



Kurzbericht

an das



Ministerium für
Umwelt und Naturschutz,
Landwirtschaft und Verbraucherschutz
des Landes Nordrhein-Westfalen

NRW.

zum Projekt

**„Einträge und Quellen von Tris(2-chlorpropyl)-phosphat und
Tris(2-chlorethyl)-phosphat in Oberflächen- und Abwässern“**

Aktenzeichen IV - 9 – 042 526 vom 29.01.2002

Sachbearbeiter:

Dr. Kai Bester

INFU

Jens Meyer

INFU

Dr. Wolfram Föllmann

Institut für Arbeitsphysiologie

Universität Dortmund

Univ.-Prof. Dr. M. Spittler

Campus Nord

Otto-Hahn-Straße 6

44221 Dortmund

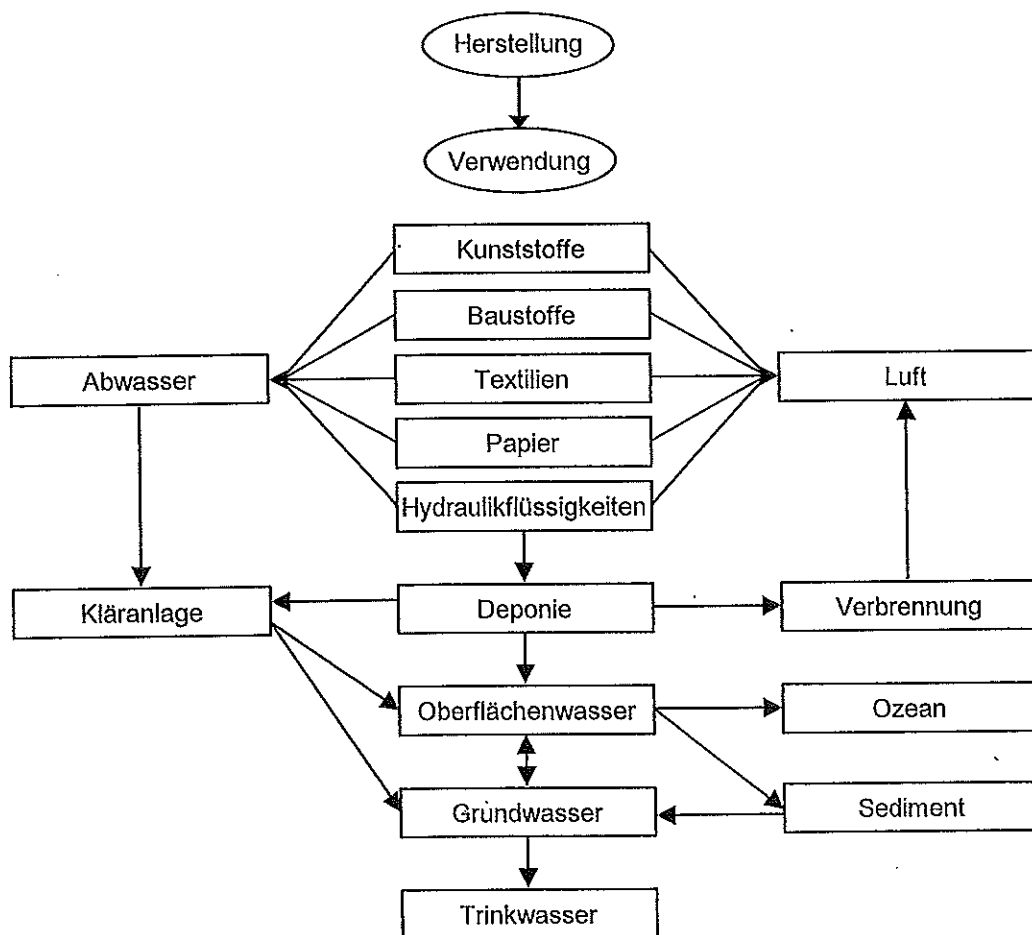
Tel. (0231) 7554080

e-mail: spittler@infu.unit-dortmund.de

Januar 2004

Im Auftrag des Ministeriums für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen hat das Institut für Umweltforschung der Universität Dortmund zusammen mit dem Institut für Arbeitsphysiologie der Universität Dortmund ökochemische und toxikologische Untersuchungen zum Verbleib von Organophosphaten in Oberflächengewässern Nordrhein-Westfalens und in ausgewählten Kläranlagen durchgeführt.

Alkylphosphate, hier insbesondere chlorierte Spezies, und Arylphosphate werden hauptsächlich als Flammschutzmittel in Kunststoffen, Baustoffen, Textilien, Papier, Hydraulikflüssigkeiten, sowie als Weichmacher in Polyurethanschäumen und Kunststoffen verwendet [Hansen et al. 2001; Sagunski et al. 1997; Ingerowski et al. 1997; Leisewitz et al. 2000]. Unten stehende Abbildung veranschaulicht mögliche Eintragungspfade der Analyten in die Umwelt.



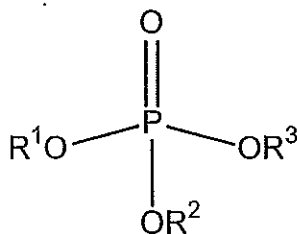
Eintragungspfade von Alkyl- und Arylphosphaten in die Umwelt [Grundmann 2000]

Die Analyten sind mit bis zu 20 Gew - % [Friedle 1999] in den Zielprodukten enthalten. Sie können während der Produktion und nach Fertigstellung der Zielprodukte freigesetzt werden.

Das wachsende Interesse an Alkyl- und Arylphosphaten kann auf den steigenden Einsatz dieser Substanzen, insbesondere als Flammschutzmittel, zurückgeführt werden. Allein in Deutschland

wurden 1997 rund 95.000 t Flammschutzmittel verwendet. Ca. 15% dieser Menge wird durch halogenierte und nicht halogenierte, organische Phosphatverbindungen repräsentiert. Der internationale Weltmarkt, der 1996 bei geschätzten 800.000 t lag, wird mit rund 38% Verbrauch (ca. 316.000 t) von den USA dominiert, gefolgt von Europa und Asien mit jeweils rund 30% Verbrauch (ca. 255.000 t). Auslöser des stetig steigenden Verbrauchs an Flammschutzmitteln war ein höheres Sicherheitsbedürfnis besonders in öffentlichen Räumen, sowie der Ersatz von früher verwendeten, toxikologisch und ökotoxikologisch bedenklichen Flammschutzmitteln wie z.B. bromierten Substanzen [Ljung 1996].

Organisch substituierte Trisphosphate haben folgende allgemeine Strukturformel und in der Tabelle sind die wichtigsten Vertreter dargestellt:



- Tri-n-butylphosphat (TBP)	R ¹ , R ² , R ³	- C ₄ H ₉
- Triphenylphosphat (TPP)	R ¹ , R ² , R ³	- C ₆ H ₅
- Tris(2-butoxyethyl)-phosphat (TBEP)	R ¹ , R ² , R ³	- CH ₂ CH ₂ O(CH ₂) ₃ CH ₃
- Tris(2-chlorethyl)-phosphat (TCEP)	R ¹ , R ² , R ³	- CH ₂ CH ₂ Cl
- Tris (1,3-dichlorisopropyl)-phosphat (TDCP)	R ¹ , R ² , R ³	- CH(CH ₂ Cl)CH ₂ Cl
- Tris (2-chlorisopropyl)-phosphat (TCPP)	R ¹ , R ² , R ³	- CHCH ₂ ClCH ₃

TBP wird als Lackbestandteil und ebenso wie TPP als Weichmacher von plastischen Massen eingesetzt. TCEP wurde vor allem als Weichmacher und Viskositätsregulator mit flammhemmenden Eigenschaften eingesetzt (Produktblatt Hoechst Reg.-Nr. 6.2.). Zu über 80% wird es als Weichmacher mit flammhemmenden Eigenschaften in Polyurethanen eingesetzt, ebenso wie TDCP.

Heute wird TCEP, welches in Verdacht steht neurotoxisch zu wirken, weitestgehend durch TCPP ersetzt. Polyurethanschaum findet in der Textil-, Bau- und Möbelindustrie und im Innenausbau der Automobilindustrie Verwendung.

TBEP wird nicht als Flammschutzmittel eingesetzt, sondern findet Verwendung als Weichmacher.

Organisch substituierte Trisphosphate wirken teilweise schon in geringen Konzentrationen auf aquatische Organismen toxisch [Kuhlmann, 1991]. Dies spiegelt sich in der Einstufung in die

Wassergefährdungsklassen wieder, z.B. ist Tris(2-chlorethyl)-phosphat (TCEP) in der Klasse 2 – wassergefährdend. Im Tierexperiment mit Ratten konnten eine krebserzeugende Wirkung und Neurotoxizität von TCEP festgestellt werden [Industrie B.d.c., 1995].

Triphenylphosphat (TPP) kann zu Atembeschwerden führen und wird als hochgiftig für im Wasser und im Boden lebende Organismen angesehen. TPP wirkt bereits in Konzentrationen, die unterhalb der Wasserlöslichkeit liegen, toxisch. Bereits ab Konzentrationen von 1 mg wirkt TPP tödlich auf Goldfische [Ahrens, 1978]

Material und Methoden

Die Probenahme erfolgte am 43 Messstellen entlang der Ruhr und schloss auch den Mündungsbereich der Flüsse Möhne und Lenne ein.

An den einzelnen Probenahmestellen wurden jeweils 1l Proben gezogen und analysiert. Die Probenahme erfolgte Mitte September 2002 in einer Periode ohne Niederschläge. Aufgearbeitet wurden die Proben per Flüssig-Flüssig-Extraktion mit TnBP_{D27} als internem Standard. Anschließend erfolgte die Messung per GC-MS. Da die Wiederfindungsraten für TCEP bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion sehr niedrig sind, wurden parallel drei Proben per Festphasenextraktion analysiert. Beide Methoden liefern vergleichbare Ergebnisse. Die Identifikation der Analyten erfolgt über die Retentionszeit und die Masse m/z des ausgewählten Massenfragments. Die Tabelle zeigt die Validierungsdaten für die verwendeten Methoden,

Analyt	RT [min]	Wiederfindung		LOQ [ng/l]
		[%]	RSD [%]	
TiBP	10,87	107	12	6,3
TnBP	11,95	98	19	6,0
TCEP (LLE)	13,47	31	33	12,0
TCEP (SPE)	13,47	67	15	12,0
TCPP	13,85	101	14	4,9
TDCP	18,92	95	3	14,0
TBEP	19,55	89	19	6,4
TPP	19,59	93	27	5,5

RT = Retentionszeit
RSD = relative Standardabweichung
LOQ = Bestimmungsgrenze

In der Untersuchung wurde das Großklärwerk Köln-Stammheim über einen Zeitraum von 6 Wochen (16.02.03 – 26.03.03) beprobt. Ziel war es, die Abbauleistung des Klärwerks in Bezug auf die zu untersuchenden Organophosphate zu untersuchen. Im Rahmen der Untersuchung wurden hierzu 1l Proben vom Zu- bzw. Ablauf des Klärwerks gezogen.

Folgende toxikologische Tests wurden durchgeführt:

Zytotoxizitätsassay: Neutralrot (NR)-Aufnahme-Assay

Der NR-Assay wurde nach einer modifizierten Vorschrift von BABICH UND BORENFREUND (1992) durchgeführt.

Genotoxizitäts-Assay: Alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay)

Die Durchführung des Comet -Assay beruht auf der Methode von SINGH *et al.* (1988) und wurde mit V79-Zellen (siehe oben) durchgeführt.

Mutagenitätsassay: *Salmonella typhimurium* Mutagenitätsassay (Ames-Test)

Der Ames-Test, der in diesen Untersuchungen verwendet wird, dient zum Nachweis von Genmutationen und ist für die Abschätzung des mutagenen Potenzials von chemischen Stoffen geeignet (Maron and Ames 1983). Für diesen Assay wurden acht verschiedene *Salmonella*-Stämme eingesetzt. Die Stämme TA 1535 und TA 100 detektieren Basensubstitutionen, die Stämme TA 1537, TA 1538 und TA 98 detektieren Leseraster-Mutationen und die Stämme TA 102 und TA 104 reagieren besonders empfindlich auf oxidierend wirkende Mutagene [Marnett 1985].

Östrogene Aktivität: Rekombinanter Hefeassay

Dieser einfache biologische Screening-Assay ermöglicht es, Substanzen aus der Umwelt auf hormon-ähnliche Effekte hin zu untersuchen (Routledge & Sumpter 1996).

Östrogene Aktivität: Stimulierung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität in Ishikawa-Zellen

Es ist bekannt, dass bei Behandlung mit Östradiol in Ishikawa-Zellkulturen eine Zunahme der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AlkP) nachweisbar ist, die etwa nach drei Tagen ihr Maximum erreicht (Holinka *et al.*, 1986).

Ergebnis

Die beiden Untersuchungsreihen über die Ruhr und das Klärwerk Köln-Stammheim haben gezeigt, dass die hier betrachteten Organophosphorverbindungen relevante Umweltkontaminanten darstellen. Obwohl die Ruhr als Hauptquelle zur Trinkwasserversorgung des Ruhrgebiets genutzt wird und eines der bestgeschützten Gewässer Europas ist, konnten die Organophosphate schon wenige Kilometer nach der Quelle nachgewiesen werden. Deutlich zu erkennen ist, dass die Konzentrationen stromab bis zur Mündung in den Rhein stark zunehmen.

Als Eintragsquellen für diese Verbindungen konnten Klärwerke identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass die verschiedenen Klärwerke auch unterschiedlich zu der Verschmutzung beitragen. Beispielsweise tragen die Klärwerke Bochum Ölbachtal und Hagen deutlich zum Eintrag von den chlorierten Flammschutzmitteln bei, während sie für den Eintrag der nichthalogenierten Organophosphate eine untergeordnete Rolle spielen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch Nebenflüsse der Ruhr wie Möhne und Lenne, von denen man bisher annahm, dass sie kaum von Kläranlagen beeinflusst werden, ebenfalls zur Verschmutzung der Ruhr beitragen. Als Ergebnis der Probenserie im Großklärwerk Köln-Stammheim lässt sich festhalten, dass sich die halogenierten und nichthalogenierten Organophosphate in ihrem Abbauverhalten deutlich unterscheiden. Während sich bei den nichthalogenierten Flammschutzmitteln wie TBEP und TBP Eliminierungsraten bis zu 88% über den gesamten Abwasserreinigungsprozess feststellen ließen, wurde eine Verringerung der Konzentrationen an den halogenierten Verbindungen wie TCPH und TCEP nicht festgestellt. Eine stichprobenartige Untersuchung von Proben aus einem Teilprozess der Abwasserreinigung hat gezeigt, dass die Konzentrationen der nichthalogenierten Flammschutzmittel im Abwasser bereits mit der ersten Reinigungsstufe deutlich reduziert werden.

Aufgrund der beachtlichen Kontaminationen der aquatischen Umwelt wurden Untersuchungen auf die Zytotoxizität, Genotoxizität, Mutagenität sowie auf die östrogene Wirkung von TCPH und TCEP vorgenommen. Die toxikologischen Untersuchungen zeigen, dass allenfalls bei sehr hohen Konzentrationen, die keine Umwelrelevanz besitzen, schwache Effekte z.B. bei der Zytotoxizität auftraten. Hinweise auf eine mutagene Wirkung von TCPH oder TCEP liegen ebenso nicht vor wie Effekte möglicher toxischer Metabolite. Auch eine östrogene Wirkung konnte nicht nachgewiesen werden.

Die hier untersuchten Substanzen Tris (2-chlorpropyl)-phosphat (TCPH) und Tris (2-chlorethyl)-phosphat (TCEP) zeigten in keinem der angewendeten toxikologischen Assays einen adversen Effekt. Eine schwache Zytotoxizität gegenüber V79 Zellen trat erst bei sehr hohen Konzentrationen auf. Es ist nicht auszuschließen, dass andere, primäre Zellkulturen möglicherweise empfindlicher reagiert hätten. Eine Induktion von DNA-Strangbrüchen konnte in V79 Zellen ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Im Ames-Assay mit acht verschiedenen Teststämmen wurden keine mutagenen Wirkungen von TCPH und TCEP nachgewiesen. Es ergaben sich also keine Hinweise auf ein mutagenes Potential oder andere genotoxische Schäden (DNA-Strangbrüche).

Die Verwendung des externen Metabolisierungssystems (S-9 Mix) zeigte in allen Testsystemen keine Modulation des toxischen Effektes. Daher ist davon auszugehen, dass auch keine stärker toxischen Metabolite gebildet werden.

Für die beiden Testsubstanzen lagen bislang keine Daten zu möglichen hormonellen Wirkungen in der Literatur vor. Daher wurde im Rahmen dieses Vorhabens erstmals ein Screening auf östrogene Wirkung der Substanzen durchgeführt. In zwei verschiedenen Assays (mit Hefen und Säugerzellen) waren keine östrogenen Wirkungen nachweisbar.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten: Die in den hier verwendeten Assays ermittelten Daten zeigen, dass die Substanzen Tris (2-chlorpropyl)-phosphat (TCPP) und Tris (2-chlorethyl)-phosphat (TCEP) keine adversen Effekte ausüben.

Es wird darauf hingewiesen, dass die eingesetzten Testsysteme nur Aussagen für die von ihnen erfassten Mechanismen zulassen. Dies lässt noch keine allgemeine Bewertung der Substanzen im Sinne einer umfassenden Risikoabschätzung zu.

Ziel weiterer Untersuchungen sollte es sein, durch technische Maßnahmen in der Betriebsführung von Kläranlagen eine bessere Abbaubarkeit der Organophosphate zu erreichen. Hierzu ist es notwendig, detaillierte Untersuchungen der einzelnen Behandlungsschritte in den Kläranlagen durchzuführen.

Literatur

Ahrens, V.D. (1993) A Water extractable toxic compound in vinyl upholstery fabric. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 20, 418-422

Friedle, A. (1999) Umweltmonitoring organisch substituierte Trisphosphate, Umed – info, PMA Sindelfingen GmbH

Grundmann, A. (2002) Methodenentwicklung zur Bestimmung von Alkylphosphaten unter besonderer Berücksichtigung von Tris (2-chlorpropyl) phosphat und Tris (2- chlorethyl) phosphat aus wässrigen Proben, Diplomarbeit Universität Dortmund, Fachbereich Chemie, Institut für Umweltforschung (INFU)

Hansen, D., Volland, G. und Zöltzer, D. (2001) Bestimmung und Vorkommen von phosphororganischen Verbindungen in Hausstaub und Raumluft, Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft 61, 13-17

Holinka CF, Hata H, Kuramoto H, Gurside E (1986) Effects of steroid hormones and antisteroids on alkaline phosphatase activity in human endometrial cancer cells (Ishikawa line). Cancer Res 46, 2771-2774

Ingerowski, G., Friedle, A., Thumulla, J. und Sagunski, H. (1997) Tris(2-chlorisopropyl)-phosphat als Flammschutzmittel und Weichmacher im Wohninnenraum: Vorkommen und Risikoabschätzung, Umweltmed. Forsch. Prax. 2, 233-235

Leisewitz, A., Krause, H. und Schramm, E. (2000a) Erarbeitung von Bewertungsgrundlagen zur Substitution umweltrelevanter Flammschutzmittel, Umweltbundesamt für Mensch und Umwelt Band I, ISSN-0722-186X

Leisewitz, A., Kruse H., Schramm, E. (2000b) Umweltforschungsplan des Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Berlin

Ljung, E. (1996) The flame retardants project – Final report, The Swedish National Chemicals Inspectorate, Stockholm, KEMI Report No. 5, ISSN 0284-1185

Marnett, L.J. (1985) Naturally occurring carbonyl compounds are mutagen in Salmonella tester strain TA 104. Mutat Res.148, 25-34

Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat Res 113, 173-215

Routledge E, Sumpter JP (1996) Oestrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environ Tox Chem 15, 241-248

Sagunski, H., Ingerowski, G., Muttulat, A. und Scheutwinkel, M. (1997) Tris(2-chlorethyl)-phosphat, Umweltmed. Forsch. Prax. 2, 185-192