

## 5.3 Material

### 5.3.1 Geräte

Für die Methodenvergleiche und die sich anschließende Probenaufarbeitung fanden folgende Gerätschaften Verwendung:

- Labormixer „Waring Blendor Comercial“, 750 Watt mit 2 Liter Edelstahlbecheraufsatz, Fa. Waring Products Division, New Hartford, Conn. U.S.A.
- Gefriertrocknungsanlage BETA 2/16 LMC1, Fa. Christ
- Gefrierschrank, Fa. Liebherr (Probenlagerung), Temp.: -27 °C
- Soxhlet-Apparatur mit Glasfaserhülsen (30 x 100 mm, 603 g , Fa. Schleicher & Schuell, Dassel), die bei 500°C für 24 Stunden in einem Muffelofen gegläht wurden
- Mini-Säulen, Glas, Höhe gesamt: 28,5 cm, Breite in der Öffnung (7,5 cm) : 1,5 cm,  
Breite in der Mitte (15 cm) : 1 cm  
Breite in der Verjüngung (15 cm): 0,5 cm
- Mikrowelle, MSP 1000 SP-19, Fa. CEM Corporation, 3100 Smith Farm Road, Matthews, NC 28 105, U.S.A.
- Rotationsverdampfer, Büchi 461 Rotavapor RE 111, Fa. Büchi Laboratoriums-Technik AG, 9230 Flawil, Schweiz
- Stickstoffabdampfvorrichtung mit Kupferrohr
- Gelchromatograph, Autoprep 1002A mit Pumpmodul und Glassäule, Fa. abc analytical biochemistry laboratories Inc., P.O. Box 1097, Columbia M.O. 65 205, U.S.A.
- GC Varian 3500 mit Autosampler 8035, Säule: 60 m GC-MS, 0,25 mm Innendurchmesser , DB 5, Fa. Varian

- GC Varian 3500 mit Autosampler 8035, Säule: 30 m
- MS von Finnigan MAT, SSQ 7000

Die benutzten Glasgeräte entsprachen der normalen Laborausstattung und wurden nach jeder Benutzung vorgereinigt, in einer Laborspülmaschine mit „Neodisher-Reiniger“ gespült, mit Klarwasser und destilliertem Wasser nachgereinigt, im Trockenschrank bei 50°C getrocknet und mit Aceton gespült.

### 5.3.2 Lösungsmittel und Reagenzien

Als Lösungsmittel fanden Verwendung:

- Aceton und n-Hexan aus der Selbstdestillation
- Isooctan, Cyclohexan und Chloroform der Fa. Merck
- Dichlormethan, Methanol, Essigsäure-ethylester und Toluol der Fa. Fluka

Benutzte Reagenzien:

- Biobeads SC3 (Gelchromatographie), 200-400 mesh, konditioniert mit einem Essigsäure-ethylester-Cyclohexan Lösungsmittelgemisch, Fa. Bio-Rad Laboratories, Richmond, U.S.A.
- Natriumsulfat pro analysi, wasserfrei, gegläht bei 650°C für 5 Stunden im Muffelofen, Fa. Merck
- Kieselgel 60, Korngröße 0,2 – 0,5 mm (35 – 70 mesh ASTM), gegläht bei 550°C für 5 Stunden im Muffelofen, Fa. Merck
- Florisil PR, 60 – 100 mesh ASTM, 0150 – 0,250 mm Fa. Merck, gegläht bei 600°C für 7 Stunden
- Glaswatte für 24 Stunden mit n-Hexan gewaschen
- Faltenfilter, 595 ½, Durchmesser 125 mm, mit n-Hexan gewaschen, Fa. Schleicher & Schuell
- Glasfaserhülsen, 30 x 100 mm (603 g), Fa. Schleicher & Schuell, gegläht bei 500 °C für 24 Stunden.

## REFERENZLÖSUNGEN

### Nitromoschusduftstoffe:

Die Standardlösungen für Moschus-Ambrette, Moschus-Xylol, Moschus-Mosken, Moschus-Tibeten und Moschus-Keton wurden aus kristalliner Substanz hergestellt; geliefert von der Fa. Promochem, Wesel.

### Chlorierte Kohlenwasserstoffe:

$\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, HCB, DDT, DDE und DDD wurden als in Cyclohexan gelöste Stammlösungen von der Fa. Riedel de HAEN AG, Seelze Hannover für die Herstellung von Standardlösungen benutzt.

### Polychlorierte Biphenyle:

Eine in Isooktan gelöste Stammlösung folgender Biphenyle wurde zur Identifizierung der PCB in Proben benutzt: PCB Nr.: 28, 52, 101, 118, 128, 138, 149, 151, 153, 170, 177, 180, 183, 187 und 194.

### Interner Standard:

Nach Überprüfung von Nativproben konnte festgestellt werden, daß es keine Belastung mit dem PCB Nr.: 84 in den zu untersuchenden Proben gibt und keinerlei Überlagerungen der Retentionszeit mit anderen Substanzen, so daß das PCB Nr.: 84 als interner Standard verwendet werden konnte. Die in den Methodenvergleichen verwendeten Standardsubstanzen Aldrin und Mirex wiesen nach Programmkorrektur am GC/ECD sehr ähnliche Retentionszeiten zu isolierenden Schadstoffen auf und wurden aus diesem Grund nicht mehr verwandt.

## **5.3.3 Probenmaterial**

### **5.3.3.1 Untersuchungsgebiet**

Das Untersuchungsgebiet Hohner See (NSG Hohner See und Umgebung) hat eine Größe von 360 ha, wovon etwa 70 ha auf offene Wasserflächen entfallen. Der Hohner See liegt im Zentrum von Schleswig-Holstein zwischen Rendsburg und Erfde.

Dieser See stellt mit seiner ausgedehnten Wasserfläche und einer durchschnittlichen Tiefe von nur 1 m einen der letzten noch erhaltenen Flachwasserseen am Rande der ehemals weitläufigen Überschwemmungslandschaft der Eider-Treene-Sorge-Niederung dar (STRUWE-JUHL, 1995).

Die chemischen Güteindizes, die die Belastungssituation des Hohner Seengebietes mit organischen Stoffen wiedergeben, sind letztmalig im "Seenbericht Hohner See" des Landesamtes für Wasserhaushalt und Küsten Schleswig-Holstein beschrieben worden. Demzufolge waren die 5 Zuflüsse außerordentlich stark (1), sehr stark (1), stark (2) und deutlich (1) belastet. Die hohen Belastungen (vorwiegend Stickstoff und Phosphor) gehen auf die ungeklärte Einleitung von Abwässern und auf die Bedüngung der angrenzenden Felder und Grünflächen zurück, die bis vor wenigen Jahren erfolgte (SEENBERICHT HOHNER SEE, 1985).

Am 11. Januar 1995 wurde das "Hohner Seengebiet und Umgebung" (Landesverordnung über das Naturschutzgebiet "Hohner See" GS Schl.-H. II, Gl.Nr. 791-4-159) zum Naturschutzgebiet erklärt. (BLEW, 1996).

### 5.3.3.2 Sediment

Als Sediment wurde eine etwa 10 bis 20 cm starke Schicht von Ablagerungen bezeichnet, die sich auf dem Boden des Hohner Sees abgesetzt hatte.

Dieses Sediment wurde mit Hilfe eines 2 m langen PVC-Rohres aus etwa 60 bis 100 cm Wassertiefe an den in Tabelle 5.12 beschriebenen Orten entnommen.

**Tabelle 5.12: Entnahmorte von Sedimentproben im Hohner See 1998**

Lfd. Nr.	Entnahmeort
1.	Schlutengraben
2.	Meiereigraben am Seeinfluß
3.	Meiereigraben etwa 10 m vom Mündungsdelta landeinwärts
4.	Seemitte (Westen)
5.	Solterbeksgraben (vom Königsmoor)
6.	Nordufer-Bootsanleger Uferbereich

Eine Karte von den Probeentnahmeorten am Hohner See findet sich in der Abbildung 5.8.

### 5.3.3.3 Fische

Als Probenmaterial wurden Brassen, Barsche, Kaulbarsche, Güstern, Rotfeder und Hecht verwandt.

**Tabelle 5.13: Art, Anzahl und Geschlecht der untersuchten Fische**

Fischart	Gesamtzahl	männliche Individuen	weibliche Individuen	nicht bestimmbar
Brassen	33	10	23	kein
Barsche	6	keine	6	kein
Güstern	6	1	3	2
Kaulbarsche	2	keine	keine	2
Rotfeder	1	keine	1	keine
Hecht	1	1	kein	kein

### HERKUNFT

Die Fische, die der Analyse dienten, wurden von Herrn Gosch, der als Seebesitzer und Fischer am Hohner See tätig ist, aus diesem See gefangen und zur Verfügung gestellt.

#### **5.3.3.4 Fischotter**

Als Probenmaterial wurden einzelne Organe von europäischen Fischottern (*Lutra lutra*) benutzt.

### HERKUNFT

Die Fischotter wurden als Unfallopfer durch Verkehrstod (4) im Land Schleswig-Holstein und aus dem Tierpark Neumünster (2) durch das Fischotterzentrum Hankensbüttel/Niedersachsen und von Herrn Borkenhagen als Probenmaterial geliefert. Eine Zusammenstellung von Werten befindet sich in Tabelle 5.14.

**Tabelle 5.14: Datentabelle von Fischottern aus dem Raum Schleswig-Holstein zwischen 1996 und 1998**

Lfd. Nr.	Art/Geschlecht w = weiblich m = männlich	Gewicht g	Länge mm	Fundort/Herkunft	Funddatum Mo/Jahr	Alter Jahre
1	Lutra lutra – w	12.000	1.280	Prasdorf	8/96	?
2	Lutra lutra - m	9.100	1.135	Müssen	8/98	?
3	Lutra lutra - m	10.000	1.020	Schmalfeld	6/98	?
4	Lutra lutra - m	9.900	1.120	Preetz	2/97	?
5	Lutra lutra - m	> 5.000	1.005	Tierpark-Neumünster	10/96	10
6	Lutra lutra - w	3.200	970	Tierpark-Neumünster	10/97	14

Eine Karte mit den Fundstellen der Fischotter findet sich in der Abbildung 5.9.

## 5.4 Ausgewählte Methoden

### 5.4.1 Homogenisierung

**Fische** - Die Fische wurden tiefgefroren angeliefert und bis zur Verarbeitung bei  $-27\text{ °C}$  aufbewahrt. Zur Aufbereitung wurden sie aufgetaut und mit einer vorher gesäuberten und mit Aceton gespülten Geflügelschere in etwa  $3\text{ cm}^3$  große Stücke zerschnitten. Diese wurden dann mit dem Waring Blendor Labormixer unter Hinzufügen einer gewichtsäquivalenten Menge bidestillierten Wassers so lange zerkleinert, bis die Fischmasse homogen und zähflüssig war. Das Homogenat wurde in Petrischalen abgefüllt, gewogen, zum Teil zur Lagerung bei  $-27\text{ °C}$  tiefgefroren oder sofort zum Wasserentzug der Gefriertrocknung übergeben.

**Fischotter** - Die benötigten Organe der Otter wurden in brauchbarer Quantität entnommen, mit einer Laborschere in kleinstmögliche Stücke geschnitten und in Petrischalen zur Gewichtsermittlung überführt.

### 5.4.2 Gefriertrocknung

Die Trocknungszeit wurde ermittelt, indem Beispielproben mit gleichem Gewicht und Wassergehalt wiederholt für mehrere Stunden in die Trocknungsanlage gestellt wurden, bis durch eingetretene Gewichtskonstanz der Wasserentzug beendet war.

**Sediment – Fische – Fischotter** Das in Petrischalen abgefüllte Probenmaterial wurde zum Wasserentzug in die Gefriertrocknungsanlage gestellt und zunächst für 2 Stunden bei  $-27\text{ °C}$  tiefgefroren, um dann unter einem Vakuum von  $0,52\text{ mbar}$  für weitere 36 Stunden gefriertrocknet zu werden. Die Nachtrocknungszeit betrug 90 Minuten.

Vor und nach der Trocknung wurde das Gewicht der Probeneinwaage ermittelt und so der entzogene Wasseranteil bestimmt.

Das wasserfreie **Sediment** wurde im Anschluß auf eine Korngröße von  $< 5\text{ mm}$  abgesiebt und bis zur weiteren Verarbeitung in Teflongefäßen bei Raumtemperatur gelagert.

**Fische – Fischotter** - Im Anschluß an die Trocknung und die wiederholte Gewichtsüberprüfung wurde das Homogenat im Porzellanmörser fein zerrieben und in wasserdichten Glasbehältern bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

### 5.4.3 Mikrowellenextraktion

**Sediment** - Nachdem eine Einwaage jeder Sedimentprobe von 3 g in Teflongefäße überführt und mit 50 ml eines n-Hexan-Aceton Lösungsmittelgemisches im Verhältnis 3:1 aufgefüllt wurde, erfolgte die Extraktion mit Hilfe der Mikrowellen-Technik. Die Bedingungen für die Mikrowellenextraktion finden sich in der Tabelle 5.15.

Nach der Extraktion und anschließender Abkühlung wurden die Proben aus dem Mikrowellengerät entnommen und über einen Faltenfilter dekantiert, die im Glaskolben aufgefangene Extraktionsflüssigkeit auf etwa 2 ml am Rotationsverdampfer eingengt, mit 10 ml Isooctan aufgefüllt und erneut auf etwa 2 ml eingengt.

Um leichtflüchtige Schadstoffe besser binden zu können, wurde jeder Probe vor dem Einengen jeweils 1 ml Dodecan zugegeben.

#### Bedingungen während der Einengung mit Hilfe des Rotationsverdampfers:

Temperatur des Wasserbades:	30 °C
Vakuum:	800 bis 1000 mbar

**Tabelle 5.15: Bedingungen für wasserfreie, homogenisierte Sediment-, Fisch- und Fischotterproben während der Extraktion in der Mikrowellen-Apparatur**

Probenmaterial	Probeneinwaage g	Anlaufzeit/Haltezeit (ramp/hold) min	Abkühlzeit min	Temperatur °C	Lösungsmittelgemisch	Lösungsmittelmenge ml
<b>Sediment</b>	3	3/30	30	80	n-Hexan-Aceton 3:1	50
<b>Fische/Fischotter</b>	1	3/10	30	80	n-Hexan-Aceton 1:1	20

**Fische – Fischotter** - Die Extraktion der Fisch- und Fischotterproben wurde zwecks Lipidextraktion in der Mikrowellen-Apparatur durchgeführt. Die dazu verwandte Methode wurde im Vorfeld durch einen Methodenvergleich zur Optimierung des Systems ermittelt (siehe „5.1 Methodenvergleich – Fettextraktion“).

Jeweils 1 g des wasserfreien Probenhomogenates wurden in die Polytetrafluorethylenbehälter der Mikrowellen-Apparatur überführt und mit 20 ml eines Lösungsmittelgemisches aus n-Hexan und Aceton im Verhältnis 1:1 aufgefüllt. Die Nativproben wurden mit einem internen

Standard in der definierten Menge von 1 ml und einer Konzentration von 10 pg/μl (PCB-84) versetzt, die Behältnisse verschlossen und in die Mikrowellen-Apparatur verbracht. Während jeden Probendurchlaufes in dem Extraktionsgerät wurde mindestens eine Blindwertprobe mitgeführt, um probenexterne Kontaminationen auszuschließen. Die Bedingungen während der Extraktion in der Mikrowellen-Apparatur sind in Tabelle 5.15 aufgeführt.

Der fetthaltige Lösungsmittel-extrakt wurde nach der Entnahme aus der Mikrowellen-Apparatur über einen Faltenfilter dekantiert, mit dem zur Extraktion verwendeten Lösungsmittelgemisch nachgespült und anschließend auf etwa 2 ml am Rotationsverdampfer eingengt, um im weiteren bis zur Lösungsmittelfreiheit mit Stickstoff abgedampft zu werden. Das Fett konnte anschließend im Glaskolben rückgewogen werden.

#### 5.4.4 Chromatographie

**Sediment** - Zur Schadstoffisolierung und Aufreinigung des gewonnenen 2 ml-Extraktes wurden diese auf eine Minisäule gegeben, die 1,5 g Kieselgel enthielt, deren unteres Ende mit Glaswolle verschlossen und die vor Extraktauftrag mit 10 ml n-Hexan konditioniert wurde.

Um Restwasser abzusondern erfolgte eine etwa 1 cm starke Überschichtung des Kieselgels mit wasserfreiem geglähten Natriumsulfat.

**Tabelle 5.16: Übersicht über die Spülvorgänge für Sedimentproben mit der Kieselgel- und Kieselgel-Silbernitrat-Minisäule**

Spülschritt (lfd. Nr.)	Lösungsmittelmenge ml	Lösungsmittelsubstrat
Konditionierung	8	n-Hexan
Probenauftrag	1 - 2	Eluat
1.	2	n-Hexan
2.	2	n-Hexan
3.	5	n-Hexan-Dichlormethan (80:20)
4.	10	n-Hexan-Dichlormethan (80:20)
5.	10	n-Hexan-Dichlormethan (80:20)

Nach dieser von SPECHT und TILLKES (1980) beschriebenen und weiter modifizierten Methode war eine weitere Reinigung notwendig, um die schwefelhaltigen Substanzen aus dem zu messenden Extrakt zu isolieren. Hierzu wurde die gewonnene Menge Eluat aus der ersten

Aufreinigung erneut auf etwa 2 ml am Rotationsverdampfer eingengt und über eine Minisäule eluiert, deren Schüttung anstelle des Kieselgels mit 2 g Kieselgel-Silbernitrat erfolgte (KLÄRSCHLAMMVERORDNUNG, 1992). Die Gesamtheit der Spülvorgänge für beide Reinigungsverfahren ist in Tabelle 5.16 aufgeführt.



Die erhaltene Schadstofflösung wurde mittels Rotationsverdampfer auf 2 ml aufkonzentriert und auf 0,5 bis 1 ml unter Stickstoffzufuhr eingedampft.

Mit Isooctan wurde auf 1 ml ergänzt, die Lösung in ein Minivial gefüllt, welches dann für die gaschromatographische Bestimmung zur Verfügung stand.

**Fische – Fischotter** - Wie im Methodenvergleich („5.2. Methodenvergleich - Schadstoffextraktion“) ausgeführt, konnte Moschus-Keton durch die Eluierung mittels Florisil-Mini-Säulen nicht isoliert werden. Um diese Substanz nachweisen zu können, wurden Proben durch die

**Tabelle 5.17: Übersicht über die Spülvorgänge für Fisch- und Fischotterproben mit der Florisil-Mini-Säule**

Spülschritt (lfd. Nr.)	Lösungsmittelmenge ml	Lösungsmittelsubstrat
Konditionierung	10	n-Hexan-Dichlormethan (80:20)
Probenauftrag	1 - 2	Extrakt
1.	2	n-Hexan-Dichlormethan (80:20)
2.	2	n-Hexan-Dichlormethan (80:20)
3.	5	n-Hexan-Dichlormethan (80:20)
4.	20	n-Hexan-Dichlormethan (80:20)

Gelchromatographie im Autoprep 1002 A aufgearbeitet. Da sich jedoch in keiner Probe Moschus-Keton nachweisen ließ, konnte im folgenden die Chromatographie durch Florisil-Mini-Säulen angewendet werden, die die schon erwähnten Vorteile gegenüber

der Arbeit mit dem Autoprep 1002 A bot.

Die Trockenschüttung der Florisil-Mini-Säule erfolgte mit 8 g eines Florisil-Kieselgel-Gemisches, welches als Adsorbens diente. Der untere Auszug der Mini-Säule wurde vorher mit Glaswatte verschlossen, das Adsorbensgemisch nach der Schüttung mit etwa 1 cm ge- glühtem Natriumsulfat überschichtet. Wegen möglicher Luftblasenbildung wurde ein Trok- kenlaufen der Säulen nach der Konditionierung oder während der Elution vermieden. Die Elutionschritte an den Florisil-Mini-Säulen wurden in Tabelle 5.17 aufgeführt.

Vor dem erneuten Einengen auf etwa 2 ml am Rotationsverdampfer wurden dem aufgefangenen Eluat jeweils 1 ml Dodecan hinzugefügt. Unter Stickstoff konnte anschließend auf < 1ml eingedampft, mit Isooctan auf 1 ml aufgefüllt und die Lösung in Mini-Vials mit Teflonsepten und Schraubverschluß verbracht werden. Die Aufbewahrung bis zur gaschromatographischen Auswertung erfolgte im Kühlraum (+2 bis +7 °C).

### 5.4.5 Gaschromatographische Auswertung

**Sediment – Methodenvergleiche** - Zur gaschromatographischen Bestimmung wurde ein GC der Fa. Varian verwendet. Die Probenlösungen wurden über eine 60 m GC-MS Säule DB5 (Innendurchmesser: 0,25 mm) durch einen EC-Detektor mit in Tabelle 5.18 beschriebenem Programm gemessen.

**Fische – Fischotter** - Die gaschromatographische Auswertung erfolgte an dem Gerät, welches zur Messung der Sedimentproben herangezogen wurde, mit der Ausnahme eines zur Substanzanalyse modifizierten Programmes und einer 30 m GC-MS-Säule DB5 (Innendurchmesser: 0,25 mm, EC-Detektor).

Einen Überblick über Programm- und GC-Bedingungen geben die Tabellen 5.18, 5.19 und die Tabelle 5.20.

**Tabelle 5.18: Konditionen für die Schadstoffanalyse am GC/ECD für Sedimentproben, die Methodenvergleiche („5.1.“ und „5.2.“), Fisch- und Fischotterproben**

Gerätebedingungen	Sediment und Methodenvergleiche	Fische und Fischotter
<b>Säulentemperatur:</b>	120 °C	120 °C
<b>Injektortemperatur:</b>	250 °C	250 °C
<b>Detektortemperatur:</b>	300 °C	300 °C
<b>Zeitdauer des Programms:</b>	81,2 min	72,2 min
<b>Flow:</b>	1 ml/min	1 ml/min
<b>Druck:</b>	20 psi	14 psi
<b>Split Ratio:</b>	30 min geschlossen, 0,6 min offen	30 min geschlossen, 0,6 min offen
<b>Geschwindigkeit auf der Säule:</b>	19 cm/sec	29 cm/sec
<b>Probeneinspritzvolumen:</b>	1 µl	1 µl
<b>Trägergas:</b>	Stickstoff	Stickstoff
<b>Spülgas:</b>	Stickstoff	Stickstoff

Das GC-Programm wurde hinsichtlich der Intervallabfolgen, der Temperaturen, der Geschwindigkeiten und der Haltezeiten während verschiedener Versuchsphasen auf die zu isolierenden Substanzen eingestellt und optimiert. Dabei war darauf zu achten, daß es zu keinen Überlagerungen der Retentionszeiten und zu deutlich und scharf abgegrenzten Chromatogramm-Peaks kam.

**Tabelle 5.19: Meßbedingungen am GC für die 60 m GC-MS-Säule während der Methodenvergleiche und zur Analyse von Sedimentproben**

<b>Programmschritt (Nr.)</b>	<b>Temperatur °C</b>	<b>Geschwindigkeit °C/min</b>	<b>Haltezeit (hold) min</b>
1.	120		0,1
2.	210	3	0,1
3.	240	15	20
4.	280	10	25

**Tabelle 5.20: Meßbedingungen am GC für die 30 m GC-MS-Säule zur Analyse von Fisch- und Fischotterproben**

<b>Programmschritt (Nr.)</b>	<b>Temperatur °C</b>	<b>Geschwindigkeit °C/min</b>	<b>Haltezeit (hold) min</b>
1.	120		2
2.	200	3	0,1
3.	220	1	0,1
4.	260	3	10

Die durch diese Konditionen erhaltenen Chromatogramme wurden mit denen von Referenzsubstanzen verglichen und entsprechend ausgewertet. Benutzt wurden Nitromoschusduftstoffstandards und Standardlösungen mit persistenten chlororganischen Verbindungen, welche jeweils definierte Konzentrationen zwischen 5 und 11 pg/µl aufwiesen.

Am Anfang jeder Probenmessung wurden diese Standardlösungen gaschromatographisch ausgewertet, um dann nach jeder 7. Probenlösung wiederum als Referenzsubstanzen während der Messung zu dienen. In genau dieser Weise wurde mit dem internen Standard verfahren, an dem sich, für jede Probe separat, die Wiederfindung orientierte.

In den Abbildungen 5.13 bis 5.15 finden sich Beispielchromatogramme für Sediment-, Fisch- und Fischotterproben.

## 5.4.6 Absicherung der gewählten Methoden

### INTERNER STANDARD

Als interner Standard wurde PCB-84 genutzt, da er in keiner Nativprobe nachzuweisen war und in Bezug auf die Retentionszeit keinerlei Überlagerung mit anderen Substanzen zeigte.

### PRÄZISION

Um die Präzision der Methodik zu untersuchen wurden mehrere Aliquote des gleichen Fischhomogenates 10mal separat aufgearbeitet und die so ermittelten Werte miteinander verglichen

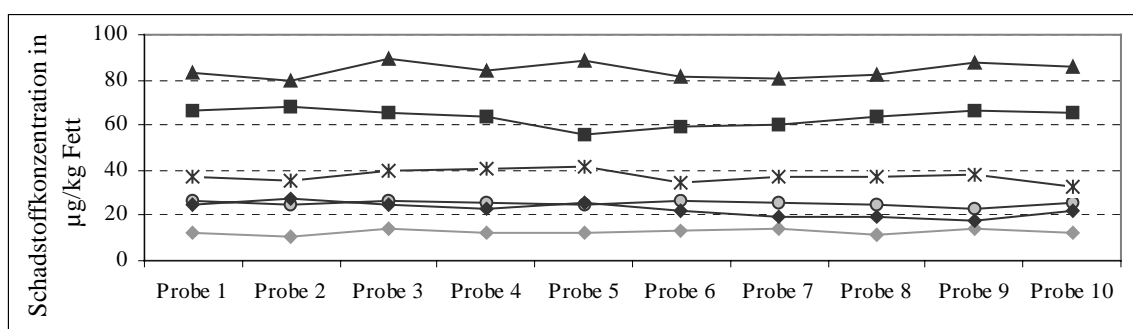


Abbildung 5.10: PCB-28, -52, -101, -151, -118 und DDE als Beispiele für Schwankungsbreiten bei einem Reproduzierbarkeitsnachweis mittels GC/ECD

und gegenübergestellt. Die Abweichungen der so ermittelten Schadstoffwerte in µg/kg Fett wiesen einen Schwankungsbereich von  $\pm 2,5\%$  (PCB-138) bis  $\pm 15\%$  ( $\alpha$ -HCH) auf, wobei sehr niedrig konzentrierte Substanzen größeren Schwankungen unterlagen, als Stoffe mit hohen Substratkonzentrationen (Abbildung 5.10).

### WIEDERFINDUNG

**Methodenvergleiche** – Referenzsubstanzen von chlorierten Chlorkohlenwasserstoffen und Nitromoschusduftstoffen mit definierten Konzentrationen zwischen 5,51 pg/µl (HCB) und 10,5 pg/µl (Moschus-Tibeten) - dazu Tabelle 5.21 - dienen zur Überprüfung der gewählten Methoden. Eine Wiederfindung zwischen 81 % (Moschus-Mosken)

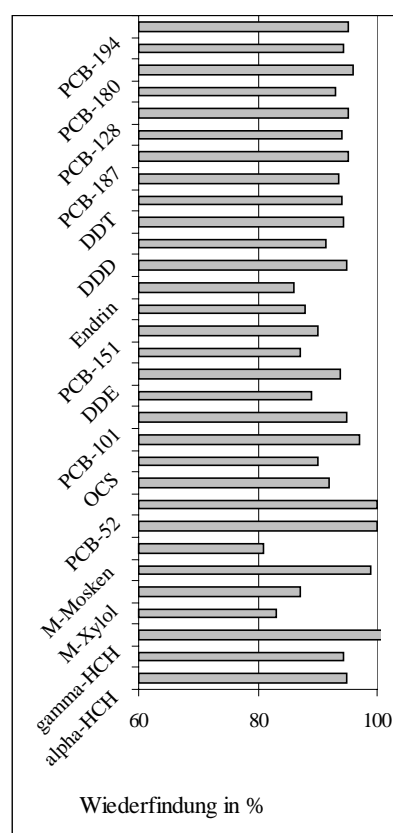


Abbildung 5.11: Wiederfindung mit Referenzsubstanzen zur Überprüfung der ausgewählten Methoden

und 101 % ( $\gamma$ -HCH) konnte gewährleistet werden (Abbildung 5.11).

**Sediment - Fische – Fischotter** - Die Wiederfindung in den Nativproben wurde mit Hilfe des internen Standards (PCB-84) berechnet. Sie lag bei keiner zur Wertung genutzten Probe unter 83 % oder über 102 %.

**Tabelle 5.21: Konzentrationen der verwendeten Referenzsubstanzen in pg/ $\mu$ l**

Substanzen	Konzentration pg/ $\mu$ l
$\alpha$ -HCH	6,77
$\beta$ -HCH	8,41
HCB	5,51
$\gamma$ -HCH	8,27
DDT	7,72
DDE	6,92
DDD	6,71
OCS	5,77
Dieldrin	3,56
Endrin	10,46
PCB	10
Moschus-Ambrette	10,23
Moschus-Xylol	10,03
Moschus-Mosken	11,15
Moschus-Tibeten	10,50
Moschus-Keton	10,17

#### NACHWEISGRENZEN

Die ermittelten Nachweisgrenzen dienen als Beschreibung für die Empfindlichkeit des Gaschromatographen, speziell des Detektors, sind jedoch von einer ganzen Reihe auch geräteexterner Faktoren abhängig.

Über Verdünnungsreihen von Referenzlösungen ergab sich für jede relevante Substanz ein Wert zwischen 0,15 pg/ $\mu$ l (HCB) und 1,25 pg/ $\mu$ l (Moschus-Mosken) als Nachweisgrenze. Dabei wurde ein Peak, der mindestens die doppelte Höhe des baseline-Grundrauschens besaß, als noch identifiziert und nachgewiesen angesehen.

#### BLINDWERT

Während der Aufarbeitung der Nativproben wurde bei Sedimentaliquoten nach jeder 6. und bei der Aufarbeitung von Fisch- und Fischottergewebe nach jeder 11. Probe ein Blindwert mit extrahiert, aufge-

reinigt und gaschromatographisch ausgewertet. Dieser wurde lediglich mit dem internen Standard versetzt, durchlief im weiteren jedoch alle Aufarbeitungsschritte der Nativproben. Auswertbare Quantitäten an Schadstoffen waren in den Blindwerten nicht nachzuweisen. Die Wiederfindung des internen Standards in diesen Proben betrug 79 bis 96 %.

Ein Beispiel eines Blindwert-Chromatogrammes ist in der Abbildung 5.12 dargestellt.

### RICHTIGKEIT

**Nachweis durch Massenspektroskopie** - 23 der im GC/ECD analysierten und quantifizierten Substanzen wurden massenspektroskopisch untersucht. 16 Substanzen konnten im full-scan-mode zweifelsfrei identifiziert werden.

Ein Nachweis gelang nicht bei Moschus-Xylol, PCB-28, PCB-52, DDT, DDD,  $\alpha$ -HCH und  $\gamma$ -HCH. Für diese Substanzen ergab sich keine ausreichende Konzentration in den Nativproben, die die mittels Standardsubstanzen ermittelte Nachweisgrenzen im Massenspektrometer erreicht hätten.

**Ringversuche** – Zur Überprüfung der Richtigkeit wurde bisher jährlich an Ringversuchen teilgenommen, welche vom *Institut für Qualitätsmanagement in der Medizin*, Universität Erlangen-Nürnberg, organisiert werden. Diese europaweit durchgeführten Ringversuche wurden bisher durch die am Institut für Toxikologie ständig tätigen und verantwortlichen Mitarbeiter im Analytiklabor mit Erfolg bestanden. Der letzte dieser Ringversuche fand im Oktober 1999 statt.

### STATISTISCHE METHODEN

Aus organisatorischen und naturschutzrechtlichen Gründen mußte bei den vorgenommenen Untersuchungen auf einzelne Tiere einer Art zurückgegriffen werden. Aus diesem Grund wurde in den meisten Fällen auf eine analytische Statistik verzichtet. Bei Probengruppen von  $n < 6$  ist eine rein deskriptive Auswertung vorgenommen worden, die lediglich Hinweisen aus den vorliegenden Ergebnissen nachgeht.

Zur Darstellung wurden die absoluten Schadstoffwerte oder die Beschreibung durch Minimal- und Maximalwerte bevorzugt, da somit eine realistischere Wertübersicht möglich wurde.

Probengruppen mit Stichproben von  $n \geq 6$  (Brassen, Sedimentproben) wurden unter Einbeziehung des aufgeführten Medianwertes, des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Standardfehlers des Medians dargestellt und diskutiert. Die Aufführung dieser vier Parameter wurde gewählt, um die Streuung und das Verteilungsmuster der Stichproben deutlich zu machen. Median und Standardfehler des Medians wurden gebildet, um (vor allem bei kleineren Stichprobenumfängen) schiefen Verteilungen, Extremwerten und Stichproben mit großer Streuung gerecht zu werden.

In diesem Sinne basieren Abbildungen, die aus einer Probengruppe  $n \geq 6$  Stichproben ihre Werte beziehen, auf der Darstellung des Medians und des dazugehörigen Standardfehlers des Medians.

Als statistischer Test für die Auswertung der Brassen-Proben fand zum einen der H-Test von Kruskal und Wallis Verwendung, um im Jahresvergleich (Brassenproben der Jahre 1997, 1998 und 1999) eine eventuelle signifikante Abweichung im Schadstoffgehalt der Tiere zu erkennen. Er wurde nach folgender Formel berechnet (SACHS, 1999):

$$\hat{H} = \left[ \frac{12}{n(n+1)} \right] \times \left[ \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} \right] - 3(n+1)$$

Um die im H-Test als signifikant festgestellten Differenzen im Schadstoffgehalt der Brassen des Hohner Sees zwischen den Jahren 1997 und 1999 genauer zu analysieren und zu berechnen, wurde der Tukey-Kramer-Test gewählt (SACHS, 1999).

Alle Berechnungen fanden unter der Annahme eines Signifikanzniveaus von 5 % statt.