [126] Maiorino RM, Whiting FM, Brown WH, Reid BL, Stull JW (1984) *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 13: 565-571
- [127] Oetjen K, Karl H (1998) *Chemosphere* 37: 1-11

9. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Fütterungsversuch mit 87 Legehennen in 5 Versuchsgruppen durchgeführt. Die Zugaben an technischem Toxaphen betragen 0, 0.1, 0.5, 1 und 5 mg/kg lufttrockenem Futter. Die Fütterung erfolgte über einen Zeitraum von 38 Wochen. Das Anreicherungs- und Abklingverhalten von Toxaphen wurde in Kot, Eiern, Leber, Niere, Fleisch und Blut untersucht.

Ebenso wie in Fischen gibt es bei Legehennen typische Kongenere, die bei einer Toxaphenkontamination verstärkt nachgewiesen werden können. Aufgrund dieser Tatsache können Toxaphenrückstände mit Hilfe von Indikatorverbindungen eindeutig quantifiziert werden.

Bei diesen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Anreicherung von Toxaphenkongeneren in Geweben ausschließlich im Fett erfolgt. Die Kongenere Parlar 26, 41, 42, 44, 50, 62 und 63 besitzen von allen 22 untersuchten Kongeneren das größte Anreicherungspotential.

Im Fettgewebe wurden von diesen Kongeneren Carry over-Faktoren zwischen 8 und 14 ermittelt. Im Eidotter bewegten sich die Carry over-Faktoren zwischen 1,4 und 2,6. Im Fleisch der Tiere konnte keine Anreicherung festgestellt werden, die ermittelten Carry over-Faktoren waren alle kleiner 1. Wie im Fleisch konnte auch im Kot, im Blut und in der Niere keine Anreicherung festgestellt werden. In der Leber lagen die Carry over-Faktoren der genannten Kongenere zwischen 0,9 und 2.

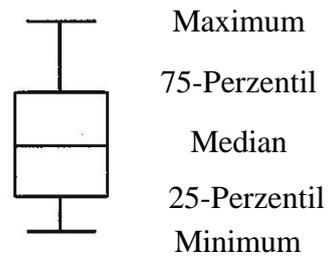
Mit den erstellten Dosisgewebekonzentrationskurven kann bei Fütterung eines toxaphenkontaminierten Futtermittels auf die Konzentration an Toxaphen im Gewebe geschlossen werden, wenn die Höhe der Futterkontamination bekannt ist.

Für die oben genannten Kongenere wurden die biologischen Halbwertszeiten ermittelt. Diese lagen im Fettgewebe zwischen 25 und 49 Tagen (Depotfett, Eidotter, Niere). In Geweben mit geringem Fettanteil (Kot, Blut und Fleisch) wurde Toxaphen deutlich schneller abgebaut. Die Halbwertszeiten in Fleisch wurden mit 15 bis 22 Tagen für die anreicherungsfähigsten Kongenere ermittelt.

Bei der Bilanzierung der aufgenommenen Toxaphenmenge konnte festgestellt werden, dass nur etwa 5 bis 10 % im Tierkörper gespeichert wurden. Nur 2 bis 4 % der aufgenommenen Menge wurden im Kot unmetabolisiert nachgewiesen. Die größte Toxaphenmenge konnte im Ei bzw. im Dotter nachgewiesen werden. Die Legehennen konnten auf diesem Weg 22 bis 37 % der aufgenommenen Toxaphenmenge unmetabolisiert ausscheiden.

Anhang

I Zeichenerklärung für die Darstellung der Werte in Box-Whiskers-Plots:



II Bestimmung der Nachweisgrenze und des Vertrauensbereich

Die Berechnung der angeführten Formeln erfolgt nach [99]:

$$\text{Vertrauensbereich} = t_{f95} \cdot \delta \cdot 1 / \sqrt{z}$$

Wobei:

δ die Schätzung der (Wiederhol)-Standardabweichung

t_{f95} in Abhängigkeit von der Anzahl der Messungen

z Anzahl der Parallelbestimmungen

Tabelle: Schwellenwerte der t-Verteilung zur statistischen Sicherheit aus [99] (auszugsweise)

f	t	
	Zweiseitig	Einseitig
3	3,182	2,353
4	2,776	2,132
5	2,571	2,015
6	2,447	1,943
10	2,228	1,812

Die Berechnung der Nachweisgrenzen beruht auf die Ermittlung der Gehalte von Blindwerten (siehe Punkt 4.5)

Die Nachweisgrenzen berechnen sich nach folgender Formel:

$$\text{NWG} = 2 \cdot t_{f95} \cdot \delta / S$$

Wobei

S die Empfindlichkeit des Verfahrens ist. Wenn S nicht bekannt ist kann als untere Abschätzung der Zahlenwert 0,7 eingesetzt werden

δ die Schätzung der (Wiederhol)-Standardabweichung der Blindwerte

t_{f95} in Abhängigkeit von der Anzahl der Messungen