

RAPPORT

Chirale pesticiden in het milieu

Wim J.M. Hegeman

Januari 2006
Beschikbaar als PDF op Internet

In opdracht van:
Directoraat Generaal-Rijkswaterstaat
Rijksinstituut voor Kust en Zee (RIKZ)

Hegeman Water Expertise
Wim J.M. Hegeman
Johan Wagenaarlaan 4
2132 KE Hoofddorp
Telefoon: 023-5635148
Mobiel: 06-21408306
E-mail: w.hegeman@waterexpertise.nl
Internet: www.waterexpertise.nl

INHOUD

Chirale verbindingen in het milieu

1.	Inhoud.....	2
2.	Inleiding.....	3
2.1.	Definiëring van de Enantiomere Ratio (ER) en Enantiomere Overmaat (ee).....	7
3.	De herkenning van chirale verbindingen in de natuur.....	9
3.1.	Biota onderscheiden enantiomeren.....	9
3.2.	Enzymen; de chemische matrijs voor enantiomeerspecifieke assemblage.....	11
4.	Analyse van chirale verbindingen.....	13
4.1.	Chiraal kolom materiaal: cyclodextrines.....	13
4.2.	Thermodynamica van enantiomeer scheiding.....	20
5.	Enantiomeren in milieu compartimenten.....	22
5.1.	Enantiomeren in lucht.....	22
5.2.	Enantiomeren in water.....	23
5.3.	Enantiomeren in sediment / bodem.....	29
5.4.	Enantiomeren in biota.....	36
6.	Verklarende woordenlijst.....	49
7.	Literatuurlijst.....	55
8.	Toevoeging literatuurlijst.....	59

2. INLEIDING

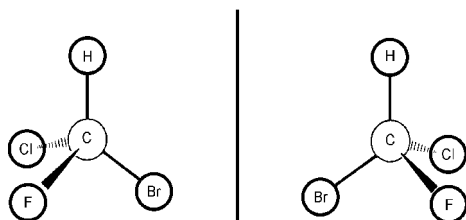
"Misschien is spiegelmelk niet zo lekker", waarschuwt Alice haar poesje Kitty als ze Spiegelland binnenstapt. Alice in Wonderland had gelijk, "Spiegelmelk smaakt niet." Sprookjes zijn waar, ik vertel later waarom. Van het sprookje stappen we naar de werkelijkheid. Als ik het heb over chirale verbindingen in het milieu worden mij direct een aantal vragen gesteld.

- Wat zijn chirale verbindingen?
- Waarom zijn deze belangrijk?
- Waarom zijn chirale verbindingen of pesticiden belangrijk in het milieu?
- Wat zijn de gevolgen voor het beleid?

Ik tracht deze vragen kort te beantwoorden.

Wat zijn chirale verbindingen?

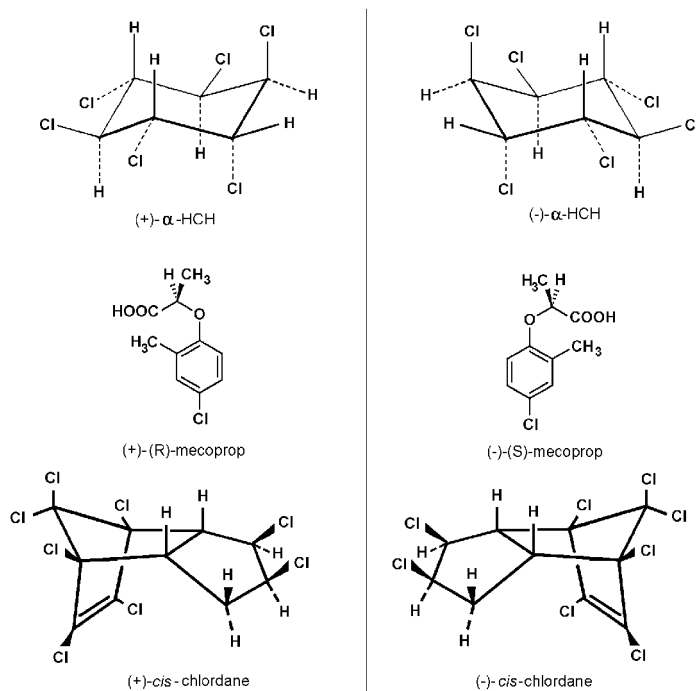
Chiraal betekent dat het een eigenschap van chiraliteit heeft (IUPAC, 1996). Chiraliteit is een geometrische eigenschap van een vast object dat niet tot dekking is te brengen met zijn spiegelbeeld. Een voorbeeld: neem u linker- en rechterhand deze zijn elkaars spiegelbeeld, ze zijn echter niet zodanig te draaien zodat ze volledig over elkaar vallen. Ze zijn geen kopie van elkaar maar hebben beide één duim, vier vingers, een palmkant en een rugkant. Maar een rechterhand blijft een rechterhand en een linker blijft een linkerhand. Zo is het ook met chemische moleculen. Met name die van de organische chemie waarin koolstofatomen zitten. Bijvoorbeeld: de verbinding broomchloorfluormethaan (BrClFCH). In de figuur is koolstof gebonden aan vier verschillende atomen. Waterstof, broom, chloor en fluor atomen bezetten de hoekpunten van de tetraëder. Je kunt de linker verbinding niet zodanig draaien en verplaatsen zodat ze over elkaar vallen. Het chiraliteitscentrum is hier het asymmetrische koolstof atoom.



Figuur 2.1. De chirale verbinding broomchloorfluormethaan (BrClFCH). Links het R- BrClFCH en rechts het S- BrClFCH , ze zijn enantiomeren van elkaar. Het spiegelbeeld van de ene is niet tot dekking te brengen met die van de andere.

Het is niet altijd noodzakelijk dat een verbinding een asymmetrisch koolstof atoom moet hebben. PCB's kunnen een chirale as hebben omdat de verbinding gesubstitueerd is op de ortho-positie van de fenyling. Een vrije rotatie is dan niet mogelijk we noemen deze verbindingen atropisomeren. Chirale verbindingen van α -hexachloorcyclohexaan danken hun chiraliteit aan de hoek die de substituenten maken met het vlak van de zesring. Het chlooratoom kan zich bevinden in equatoriale positie (kleinste hoek) of axiale positie (grootste hoek). Andere chirale verbindingen danken hun chiraliteit aan de zijde van een vlak waarin ze liggen. Liggen ze aan dezelfde zijde dan spreken we over cis-isomeren en als ze tegenover elkaar liggen dan spreken we over trans-isomeren. In figuur 2 zijn een aantal verbindingen gegeven met hun spiegelbeeld. Alle verbindingen zijn pesticiden hun chiraliteit is afkomstig van verschillende typen asymmetrie.

Er zijn nog diverse andere vormen van asymmetrie mogelijk. Atomen als stikstof (N), fosfor (P) kunnen een asymmetrisch centrum vormen. Bovendien is het mogelijk dat in een verbinding meerdere asymmetrische centra bevat (IUPAC, 1996).



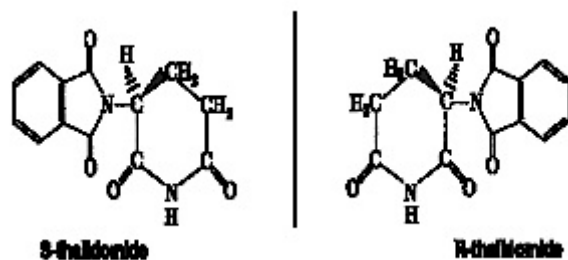
Figuur 2.2. Enantiomeren van de pesticiden: α -HCH, mecoprop, cis-chloordaan. De (+)-enantiomeren en de (-)-enantiomeren worden gespiegeld in het denkbeeldige spiegelvlak.

Waarom zijn chirale verbindingen belangrijk?

Al de levende species hier op aarde vormen chirale verbindingen. Voor een enkele soort wordt slechts één van de chirale verbinding gevormd het spiegelbeeld wordt niet gevormd. De natuur is in zijn geheel geprogrammeerd om één enantiomeer te synthetiseren zijn spiegelbeeld wordt niet gevormd. Bij veel industriële chemische reacties worden vaak beide enantiomeren verkregen. Beide enantiomeren worden gevormd de verhouding R-enantiomeer ten opzichte van S-enantiomere is 1:1. Dit mengsel wordt ook racemisch mengsel of racemaat genoemd.

Het toedienen van zo'n racemaat als medicijn kan dramatische gevolgen hebben. In de jaren vijftig werd Softenon (chemische naam: thalidomide) aan zwangere vrouwen voorgeschreven als middel tegen misselijkheid en braken. Dit racemisch mengsel bestaat uit de enantiomeren van thalidomide (R- en S-verbinding). De S-verbinding zorgde voor ernstige misvormde ledematen van duizenden baby's. De R-verbinding is onschuldig bij knaagdieren. Deze affaire had als resultaat dat in de meeste geneesmiddelen een zuiver enantiomeer wordt gebruikt die het spiegelbeeld niet bevat.

In figuur 3 staan de R- en S-verbinding (thalidomide) van Softenon zitten. Het S-enantiomeer heeft teratogene eigenschappen (induceren van abnormaliteiten in embryo's).



Figuur 2.3. De enantiomeren van Softenon (thalidomide).

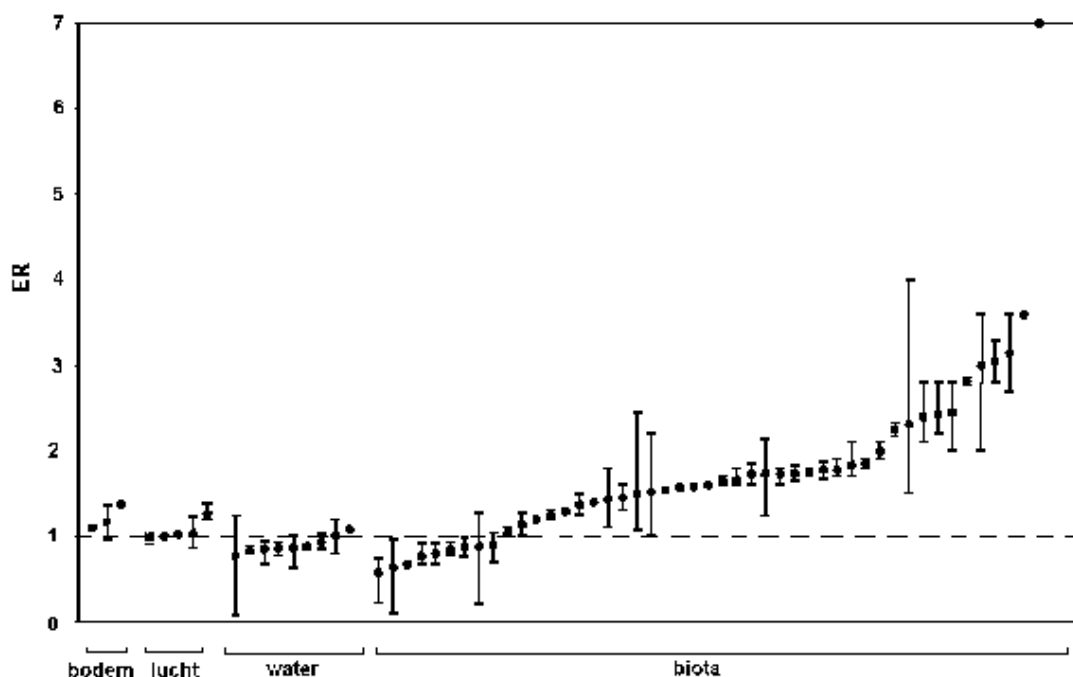
Een specie in de natuur die in contact komt met een racemaat, een 1:1 mengsel van enantiomeren, zal verschillend op de afzonderlijke enantiomeren reageren. Het is mogelijk dat selectief één verbinding afgebroken wordt en dat de andere ongewenste bijwerkingen heeft. Omdat elk levend materiaal van bacterie tot mens een verschil maakt tussen de enantiomeren van een verbinding is het belangrijk dat we weten welke effecten ontstaan en wat de lotgevallen van deze verbindingen zijn. De abiotische natuur zoals een chemische omzetting maakt geen onderscheid tussen enantiomeren. Daarom worden in veel chemische reacties een racemisch mengsel gevormd met een 1:1 verhouding tussen de enantiomeren. Alleen met chirale katalysatoren of chirale scheidingsmethoden kan men de enantiomeren van elkaar scheiden. De totale chemische inspanning die men moet doen is groter. De voordelen zijn groter omdat minder uitgangsmateriaal nodig heeft.

Waarom zijn chirale verbindingen of pesticiden belangrijk in het milieu?

Herbiciden en pesticiden (gewasbeschermingsmiddelen) worden doelbewust toegepast in de landbouw om de opbrengst te vergroten. Deze middelen komen in de bodem, de lucht of het water terecht waardoor ze in aanraking komen met de biotische wereld en ook daar de toxische werking kunnen hebben. Tevens kunnen de omzettingsproducten toxische effecten op biota hebben. Als een herbicide of pesticide kan bestaan uit een molecuul met één of meerdere chirale centra. Omdat de levende natuur zelf asymmetrisch opgebouwd is zal er een voorkeur zijn om met driedimensionale opgebouwde moleculen anders te reageren. Spiegelbeeld verbindingen (enantiomeren) kunnen met verschillende snelheden afgebroken worden. De biotische natuur maakt duidelijk verschil tussen enantiomeren. Dit geldt zowel voor afbraak als voor opname door celmembranen. De abiotische natuur doet dit niet en maakt geen verschil tussen enantiomeren. Het gevolg hiervan is dat één enantiomeer preferent afgebroken wordt en de ander niet. Het resultaat is bijvoorbeeld dat het (+)-enantiomeer een hogere concentratie heeft dan het (-)-enantiomeer. Deze concentratie verschillen worden echt waargenomen in milieu compartimenten (water, bodem, lucht en biota). Zo'n verschil in concentratie drukt men uit in een enantiomere verhouding (Enantiomere Ratio of ER). De ER is de verhouding van de concentratie van het (+)-enantiomeer en het (-)-enantiomeer in een bepaald milieu compartiment. Een verhouding van ER=1 geeft aan dat er geen verrijking heeft plaats gevonden tussen de (+)-enantiomeer en (-)-enantiomeer van een chirale verbinding. Als ER>1 is er een verrijking van het (+)-enantiomeer en als ER<1 is er een verrijking van het (-)-enantiomeer.

Van het totale aantal chirale pesticiden zijn met name de enantiomeren van α -Hexachloorcyclohexaan (α -HCH) in milieu compartimenten relatief veel geanalyseerd. In figuur 2.4. staan de enantiomere verhoudingen van α -HCH in verschillende milieucompartimenten (water, lucht, sediment en biota).

Hieruit blijkt dat de enantiomere verhouding in de abiotische compartimenten dicht bij die van het racemaat liggen (ER=1) maar dat er een sterke verrijking optreedt van het (+)- α -HCH in de biota.



Figuur 2.4. Enantiomere Ratio [ER= (+)-/(-)-enantiomeer] of α -HCH in bodem, lucht, water en biotische compartimenten. De gemiddelde waarde (●) met minimum en maximum waarde. Uit: Hegeman en Laane, 1999.

De enantiomeren hebben dezelfde fysische en chemische eigenschappen in een symmetrische omgeving maar verschillen in eigenschappen in een asymmetrische omgeving wanneer ze in contact komen met het biotische leven. Deze eigenschap kan men gebruiken voor transport processen van organische verbindingen in het milieu. Transport processen zoals uitloging, vervluchtiging en atmosferische depositie en abiotische reacties zoals hydrolyse en fotolyse maken geen onderscheid tussen enantiomeren (niet-enantioselectief). Maar metabolisme van pesticiden door micro-organismen in water en enzymen in hogere organismen verlopen wel enantioselectief. Door de ER te bepalen kunnen we een onderscheid maken tussen verschillende bronnen van chirale organische verbindingen. Enantiomere ratio's zijn gevoelige indicatoren voor biologische afbraak processen en is een tracer voor transport processen. Tevens kan men de ouderdom van een vervuiling bepalen door de afwijking ten opzichte van het racemaat te bepalen (Bidleman en Falconer, 1999). In de toekomst zijn meerdere toepassingen bruikbaar. Bijvoorbeeld de differentie tussen biologische en chemische afbraak in sediment en bodem, transport in combinatie met degradatie in oppervlakte en grondwater en selectieve accumulatie en metabolisme in voedselketen studies.

Wat zijn de gevolgen voor het beleid?

Bij de berekening van milieurisico's en toxiciteits risico's wordt geen verschil gemaakt tussen enantiomeren van chirale verbindingen. Dit is uit wetenschappelijk oogpunt aantoonbaar incorrect. Enantiomere zijn verschillende verbindingen voor biotisch leven. Bij de toxiciteits experimenten wordt geen rekening gehouden met dit verschil. Het racemaat

wordt ingezet voor de experimenten.

Wat maakt dit getalsmatig uit voor een Maximaal Toelaatbaar Risico (MTR)? We gaan uit van een chirale verbinding en dat het niet-werkzame enantiomeer geen neveneffecten heeft. Een verbinding met één chiraal centrum wordt de helft van de actieve component ingezet. Als de dosis en het effect lineair overeenkomen moet de MTR (Maximaal Toelaatbaar Risico) de helft van de oorspronkelijke waarde bedragen. Men mag immers in plaats van het racemisch mengsel (1:1) ook het werkzame enantiomeer inzetten, het effect zal dan tweemaal zo groot zijn. Bij meerdere (onafhankelijke) chirale centra wordt de nieuwe MTR:

$$\text{Nieuwe MTR} = 1/2^n * \text{MTR}$$

waarbij n het aantal (onafhankelijke) asymmetrische centra is.

Voorbeeld: bij 3 asymmetrische centra in een molecule zou de "oude" MTR door 8 gedeeld moeten worden. In feite betekent dit dat de MTR-afleiding incorrect is voor chirale verbindingen.

Al decennia lang worden chirale pesticiden toegepast op de levende natuur. Vanaf 1990 is er vanuit milieuchemische hoek belangstelling voor chirale verbindingen. In toenemende mate worden chirale pesticiden geanalyseerd in milieucompartimenten met name in de compartimenten lucht, sediment/bodem, water en biota. De natuur maakt zelf overvloedig chirale verbindingen maar maakt slechts zelf slechts één enantiomeer aan. Soms proeven we direct de niet natuurlijke enantiomeer.

Daarom had Alice in Spiegelland gelijk, haar poesje Kitty zou de gespiegelde suiker- en eiwitmolekulen niet kunnen verteren met behulp van ongespiegelde enzymen die immers niet op het spiegelbeeld van deze moleculen passen (New Scientist, 1992).

2.1. Definiëring van de Enantiomere Ratio (ER) en Enantiomere Overmaat (ee)

De enantiomere ratio "er" (kleine letters) wordt verkregen door piek integratie van NMR spectra of van chromatogrammen. Deze worden gedefinieerd als:

$$er = \frac{E_1}{E_2}$$

waarbij E_1 is de meest voorkomende enantiomeer. De er geeft niet aan welke enantiomeer nu het meest voorkomend is. In de milieuchemie wordt daarom de term ER (hoofdletters) gebruikt als de verhouding dextrorotary / levorotary enantiomeer (rechtsdraaiend/linksdraaiend, (+)/(-)).

$$ER = \frac{\text{(+)-enantiomeer}}{\text{(-)-enantiomeer}}$$

Als het teken van de specifieke rotatie van de enantiomeren niet bekend is dan wordt ER bepaald door de ratio van de eerste/tweede eluerende enantiomeer onder exacte gedefinieerde chromatografische condities. Er geldt $ER = 1$ voor een racemisch mengsel, $ER < 1$ als $E_1 < E_2$ en $ER > 1$ als $E_1 > E_2$. De ER is een directe maat voor de kinetische verhouding k_{E1}/k_{E2} in enantioselectieve reacties zodat:

$$-\Delta(\Delta G) = -\Delta(\Delta H) + T \Delta(\Delta S) = RT \ln ER .$$

De enantiomere overmaat (ee) is gedefinieerd als de overmaat van één enantiomeer t.o.v. de andere.

$$ee = \frac{E_1 - E_2}{E_1 + E_2}$$

E_1 en E_2 zijn de hoeveelheden van de enantiomeren en E_1 is het belangrijkste enantiomeer. ee varieert van $ee=0$ van het racemische mengsel naar $ee=1$ voor puur E_1 . Vaak wordt het als percentage aangegeven. Enantiomere ratios (ER) en enantiomere overmaat (ee) kunnen naar elkaar omgezet worden door de vergelijkingen:

$$ER = \frac{(1 + ee)}{(1 - ee)}$$

en

$$ee = \frac{(ER - 1)}{(ER + 1)} .$$

3. De herkenning van chirale verbindingen in de natuur

3.1. Biota onderscheiden enantiomeren

Er zijn veel onderzoeken gedaan naar de concentraties van enantiomeren in het milieu (zie referenties). Er is echter nog geen algemene theorie opgesteld voor de gevonden enantiomeer verhoudingen in de milieucompartimenten waarin men meet. Dit is tot op heden moeilijk omdat enantiomeer milieuonderzoek een relatief jong onderzoeksgebied is. De meeste onderzoeken zijn gedaan na 1990. Dit heeft ondermeer te maken met de complexe, vaak lastige, chirale analyse. Door de toepassing van de hoge resolutie chirale gaschromatografie (HR-GC) kolommen kon er een scherpe scheiding gemaakt worden tussen enantiomeren zonder dat hiervoor een hoge concentratie enantiomeren nodig zijn.

De enantiomere afbraak/omzetting is bovendien complex. Men weet niet precies hoe dit metabolisme plaatsvindt. In feite wordt een racemisch mengsel aangeboden aan een "levende omgeving"; deze is van zelf chiraal. In deze levende massa vind chiraal transport en chirale omzetting plaats die uiteindelijk resulteren in een veranderende verhouding tussen het (+)- en (-)-enantiomeer. Waar en hoe deze verandering exact plaatsvinden is heel vaak onbekend. Door de verschillende onderzoekingen te combineren zijn er van verschillende stoffen enantiomere verhoudingen uit verschillende milieu compartimenten bekend.

Er zijn drie belangrijke factoren die bijdragen tot een veranderende samenstelling van de enantiomeren. Deze zijn: 1. complexiteit van het metabolisme, 2. specifiek membraan transport en 3. specifieke adaptatie processen.

In figuur 3.1. zijn deze grafisch samengevat te samen met de concentratie verhouding van de enantiomeren (ER = enantiomere ratio).

Elk (biologisch) compartiment kan een afwijking bewerkstelligen ten opzichte van de samenstelling van het technische mengsel (ER = 1). De hoogste theoretische afwijking van de ER vind men in het actieve centrum van de enzymen. Enzymen worden in de literatuur verantwoordelijk gehouden voor een enantioselectieve omzetting. Tussen deze uitersten, het technisch mengsel en de actieve centra van enzymen, ontstaan enantiomere verhoudingen die ten gunste zijn van het (+)-enantiomeer of ten gunste zijn van het (-)-enantiomeer. Het komt voor dat zeeën een ER hebben ten gunste van het (+)-enantiomeer van een verbinding maar dat een andere zee een ER heeft ten gunste van het (-)-enantiomeer. De verklaring vind men in een verschillend enzymstelsel in de betreffende wateren.

Hoe langer een stof in een biologisch compartiment blijft, bijvoorbeeld een lange verblijftijd in een compartiment, des te groter is de kans op een grotere afwijking van ER = 1. Een compartiment waarvan een verbinding snel verdwijnt of uitwisselt met een waarde dicht bij 1 (zie figuur 1) dan zal dat compartiment een x-waarde hebben in de buurt van 1 (kleine afwijking van 1). Dit zouden bijvoorbeeld species kunnen zijn die een stof snel uitwisselen met water (ER is ongeveer 1). Een voorbeeld hiervan kan een weekdier zijn met een polaire stof.

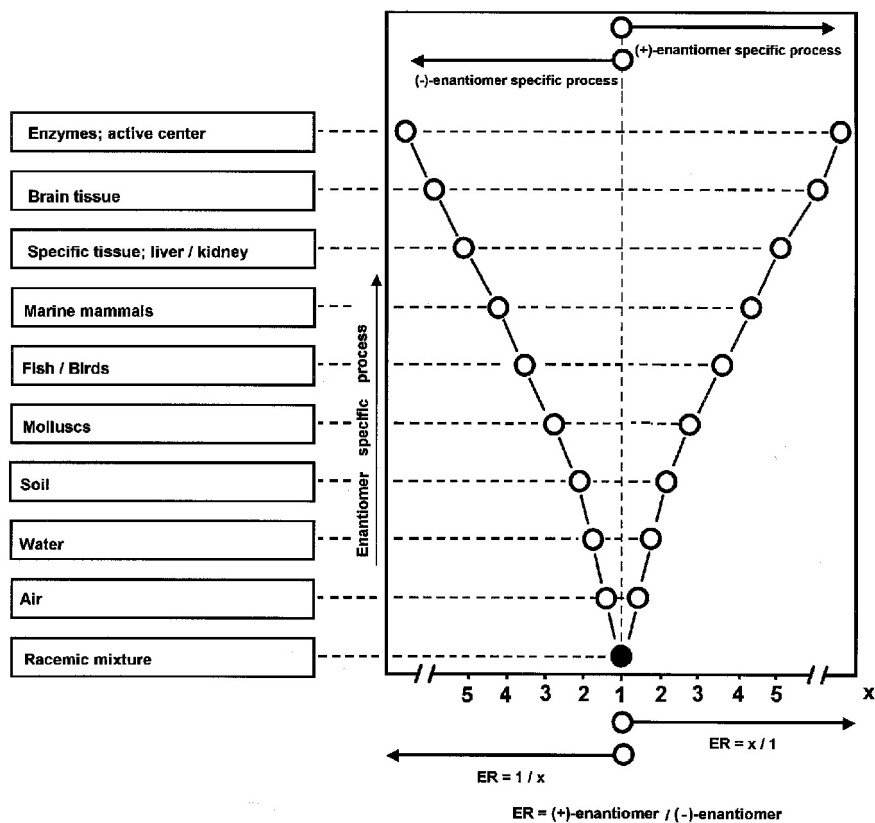
Organen, zoals de lever, die gespecialiseerd zijn in de omzetting en afbraak van stoffen wordt vaak een sterke afwijking van de ER ten opzicht van het technische mengsel (ER=1) gevonden. De ER van stoffen in levermonsters kunnen daarom behoorlijk afwijken van 1. In het spierweefsel van dezelfde species vindt men vaak een ER van een stof die vaak gerelateerd is aan het inname compartiment (bijvoorbeeld voedsel).

In hersen monsters vindt men vaak een zeer grote afwijking van ER = 1. De afwijkende concentratie van het (+)- en (-)-enantiomeer wordt toegeschreven aan de bloed/hersenen barrière. Bij zoogdieren wordt bloed en hersenen afgeschermd door een vlies (membraan) zodat bloed niet rechtstreeks in

contact staat met de hersenen. Omdat in de hersenen vaak geen hoge omzetting plaatsvindt wordt een hoge ER toegeschreven aan enantioselectief transport of afbraak door het membraan.

Dit enantioselectieve transport proces over een biologisch membraan is ook aangetoond in bacteriën (Zipper e.a., 1998).

Bacteriën kunnen zich aanpassen aan de samenstelling van het aangeboden enantiomeer. Ze worden chiraal geprogrammeerd door het aangeboden enantiomeer. De omschakeling naar het andere enantiomeer wordt vertraagd. In figuur 3.1. zijn de enantiomeer specifieke processen weergegeven. Dit schema is een hypothese voor een willekeurig racemische stof. Het racemische mengsel wordt onderworpen aan een biologische chirale omgeving. De afwijkingen van $ER = 1$ kunnen zowel naar links als naar rechts ten opzichte van $ER = 1$ ontstaan. Bovendien kan in een andere biologisch, en dus chiraal, compartiment een voorkeur ontstaan voor juist een ander enantiomeer. Dit is afhankelijk van de onderliggende chirale processen. In principe kan men de hoogste waarde van x verwachten (hoogste afwijking van $ER = 1$) als men juist op de lokatie in een enzym of membraan waar de chirale scheiding optreedt. Deze lokatie is het actieve centrum van een enzym. Doordat men de verhouding van de enantiomeren weet kan men dit als een tracer voor een water pakket of een lucht op een bepaalde lokatie. Hiermee kan een transportroute opgesteld worden voor bijvoorbeeld vluchtige verbindingen zoals chloordaan en aanverwante verbindingen.



Figuur 3.1. Schematisch model van de enantiomere ratio (ER) en de afwijkingen van 1 in verschillende milieu compartimenten. Uit: Hegeman en Laane, 1999.

De schematische hypothese in figuur 1 kan alleen bekrachtigd worden als men de geanalyseerde waarden in de grafiek kan plotten. Op dit moment zijn er voor een beperkt aantal stoffen enantiomeren geanalyseerd in een beperkt aantal compartimenten. Voor verschillende pesticiden die actief als technisch mengsel opgebracht zijn, zijn er weinig of geen chirale analyses uitgevoerd. Ook voor deze verbinding moet er op één of andere manier een verandering in de ER optreden want deze wordt immers in de chirale omgeving gebracht.

3.2. Enzymen; de chemische matrix voor enantiomeerspecifieke assemblage

Om de afbraak van een verbinding te kunnen begrijpen nemen we een kijk in de werking van de biologische katalysatoren: de enzymen. Enzymen regelen de chemie van levende systemen. Het zijn eiwitten met een asymmetrische opbouw. Enzymen die pesticiden afbreken passen op de pesticiden zoals een rechterhandschoen om de rechterhand past. Het spiegelbeeld van een pesticide past niet in datzelfde enzymen, net zo min als de linkerhand in de rechterhandschoen past.

Een enzyme werkt stereospecifiek. Het is te vergelijken met een drie-dimensionale matrix.

Een enzym werkt volgens drie niveaus van specificiteit: structuur specificiteit, regiospecificiteit en stereospecificiteit (Dugas en Penney, 1981). Een enzym moet eerst de chemische structuur herkennen. De katalyse gebeurt op een specifieke regio op het substraat en de stereospecificiteit

wordt door het enzym bepaald.

Enzymen katalyseren biochemische reacties stereospecifiek (Dugas en Penney, 1981). Daarom komen asymmetrische syntheses veel voor in de natuur. Een gevolg hiervan is dat natuurlijke reactieproducten optisch actief (asymmetrisch) zijn omdat de opbouw bepaald wordt in het drie-dimensionale actieve centra van enzymen. Enzymen zijn biologische katalysatoren. Er zijn vier typen factoren die betrokken zijn bij de katalytische activiteit van een enzym.

1). Een chemisch apparaat is noodzakelijk in het actieve centrum dat bindingen aan een substraat kan deformereren of polariseren om het substraat actiever te maken.

2). Een bindingsplaats dat het substraat kan immobiliseren in de correcte geometrie ten opzichte van andere reactieve groepen die participeren in de chemische transformatie.

3). Een goede oriëntatie van het substraat zodat elke stap in de reactie gepaard gaat met minimale translatie en rotatie over de bindingen in het substraat.

4). De fixatie van het substraat in het actieve centrum moet de activeringsenergie van het enzym-substraat complex in de overgangstoestand verlagen.

Deze factoren werken samen in de structuur van het actieve centrum.

Gezamenlijk versnellen ze de enzymatische reacties en werken ze als sterke (stereospecifieke) katalysatoren.

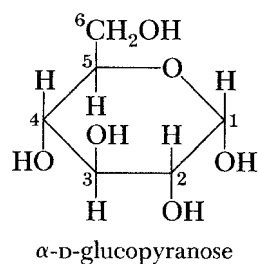
Een chemische stof kan in het actieve centrum niet te sterk gebonden worden anders zou er inhibitie plaats vinden. De stof zit dan te sterk gebonden zodat het enzym inactief wordt. Er is altijd sprake van een zwakkere binding in het actieve centrum zodat de stof er ook weer van af kan en het enzym systeem in werking kan blijven. Juist door de ruimtelijke oriëntatie heeft één enantiomeer de voorkeur. Een enzym werkt als een chemische matrijs; vasthouden in de juiste ruimtelijke ordening, assembleren, toevoegen of knippen en weer loslaten. Het volgende molecuul is dan aan de beurt.

4. ANALYSE VAN CHIRALE VERBINDINGEN.

4.1. Chiraal kolom materiaal: cyclodextrines

Chirale verbindingen worden vaak geanalyseerd door zogenaamde cyclodextrines.

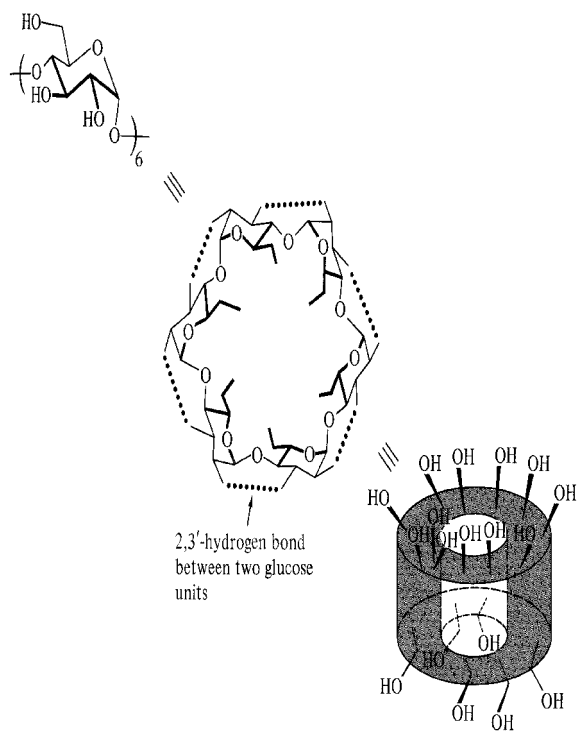
α -cyclodextrine wordt gemaakt uit zes natuurlijke D-glucose eenheden (α -D-glucopyranose) die op de 1 α -, en 4-positie een ring vormen; de zogenaamde cyclohexa-amylose. In figuur 4.1. staat de configuratie van α -D-glucopyranose.



Figuur 4.1. De posities van de substituenten van α -D-glucopyranose. Uit: Ternay, 1976.

De α -positie slaat op de configuratie van de OH-groep op het C1-koolstof atoom. De D betekent dat de suiker afkomstig is van D-glyceraldehyde. Voor details in de suikerchemie is het raadzaam om een organisch-chemisch leerboek raad te plegen (Ternay, 1976).

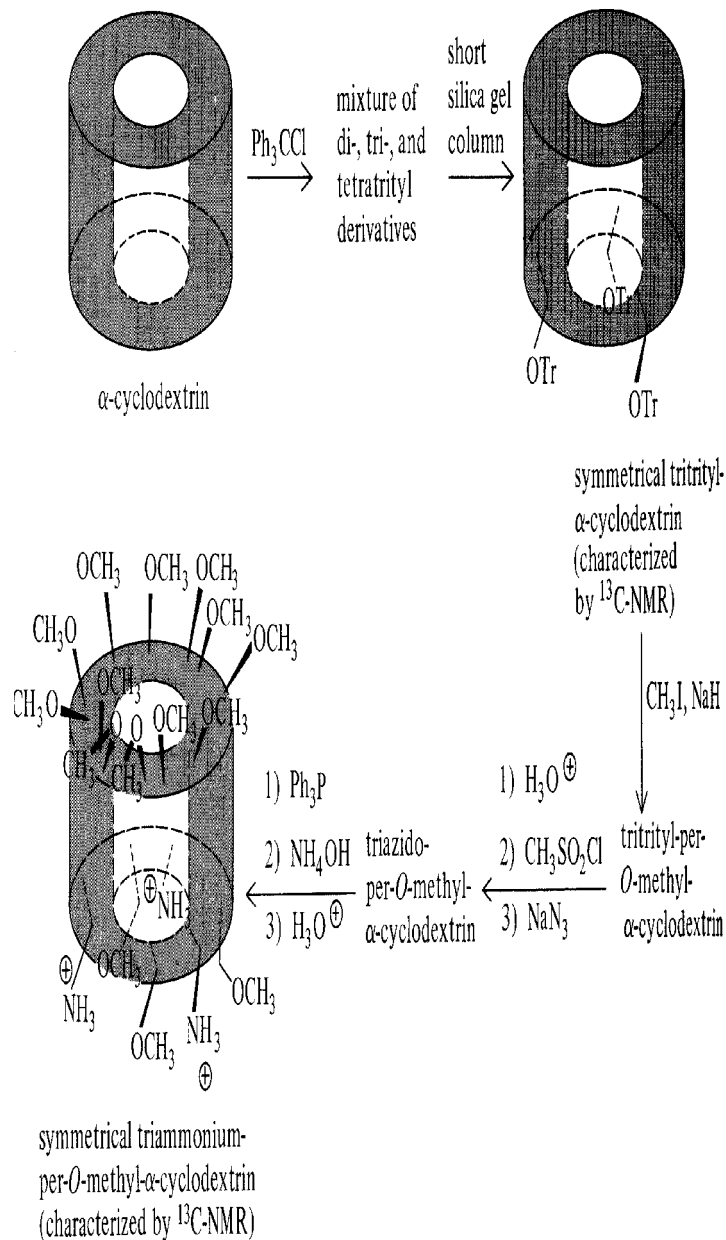
Door de koppeling van de D-glucose eenheden is een ring gevormd waarin de chirale eigenschappen ingebouwd zijn. Deze relatief inflexibele conus-vorm heeft twaalf hydroxyl-groepen van de C2- en C3-koolstof atomen van de glucose eenheid op de bodem (figuur 4.2.) en zes primaire hydroxylgroepen op de 6 posities. De buitenkant van de molecuul bevat hydrofiele hydroxy-groepen terwijl de kooi hoofdzakelijk C-H, C-C en C-O bindingen heeft met hydrofobe eigenschappen.



Figuur 4.2. De opbouw van α -cyclodextrine. Uit: Douglas en Penney, 1981.

α -Cyclodextrine kan onoplosbare inclusie complexen vormen met verschillende gast moleculen. Meestal wordt een complex gevormd tussen gast en gastheer molecuul in een verhouding van 1:1. Hydrofobe interacties zijn waarschijnlijk de drijvende kracht voor de vorming van een inclusie complex. Daarnaast kunnen waterstofbinding, Van der Waals en London dispersie krachten een rol spelen.

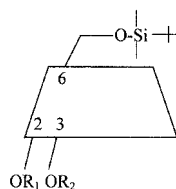
De eigenschappen van cyclodextrines kunnen verandert worden door de substituenten toe te voegen. In onderstaande figuur wordt symmetrisch triammoniumper-O-methyl- α -cyclodextrine gevormd.



Figuur 4.3. Representatie van symmetrisch triammonium-per-O-methyl- α -cyclodextrine complex met benzylfosfaat. De ammonium ionen hebben een plus-symbool. Uit: Dugas en Penney, 1981.

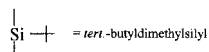
Triammoniumper-O-methyl- α -cyclodextrine gevormd kan bijvoorbeeld benzylfosfaat binden. In figuur 4.3. is dit ruimtelijk weergegeven. De apolaire benzyl-groep wordt ingesloten door de hydrofobe kooi terwijl de polaire fosfaat gebonden wordt door de drie ammoniumgroepen.

Ten behoeve van de enantiomeerscheiding wordt vaak cyclodextrine gebonden aan kolom materiaal. Kolommen met 7-D-glucose eenheden die gemodificeerd zijn blijken vaak sterke enantioselectieve eigenschappen te hebben. Een voorbeeld hiervan is heptakis-(6-O-tert.-butyldimethylsilyl-2,3-di-O-methyl)- β -cyclodextrine (β -TBDM). In figuur 4.4. staat deze afgebeeld.



β -TBDM: $R_1 = R_2 = \text{methyl}$.

β -BSCD: $R_1 = R_2 = \text{tert.-butyldimethylsilyl}$



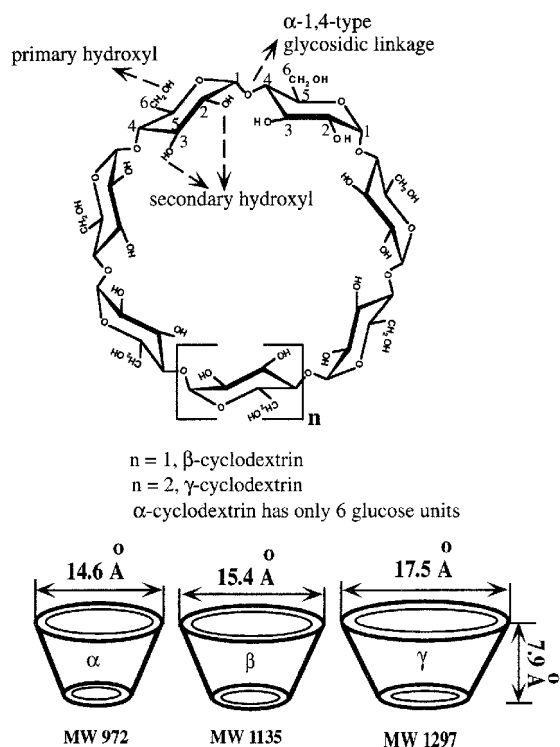
Figuur 4.4. Het substitutiepatroon van heptakis-(6-O-tert.-butyldimethylsilyl-2,3-di-O-methyl)- β -cyclodextrine (β -TBDM). Uit: Vetter en Schurig, 1999.

Het bleek dat een willekeurig gesubstitueerde kolom van β -TBDM waar de C6-positie niet volledig gesubstitueerd is betere enantioselectieve eigenschappen had dan zuivere β -TBDM (Vetter en Schurig, 1999). Vaak worden de cyclodextrines gebonden aan kolom materiaal voor GC of HPLC kolommen. Ook komt het voor dat cyclodextrines als elutievlloeistof gebruikt worden.

In een review artikel (Luong en Nguyen, 1997) over capillaire electroforese wordt het gebruik van gemodificeerde cyclodextrines als buffer-toevoeging samengevat.

De structuur en de bindingen van 3 cyclodextrines zijn weergegeven in figuur 4.5.

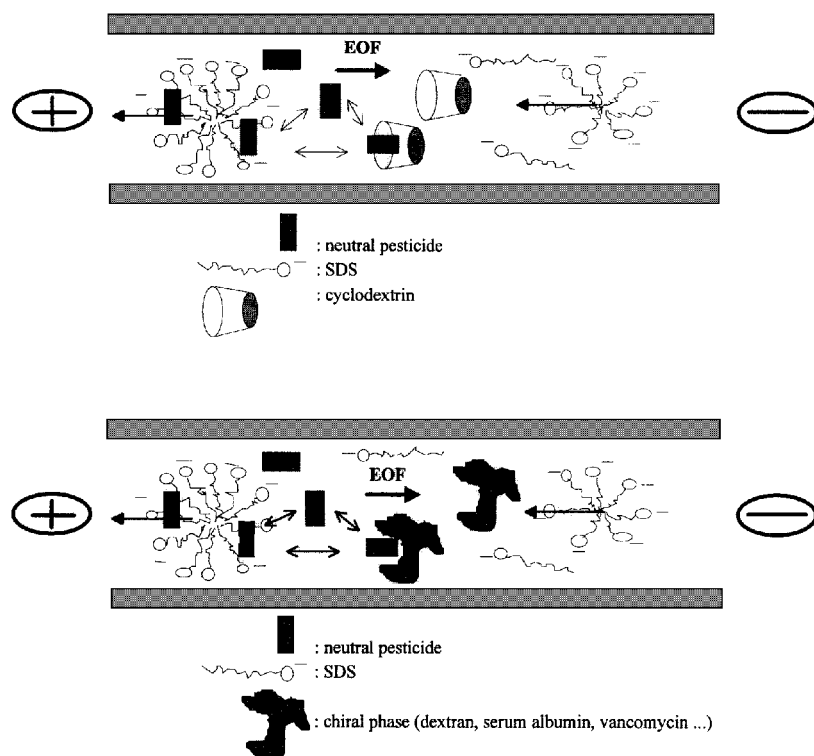
De conus-vormige cyclodextrines bestaan uit een hydrofiel exterieur en een hydrofobe interne holte. De hydroxyl groepen bezetten de rand van de conus en houden, zoals micellen, de cyclodextrines in een waterige oplossing. De relatief hydrofobe kooi is omgeven door waterstof atomen. De glucopyranose sub-eenheden worden met α -1,4-glycoside verbindingen onderling verbonden.



Figuur 4.5. Chemische structuur en schematisch model van cyclodextrines. α -CD ($n=0$), β -CD ($n=1$) en γ -CD ($n=2$). MW= moleculaire massa. Uit: Luong en Nguyen, 1997.

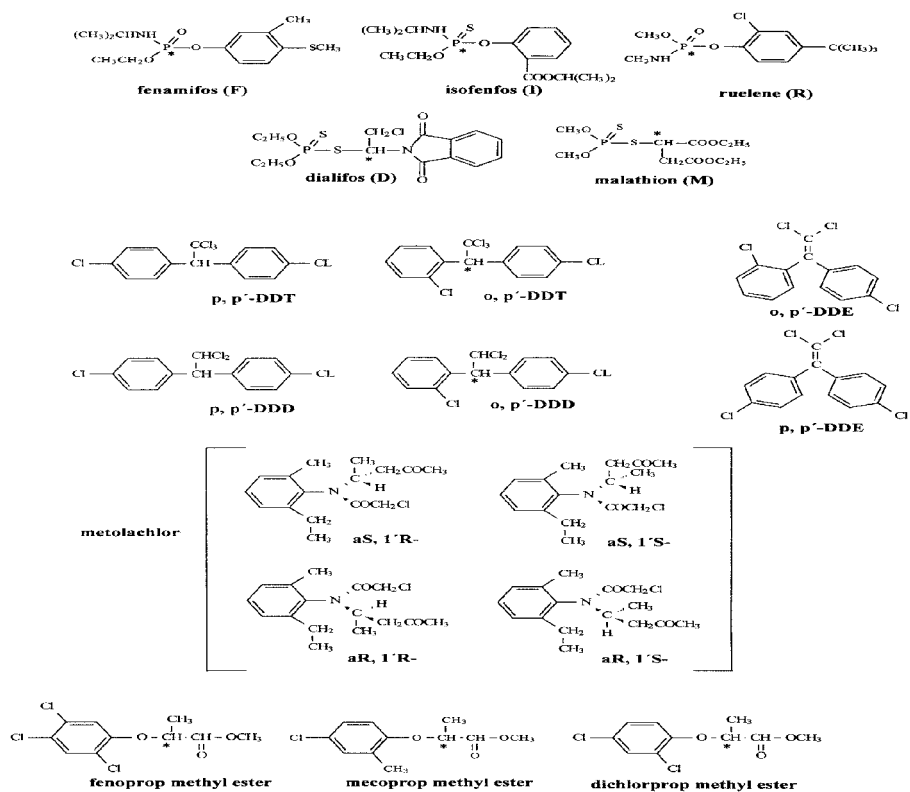
Uit kristallogisch onderzoek bleek dat alle glucose eenheden van de ring in de thermodynamisch voordelige 4C_1 -stoel conformatie zitten. De substituenten zitten in de equatoriale positie. Elke D-glucose eenheid in de CD-structuur bezit 5 chirale C-atomen en daarom is de CD-macrocycle chiraal. De 2,3- en 6-posities van de glucose-eenheid kunnen gesubstitueerd worden met een methyl-groep of andere substituenten. Het substitutiepatroon bepaalt gedeeltelijk de eigenschappen van het CD. Ook is het mogelijk om cationische CD's zoals amino-, alkylamino-, stikstof-, fosfor- en zwavelbevattende CD te maken. Tevens zijn circa 15 anionische CD's commercieel beschikbaar. Voor de chirale scheiding wordt vaak gebruik gemaakt van di- of tri-gemethyleerde- β -cyclodextrines. Naast de chirale toepassing zijn cyclodextrines bruikbaar voor de capillaire electroforese van chloorbenzenen, chloorfenolen en PAK's.

Schmitt e.a. (1997) onderzochten de scheiding van neutrale pesticiden en de enantiomeren met behulp van micel electrokinetische chromatografie (MEKC) met cyclodextrine als de chirale selector. Het principe van MEKC staat in onderstaande figuur 4.6.



Figuur 4.6. Reacties in het capillair gedurende de scheiding van pesticiden door de toevoeging van cyclodextrines en andere chirale fasen aan de MEKC scheidingsbuffer. Uit: Schmitt e.a., 1997.

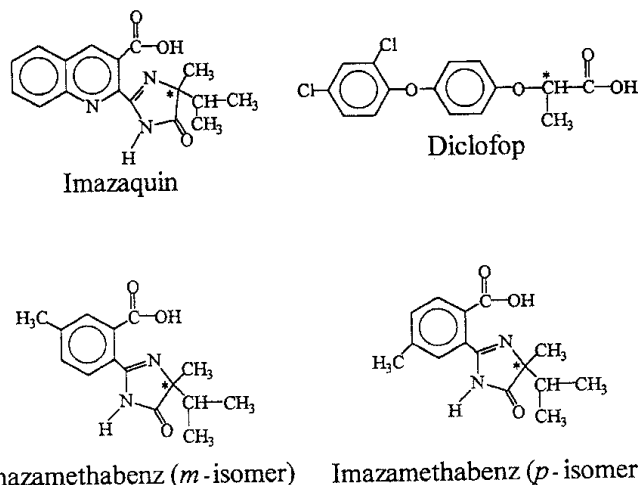
Onder invloed van een spanningsverschil (15-30 kV) worden geladen micellen (natriumdodecylsulfaat; SDS) met daaraan gebonden een hydrofobe verbinding vertraagd t.o.v. het eluens (boraat-SDS buffer). De mate van interactie tussen het gevormde micel en de hydrofobe verbinding bepaalt de retentietijd. De retentietijd wordt met behulp van UV-VIS gedetecteerd. Aan het eluens kunnen chirale selectoren toegevoegd worden. In dit geval zijn dat de cyclodextrines: α -cyclodextrine (cyclohexa-amylose), β -CD (cyclohepta-amylose), γ -CD (cycloocta-amylose), DM- β -CD (heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrine), TM- β -CD (heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrine) of andere chirale selectoren b.v. dextran, serum albumin of vancomycin. In de studie wordt getracht drie klassen van chirale pesticiden met behulp van MEKC te scheiden. De verbindingen zijn organofosfor verbindingen (rueleene, isofenfos, dialfor [of dialifos], fenamifos, malathion, fenoxylzuur methyl esters (fenoprop-, mecoprop-, dichloorprop-methyl esters), organochloride verbindingen (p,p'-DDT, p,p'-DDD, o,p'-DDT, o,p'-DDD, p,p'-DDE, o,p'-DDE) en een acetamide metolachloor. In figuur 4.7. zijn de verbindingen weergegeven. Metolachloor bestaat uit 4 stereoisomeren als gevolg van axiale chiraliteit (rotatie restrictie over de fenylstikstof verbindingen in combinatie met asymmetrische substitutie van de fenylring en C-chiraliteit.



Figuur 4.7. Pesticiden die geanalyseerd worden door CD-MEKC. Uit: Schmitt e.a., 1997.

De scheiding van de verbindingen werd getest op de niet-chirale verbindingen en op de enantiomeren van de chirale racematen. De enantiomeren van malathion, ruelene, en dialifos werden gescheiden door hydroxypropyl- β -CD, β -CD en/of γ -CD. De enantiomeren van isofenfos en fenamifos konden niet gescheiden worden. De drie fenoxyzuurmethylesters en de enantiomeren van fenoprop methylester konden gescheiden worden m.b.v. γ -CD en methanol; maar de enantiomeren van mecoprop en dichloorprop methyl esters konden niet gescheiden worden. γ -CD en acetonitril zorgde voor een goede scheiding van de DDT congenen en de enantiomeren van o,p'-DDT en o,p'-DDD. Van de vier stereoisomeren van metolachloor konden er drie gescheiden worden door γ -CD en methanol. De enantiomere scheiding door CD-MEKC is vaak beter en eenvoudiger dan voor HRGC of HPLC. Maar het is minder gevoelig omdat vaak ppm niveaus vereist zijn in plaats van ppb niveaus in routine toepassingen zoals HRGC en HPLC.

Penmetsa e.a. (1997) onderzochten de enantiomere en isomere scheiding van drie herbiciden (imazaquin, diclofop en imazamethabenz) met behulp van capillaire zone electroforese (CZE) en verschillende cyclodextrines als chirale selector. In figuur 4.8. zijn de verbindingen weergegeven met een asterisk als het chirale centrum (C-atoom).



Figuur 1. Structuur van de herbiciden. Het chirale centrum wordt aangegeven met een asterisk (*). Uit: Penmetsa e.a., 1997.

Imazamethabenz is een 3:2 mengsel van para- en meta-isomeren. De enantiomeren van imazaquin en diclofop konden gescheiden worden. Van imazamethabenz konden alleen de isomere para- en meta-verbinding gescheiden worden maar niet de enantiomeren. Van de imidazolinonen (productnaam: Assert) is het bekend dat alleen het R-enantiomeer als herbicide actief is. Het R-enantiomeer is ongeveer acht maal actiever dan het S-enantiomeer. De resolutie is afhankelijk van de pH, het type cyclodextrine en van de concentratie cyclodextrinen. Door het toepassen van gemengde cyclodextrines in één analyse-stap konden de drie herbicides en hun enantiomeren in één run van 17 minuten gescheiden worden. De run-tijd kon verkort worden tot circa 6 minuten om voldoende grote scheiding te krijgen. Bij een 17 minuten run zijn de analyse condities: capillaire kolom; 57 cm x 50 µm interne diameter; injectie (2s=2,4 nl) 50 mM natriumacetaat + 10 mM Heptakis(2,6-di-O-methyl)-β-cyclodextrine + 10 mM heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)-β-cyclodextrine, pH 3,6; 25 kV (35 µA); UV-detector 214 nm absorptie.

4.2. Thermodynamica van enantiomeer scheiding

In de gaschromatografie wordt de enantioselectiviteit bepaald door de thermodynamica en wordt gedefinieerd door de vrije enthalpie (Gibbs energie) verschil $-\Delta_{R,S}(\Delta G)$ van de diastereomere associaties tussen de cyclodextrine selector R' en de R- en S-enantiomeren van de racemische selectant (Vetter en Schurig, 1997). Voor temperatuur afhankelijk onderzoek geldt de Gibbs-Helmholtz vergelijking:

$$-\Delta_{R,S}(\Delta G) = -\Delta_{R,S}(\Delta H) + T \Delta_{R,S}(\Delta S) = RT \ln K_R / K_S$$

waarin K_R en K_S de vormingsconstanten zijn van de diastereomere associatie tussen de selector R' en de R- en S-enantiomeren waarbij $K_R > K_S$. De vergelijking kan herschreven worden als een Van 't Hoff vergelijking:

$$\frac{-\Delta_{R,S} \Delta G}{T} = \frac{-\Delta_{R,S}(\Delta H)}{T} + \Delta_{R,S}(\Delta S) = R \ln K_R / K_S$$

Voor de associatie processen compenseren $-\Delta_{R,S}(\Delta H)$ en $-\Delta_{R,S}(\Delta S)$ elkaar om $\Delta_{R,S}(\Delta G)$ te verkrijgen. Daarom bestaat er een iso-enantioselectieve temperatuur T_{iso} waarin de enantiomeren niet gescheiden kunnen worden. Hiervoor geldt:

$T_{iso} = -\Delta_{R,S}(\Delta H) / -\Delta_{R,S}(\Delta S)$ als $-\Delta_{R,S}(\Delta G) = 0$. Onder T_{iso} wordt de enantiomeer scheiding enthalpie-gecontroleerd en het R enantiomeer elueert na het S-enantiomeer. Boven T_{iso} is de enantiomeer scheiding entropie-gecontroleerd en het S-enantiomeer elueert na het R-enantiomeer. Dit noemt men piekinversie of omkering van de elutie volgorde. In de praktijk zijn de meeste enantiomeer scheidingen enthalpie-gecontroleerd. Daarom is het belangrijk de temperatuur van de metingen te verlagen tot een acceptabel niveau om de scheidingsfactor α te vergroten.

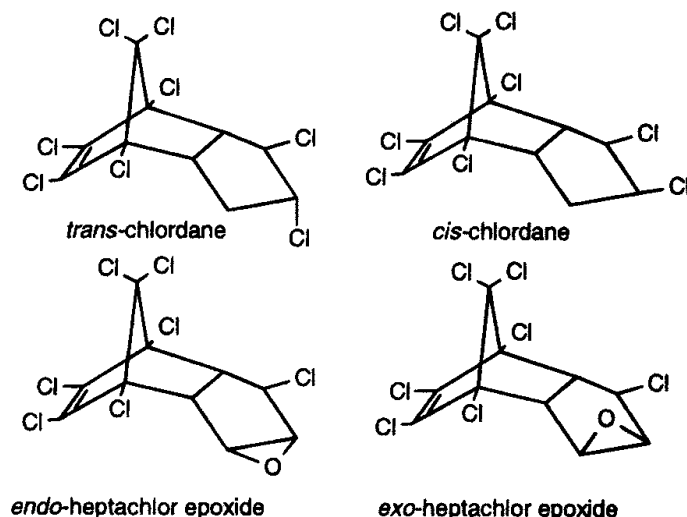
5. Enantiomeren in milieu compartimenten

In dit hoofdstuk volgen enkele hoogtepunten uit de publicaties van enantiomeer onderzoek. De studies zijn per milieu compartiment samengevoegd in vier hoofdstukken: lucht, water, sediment/bodem en biota.

5.1. Enantiomeren in lucht

Bidleman e.a. (1998) onderzochten de chirale pesticide heptachloor (1,4,5,6,7,8,8-heptachloro-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-methano-indene). Deze verbinding kan een fotolyse ondergaan welke een racemisch mengsel levert van heptachloor-exo-epoxide (HEPX) en heptachloor. In biologische systemen en bodems kan het echter gemetaboliseerd worden naar niet-racemisch HEPX. Luchtmonsters (van HEPX) uit het zuiden van de VS en uit het Ontario Meer en Superior Meer waren niet-racemisch en waren verrijkt in het (+)-enantiomeer. De enantiomere ratio's [ER = oppervlakte in het chromatogram van (+)-HEPX / (-) HEPX] varieerden van 1.51 tot 2.02 . De ER-waarden van HEPX kwamen overeen met die van landbouwgronden. Luchtmonsters van heptachloor waren racemisch met een ER van 0.98 - 1.02 . Hieruit werd geconcludeerd dat de bron van HEPX in de lucht niet het gevolg was van fotolyse maar van het metabolisme van heptachloor in de bodem gevolgd door vervluchtiging van HEPX. Door chirale analyse kan de afbraak route van heptachloor in het milieu gevolgd worden.

Ulrich en Hites (1998) onderzochten de enantiomere ratios (ER) van trans-chloordaane, cis-chloordaan, endo-heptachloorepoxide en exo-heptachloorepoxide in luchtmonsters nabij de grote meren (V.S.: Superior Meer, Michiganmeer, Eriemeer). De molecuul structuren van één enantiomeer van de chirale verbindingen staan in figuur 5.1.



Figuur 5.1. Molecuulstructuur van chloordaan gerelateerde verbindingen. Elke verbindingen bestaan uit twee enantiomeren waarvan er één getekend is. Uit: Ulrich en Hites, 1998.

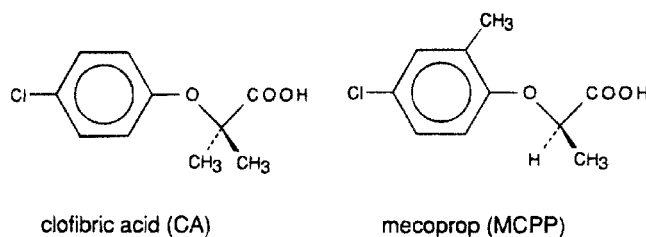
De luchtmonsters werden uit een volume van 800 m³ lucht genomen en geconcentreerd op XAD-2 hars. Deze werd opgewerkt en geanalyseerd op een GC met permethyleerd α - en γ -cyclodextrine als chirale kolom. De analyse vond plaats met ECD en negatieve ionisatie massa spectroscopie. Deze techniek leverde genoeg selectiviteit en gevoeligheid op voor de lage concentraties in milieumonsters. De enantiomere ratios (ER= (+)/(-)-enantiomeren) geven

een inzicht in het lot van deze verbindingen in het milieu en het degradatiegedrag van de enantiomeren. In het algemeen was er weinig verschil in ER tussen de verschillende lokaties maar er was wel verschil tussen de verschillende verbindingen. Voor cis-chloordaan werd een ER gevonden van $1,05 \pm 0,02$. Dit betekent dat deze bijna racemisch is (analyse fout in de meeste ER's van het racemische mengsel is circa 3 %). De ER van het Eriemeer was circa $1,12 \pm 0,03$. Dit verschil kan verklaard worden door een hogere temperatuur en daardoor een hogere biologische activiteit in het meer. De ER voor trans-chloordaan is significant lager dan het racemische uitgangsmateriaal in alle vier meren. Het Eriemeer heeft de hoogste ER (ER= 0.93 ± 0.01) en het Michiganmeer heeft de laagste (ER= 0.83 ± 0.02). Het (-)-enantiomeer van trans-chloordaan is verrijkt in de luchtmonsters maar er was geen verrijking gevonden van het cis-chloordaan in deze monsters (met uitzondering van het Eriemeer). Een verklaring voor de verschillende ER's tussen cis- en trans- chloordaan is dat de enantiomeren verschillend gedegradeerd worden in het milieu. Experimenten met dierproeven bevestigen dit fenomeen. Voor exo-heptachloorepoxide werd een gemiddelde ER gevonden van 1.99 . Het is duidelijk verrijkt in het (+)-enantiomeer. Exo-heptachloor epoxide is een metabool van heptachloor, de hoge ER is het gevolg van enzymatische processen en niet alleen van fotolyse.

Malaiyandi en Shak (1984) onderzochten de isomerisatie (niet enantiomerisatie) van γ -hexachloorcyclohexaan naar het α -isomeer. Dit proces vindt plaats d.m.v. fotolyse met direct zonlicht en in aanwezigheid van ijzerzouten. De andere HCH-isomeren bleken omgezet te worden in het α -isomeer. De fotochemische stabiliteitsvolgorde is: β -HCH < γ -HCH < δ -HCH < α -HCH. Het α -isomeer is het fotochemische stabiele isomeer. Dit verklaart de hoge persistentie van α -HCH in de atmosfeer en de hoge concentraties van het α -isomeer ten opzichte van γ -HCH in regenwater.

5.2. Enantiomeren in water

Buser e.a. (1998) onderzochten de concentratie van het medicijn Clofibric zuur (CA: 2-[4-chloorfenoxy]-2-methylpropionzuur) en het verwante herbicide Mecoprop (MCP: 2-[4-chloor-2-methylfenoxy]propionzuur) in het water van de Noordzee en enkele Zwitserse meren. De structuurformules van de verbindingen zijn zichtbaar in figuur 5.2.

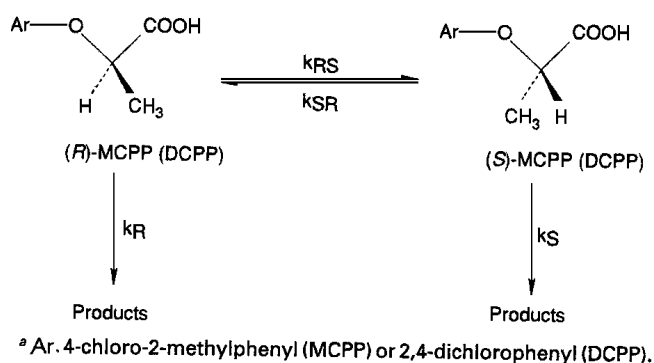


Figuur 5.2. Structuurformule van Clofibric zuur (CA) en het verwante (R) enantiomeer van mecoprop (MCP). Uit: Buser e.a, 1998.

De concentraties van CA vertoonden het zelfde gedrag als α en γ -hexachloorcyclohexaan; dat wil zeggen hoge concentraties van 1-2 ng/L. CA bleek een grote mobiliteit te hebben en zeer persistent te zijn. De concentratie van Mecoprop bleek duidelijk af te nemen van het meer (input) naar de Noordzee. Dit kan het gevolg zijn van een verdunning van rivierwater met Noordzee water en/of een combinatie van verdunning en afbraak. Door een chirale scheiding te maken bleek dat het R-enantiomeer van MCP, dat aangeduid wordt als Mecoprop-P, in de bodem gedeeltelijk kan

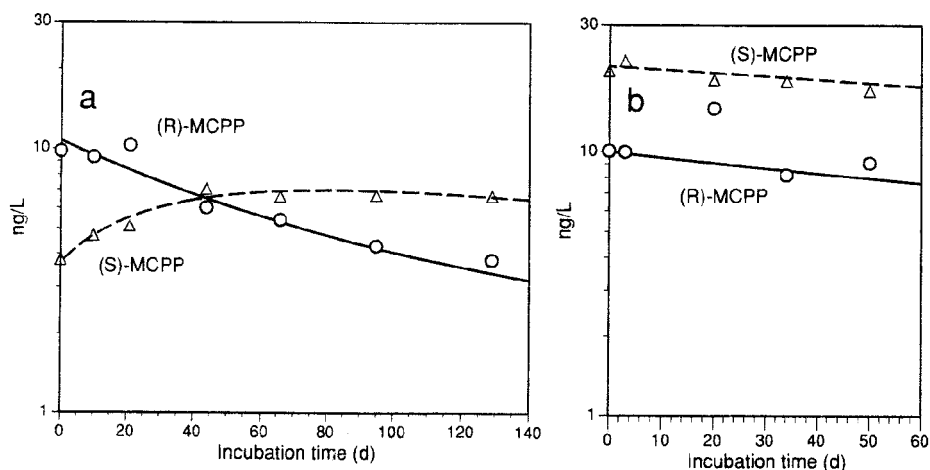
enantiomeriseren naar het S-enantiomeer. In Zwitserland is alleen het R-enantiomeer geregistreerd als herbicide. De enantiomere ratio (ER = R-MCPP-Me / S-MCPP-Me; uitgedrukt als de oppervlakte in het chromatogram van de gemethyleerde ester) was in het Zwitserse meerwater ER = 2.5 en in de Noordzee bedroeg deze ER ongeveer 0.9. De enantiomere scheiding werd uitgevoerd met behulp van hoge resolutie gaschromatografie met een enantioselectieve kolom OV1701-TBDM HRGC (TBDM, heptakis-[2,3-dimethyl-6-tert-butyldimethylsilyl]- β -cyclodextrin) gevolgd door massa-spectroscopie in combinatie met SRM (selected reaction monitoring).

Buser en Müller (1998) bestudeerden o.a. de enantiomerisatie en degradatie van (R)- en (S)-Mecoprop (MCPP: 2-[4-chloor-2-methylfenoxy]propionzuur) en van (R)- en (S)-DCPP (2,4-dichloorfenoxypropionzuur). In Zwitserse meren bleken enantiomere ratio's (ER; ER = p_R / p_S waarbij p_R en p_S de piek oppervlakten zijn van de chirale scheiding van het (R)- en (S)-enantiomeren) voor te komen van ER < 1 voor zowel MCPP als DCPP. Dit duidt erop dat de concentratie (S)-enantiomeer groter is dan het (R)-enantiomeer. Laboratorium incubatie experimenten met MCPP en DCPP in zowel water uit de rivier en als in water uit het meer lieten een enantiomerisatie zien van beide enantiomeren. In figuur 5.3. wordt een kinetisch schema voorgesteld voor de enantiomerisatie en de degradatie van (R)- en (S)-2-fenoxypropionzuren (MCPP en DCPP).



Figuur 5.3. Algemeen reactieschema met enantiomerisatie (k_{RS} , k_{SR}) en degradatiesnelheidsconstantes (k_R en k_S) voor chirale 2-fenoxypropionzuren. Uit: Buser en Müller, 1998.

In kinetische incubatie studies werden de concentratie van de (R)- en (S)-enantiomeren gevolgd gedurende circa 100 dagen. In figuur 5.4. is de enantiomerisatie en de degradatie te zien gedurende 140 respectievelijk 60 dagen. De snelheden konden met het model afgeleid worden uit de experimentele gegevens.



Figuur 5.4. Degradatie van MCPP in natuurlijk water onder laboratorium condities. a. Degradatie van (R)-MCPP in water uit het Sempachermeer en de vorming van (S)-MCPP. b. Degradatie van (R)- en (S)-MCPP in water uit de rivier Aabach. De curves zijn modelberekeningen. Uit: Buser en Müller, 1998.

In figuur 5.4.a is te zien dat de concentratie (S)-enantiomeer toeneemt en dat deze de concentratie (R)-MCPP kruist tot een maximum. Er werden model enantiomerisatie afbraaksnelheidsconstantes gevonden voor MCPP; $k_{RS} = 30 \cdot 10^{-3} \text{ d}^{-1}$, $k_{SR} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ d}^{-1}$ en $K_R = 1 \cdot 10^{-3}$ en $K_S = 8 \cdot 10^{-3}$. Voor DCPD; $k_{RS} = 34 \cdot 10^{-3} \text{ d}^{-1}$, $k_{SR} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ d}^{-1}$ en $K_R = 2,5 \cdot 10^{-3}$ en $K_S = 6,5 \cdot 10^{-3}$.

Opmerking: dit betekent dat de enantiomerisatiesnelheidsconstantes een verhouding hebben van: MCPP: $k_{RS}:k_{SR} = 10$ en voor DCPD $k_{RS}:k_{SR}$ ongeveer 11. De relatieve afbraaksnelheidsconstantes voor MCPP: $K_R:K_S = 1:8$ en voor DCPD = $1:2,6$.

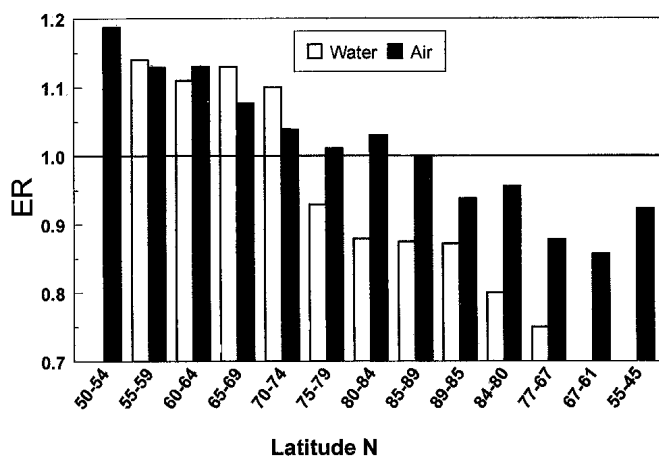
Buser en Müller (1998) concludeerden daarom dat de degradatie van MCPP (en DCPD) in deze wateren het beste beschreven kan worden door enantiomerisatie van het (R)-enantiomeer naar het (S)-enantiomeer. Deze enantiomerisatie naar het (S)-enantiomeer, gevolgd door de degradatie van het (S)-enantiomeer, kan foutief aangezien worden voor een versnelde degradatie van het (R)-enantiomeer (Ludwig e.a., 1992).

Een hoge concentratie van het (S)-enantiomeer ten opzichte van het (R)-enantiomeer in die studies waar alleen het (R)-enantiomeer toegevoegd is kan alleen toegeschreven worden aan biologisch gemedieerde reacties. Dit betekent dat enantioselectieve (asymmetrische) reacties optreden in de biologische processen. In chemisch symmetrische enantiomerisatie reacties kan de concentratie van het (S)-enantiomeer nooit boven die van het concentratie (R)-enantiomeer komen.

Faller e.a. (1991) waren de eersten die watermonsters uit de Noordzee onderzochten op de enantiomeren van α -HCH. Dit werd uitgevoerd door middel van gaschromatografie met een capillaire kolom die gecoat was met chiraal materiaal (heptakis(3-O-butyl-2,6-di-O-pentyl)- β -cyclodextrine). De enantiomere verhouding tussen (+)- α -HCH en (-)- α -HCH en de concentratie γ -HCH (Lindaan) werd bepaald. Het racemische mengsel welke toegepast wordt heeft een gemiddelde verhouding van $[(+)\text{-}\alpha\text{-HCH} / (-)\text{-}\alpha\text{-HCH}] = 1,06 \pm 0,06$ terwijl het Noordzee monster (nabij Skagerrak) een gemiddelde verhouding had van $0,88 \pm 0,03$. De concentratie (-)- α -HCH is hoger dan de concentratie (+)- α -HCH. Blijkbaar zijn de enzymatische processen verantwoordelijk voor de enantiomere overmaat in de Noordzee monsters. Hierdoor kan een onderscheid gemaakt worden in enzymatische (enantioselectief) en niet-

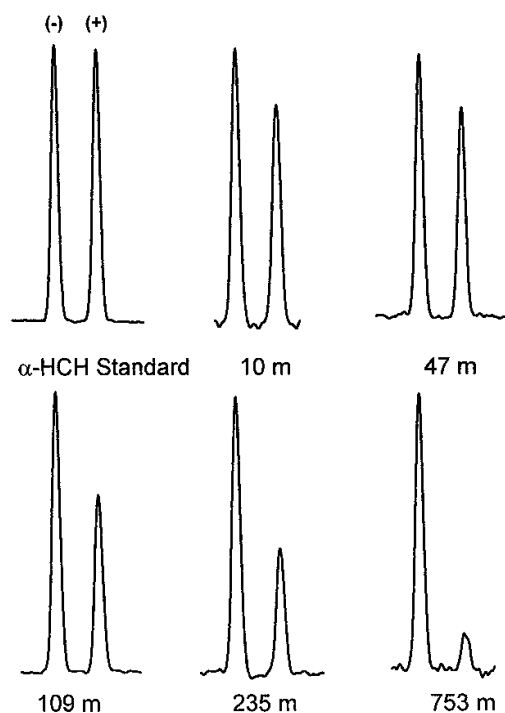
enzymatische (niet-enantioselectief) processen in marine en terrestrische ecosystemen.

Jantunen en Bidleman (1996; 1997) onderzochten de lucht-water uitwisseling van hexachloorcyclohexaan (HCHs) waaronder de enantiomeren van α -HCH in de Noordpool regio. In een tweetal monstertochten, waarvan één over de Noordpool van de Beringstraat naar de Groenlandse zee en één in de Chukchi Zee, werden lucht en water concentraties bepaald van α -HCH (enantiomeren) en γ -HCH. De waterconcentraties van HCHs werden in de verticaal genomen tot een diepte van 4287 meter. De niet-chirale abiotische afbraak van α -HCH bestaat uit hydrolyse en fotolyse. De chirale discriminatie processen bestaan uit microbiële afbraak, enzymatische selectiviteit in hogere organismen en selectief transport over biologische membranen. Jantunen en Bidleman (1996) gebruikten de concentratie verhouding van α -HCH/ γ -HCH om het transport tussen technisch HCH ten opzichte van linaan aan te geven. Deze verhouding (technisch mengsel α -HCH)/ γ -HCH ligt tussen 4 en 7. De enantiomere verhouding van α -HCH is een maat voor de chirale processen. De ER in lucht en water wordt gegeven in figuur 5.5. De monsters van het Canadese Basin en de Groenlandse Zee hebben een lagere (+)- α -HCH concentratie. Dit resulteert in een ER < 1,00. Voor de Bering en Chukchi Zee geldt een omgekeerde ER namelijk ER > 1,00. Hier wordt selectief het (-)- α -HCH preferent afgebroken. Als reden voor deze omgekeerde enantioselectiviteit worden verschillende biodegradatie patronen gegeven voor de verschillende zeeën. Het verschil in ER van verschillende stations en diepten reflecteert de fysische structuur en de microbiële afbraak in de waterkolom.



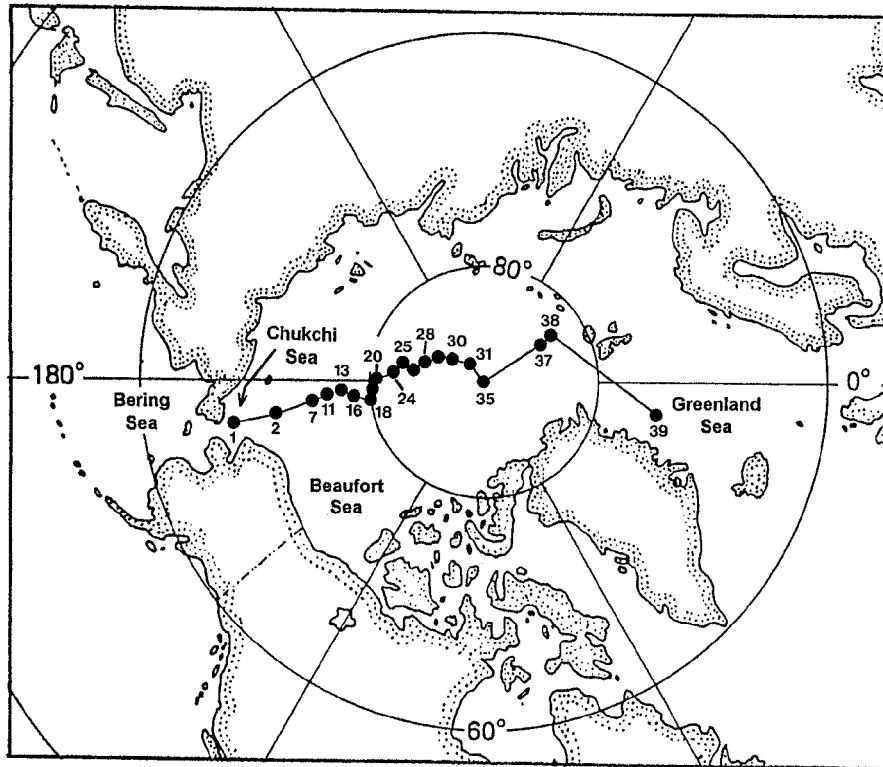
Figuur 5.5. Enantiomere ratios (ER) van α -HCH in lucht en watermonsters bij verschillende breedte graden. Monster lokaties van Bering Zee (linker zijde) naar Groenlandse Zee (rechter zijde). Uit: Jantunen en Bidleman, 1996; 1997.

Er is ook verschil in ER in de diepte. Figuur 5.6. laat een afname van de ER zien in de waterkolom bij toenemende diepte. Er wordt aangenomen dat de α -HCH bij het oppervlakte water goed uitwisselt met de lucht en in de diepere lagen niet. Hierdoor ontstaan verschillende ER's ten opzichte van de waterlagen. Er is een grotere enantioselectiviteit op grotere diepten. Op deze manier kan de ER dienst doen als tracer voor de lucht-water uitwisseling. Vaak is de verhouding beter te bepalen dan de concentratie.



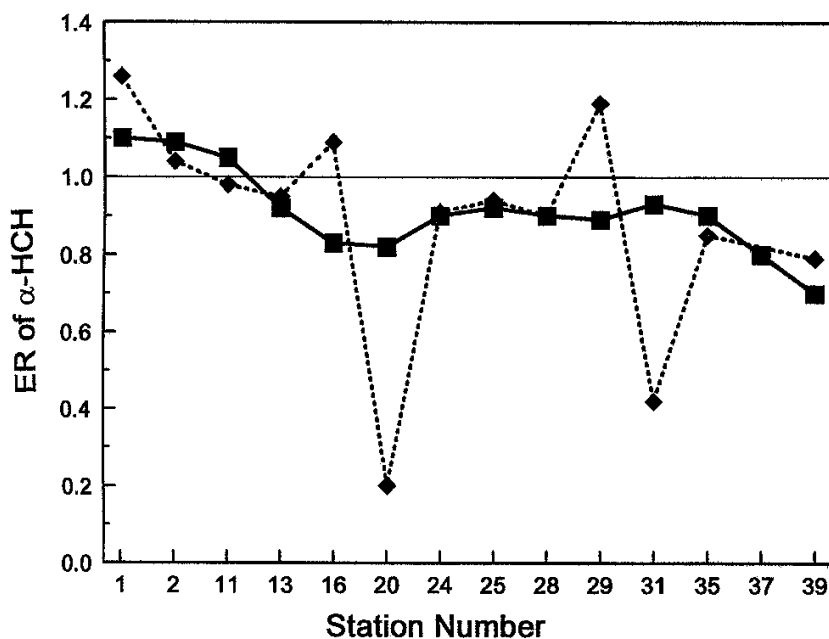
Figuur 5.6. Chromatogram van de enantiomeren van α -HCH op verschillende diepten op station: AOS37 (10 m) en AOS38 (rest). Diepte en ER: 10 m ER=0,80 ; 47 m ER=0,79 ; 109 m ER=0,60; 235 m ER=0,43 ; 762 m ER=0,13. Uit: Jantunen en Bidleman, 1996; 1997.

Jantunen en Bidleman (1998) onderzochten onder andere enantiomeren van α -hexachloorcyclohexaan (α -HCH), cis- en trans-chloordaan (CC en TC) en heptachloor exo-epoxide (HEPX) in Arctisch oceaanwater. Tijdens de AOS-94 tocht werd een dwarsdoorsnede over de Noordpool gevaren van de Bering Zee via de Chukchi Zee naar de Groenlandse Zee. Hierbij werden watermonsters en particulier materiaal monsters genomen. De organochloride pesticiden werden opgewerkt voor GC-MS (negatieve ion bepaling). Voor de enantiomeerscheiding werden twee chirale kolommen gebruikt op basis van β -cyclodextrines (20 % permethylated β -cyclodextrine in polydimethylsiloxaan; β -DEX en 20 % tert-butyl dimethylsilylated β -cyclodextrine in OV-1701; BGB-172). Voor α -HCH werden de enantiomere ratios (ER=oppervlakte (+)-enantiomeer / (-)-enantiomeer) van de particuliere- en opgeloste fase bepaald. De ER in oppervlakte water in de Bering en Chukchi Zee waren groter dan 1 op het poolgebied en in de Groenlandse Zee wat duidt op een afname van het (+)- α -HCH ten opzichte van het (-)- α -HCH. De ER < 1 in de Groenlandse Zee zijn in overeenstemming met de waarden die Faller e.a. (1991) vond in de Noordzee. Het verschil tussen de beide zeeën (Bering Zee > 1 en Groenland Zee < 1) wordt verklaart door de verschillende microbiële populaties in de verschillende regionen. In figuur 5.7. staan de monsterlokaties van de tocht over de Noordpool.



Figuur 5.7. Monsterlokaties van de Noordpool tocht AOS-94. Uit: Jantunen en Bidleman, 1998.

De ER's van α -HCH van de corresponderende monsterlokaties zijn in figuur 5.8. gegeven. De ER's van de meeste monsterlokaties in de particuliere fase hebben een gelijke waarde als de opgeloste fase. Op enkele lokaties is de ER in de particuliere fase enantioselectieve dan de opgeloste fase. Blijkbaar is de enantioselectieve degradatie tussen particulier- en opgeloste fase ontkoppeld. Wellicht zijn er verschillende microbiële populaties aanwezig.



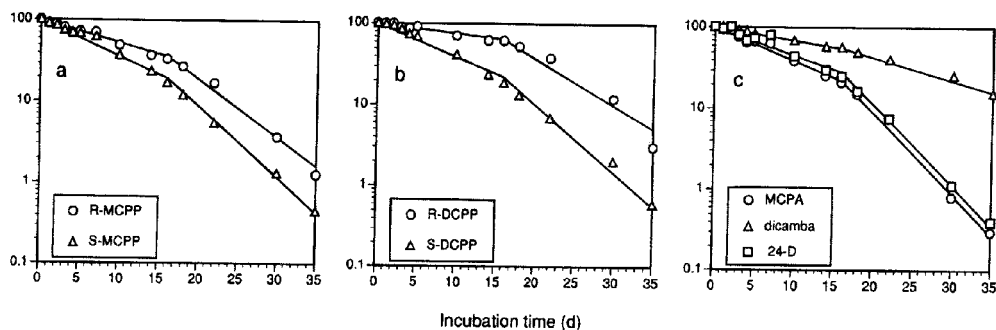
Figuur 5.8. Enantiomere ratios (ERs) van α -HCH in opgeloste (-) en particulaire fase (---). Uit: Jantunen en Bidleman, 1998.

Metingen in de verticaal resulteerden in een grotere enantioselectiviteit met de diepte. Voor de HEPX werden enantiomere verhoudingen gevonden van 1,56 - 1,76. HEPX is een metaboliet van heptachloor. Waarschijnlijk wordt preferent het (+)-enantiomeer gevormd in plaats van de afbraak van het (-)-enantiomeer. Het is mogelijk dat atmosferisch transport het niet-racemische HEPX levert. Lucht enantiomere verhoudingen van HEPX zijn ongeveer 1,4 - 2,0 in de zuidelijke VS en de grote meren regionen. Deze kunnen afkomstig zijn uit vervluchtiging vanuit landbouw gronden (Bidleman e.a., 1998). De enantiomere verhoudingen van chlordaan verbindingen TC en CC zijn ongeveer één (racemisch) met een ER van 0,94 - 1,06 in de opgeloste fase. De afwijkingen van het racemische mengsel van de chirale verbindingen wordt verklaard door: enantiomeer selectieve opname en degradatie of door verschillende doordringing van enantiomeren door biomembranen. Soms treedt er een omkering van enantioselectiviteit tussen prooidier en predator op. Ook de gezondheidstoestand kan een factor zijn het metabolisme van chirale pesticiden. De enantiomere samenstelling van organische verbinding residuen in arctisch water representeert de opname en omzetting in de lagere voedselketen.

5.3. Enantiomeren in sediment/bodem

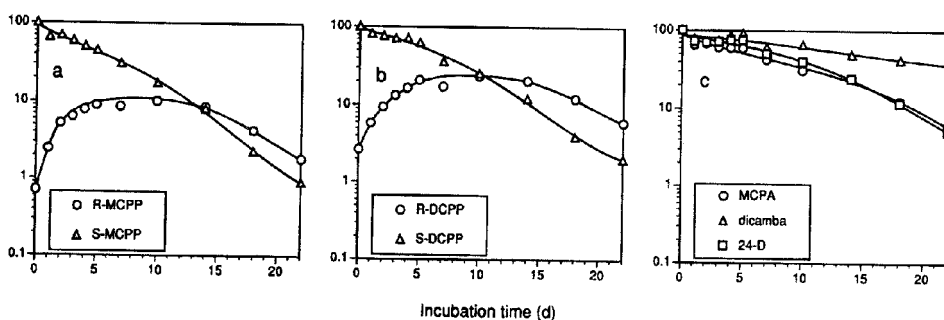
Müller en Buser (1997) onderzochten de degradatie en enantiomerisatie van o.a. racemisch MCPP [2-(4-chloor-2-methylfenoxyl)-propionzuur] en het enantiomeerzuiver (R)- en (S)-MCPP in bodemonsters. Tevens werd racemisch DCPP [(4-chloor-2-methylfenoxyl)-azijnzuur] en enantiomeer zuiver (R)- en (S)-DCPP onderzocht als ook enkele soortgelijke fenoxylkaanzuren. De herbiciden (fenoxylkaanzuren) werden als racemaat of als enantiomeer zuivere verbinding geïncubeerd met bodemmateriaal van een lokatie waar geen herbicide voorkwam. De concentraties van de enantiomeren en andere verbindingen werden gedurende 25 tot 35 dagen gevolgd. De analyse werd uitgevoerd met HRGC-MS met behulp van een chirale kolom. De degradatie snelheidsconstanten werden vastgesteld voor alle verbindingen en de verschillende enantiomeren. De degradatie van zowel (R)- en (S)-DCPP

verliep met verschillende degradatie snelheidsconstanten. Een langzame snelheidsconstante voor een incubatietijd tot circa 16 dagen en een snellere snelheidsconstante voor een incubatietijd van 16 tot 30 dagen. Deze kinetiek werd toegeschreven aan de omzetting door twee of meer enzym systemen. Uit figuur 5.9. blijkt dat de afbraak van het (S)-enantiomeer van MCPP en DCPP sneller verloopt dan de afbraak van het (R)-enantiomeer.



Figuur 5.9. Degradatie van fenoxo-alkaanzuur herbiciden en dicamba in bodem materiaal met racemisch MCPP en racemisch DCPP ten opzichte van de tijd (dagen). a. Degradatie van (R)-en (S)-MCPP. b. (R)- en (S)-DCPP. c. MCPP, 2,4-D en dicamba. De meetpunten zijn gemodelleerd en de curve is geoptimaliseerd met behulp van regressie. Uit: Müller en Buser, 1997.

Indien een enantiomeer zuivere verbinding werd toegepast is tevens de enantiomerisatie te zien door de toename in concentratie van zijn enantiomere verbinding. In figuur 5.10 werd alleen (S)-MCPP en (S)-DCPP als initiële concentratie ingezet. Na verloop van tijd (ongeveer 12 dagen) blijkt het (R)-isomeer de hoogste concentratie te hebben. Blijkbaar is in deze experimenten het (R)-enantiomeer gunstiger onder de gegeven condities en daarom is de enantiomerisatiesnelheidsconstante k_{SR} hoger dan k_{RS} . Dit kan alleen optreden indien er enantioselectieve reacties plaats hebben gevonden. Daarom werd geconcludeerd dat de enantiomerisatie biologisch gemedieerd zijn. Abiotische degradaties worden verondersteld niet-enantioselectief te zijn.



Figuur 5.10. Degradatie van fenoxoalkaanzuur herbiciden en dicamba in een bodemexperiment met (S)-MCPP en (S)-DCPP ten opzichte van de tijd (in dagen). a. Degradatie van (S)-MCPP en vorming van (R)-MCPP. b. Degradatie van (S)-DCPP en vorming van (R)-DCPP. c. Degradatie van MCPA, 2,4-D en dicamba. Bij $t > 16$ dagen verandert de enantiomere samenstelling waarbij de (R)-enantiomeer concentratie is groter dan de (S)-enantiomeer concentratie. Uit: Müller en Buser, 1997.

Voor deze studie zijn nog enkele andere argumenten om aan te tonen dat zowel degradatie als enantiomerisatie biologisch gemedieerd zijn:

1. de afwezigheid van enantiomerisaties en de lage snelheid van degradatie van MCPP in gesteriliseerd bodemmateriaal.
2. de enantioselectieve degradatie van racemisch MCPP en DCP.
3. het niet-racemische residu welke gevormd wordt.
4. de evenwichtconstante $K = k_{RS}:k_{SR} < 1$ geeft een voorkeur voor het (R)-enantiomeer.

De toepassing van een enantiomeerzuivere herbicide kan dus de spiegelbeeld van de zuivere herbicide (enantiomeer) opleveren zonder dat deze gebruikt is. Toch levert dit voordelen op omdat er minder herbicide gebruikt wordt zodat de totale milieu belasting minder wordt. Er komt minder van de niet-actieve verbinding in het milieu terecht.

Garrison e.a. (1997) onderzochten de degradatie van het chirale herbicide dichloorprop(2,4-dichloorfenoxy)-2-propionzuur met behulp van high-performance capillaire electroforese (HPCE). De degradatie van het herbicide Foxtril (suspensie van 400 g/L dichloorprop, 187,5 g/L bifenox en 57,5 g/L ioxynil, Rhone-Poulenc) werd in een bodemonmonster gevolgd gedurende 31 dagen. De enantiomere selectieve afbraak kon gevolgd worden m.b.v. electroforese waarbij een chirale eluens (Heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- β -cyclodextrin) toegepast werd zodat er een scheiding ontstond tussen het (R)-(+)-dichloorprop en het (S)-(-)-dichloorprop. Het (S)-enantiomeer degradeerde sneller ($t_{1/2} = 4,4$ d) dan het (R)-enantiomeer ($t_{1/2} = 9,7$ d). De afbraak wordt toegeschreven aan een biologische gemedieerde reactiviteit. Dit in tegenstelling tot een chemische (asymmetrische) reactiviteit. De resultaten zijn in tegenspraak met andere enantioselectieve degradatie onderzoeken. Het verschil wordt geweten aan verschillende biologische systemen die andere afbraak routes kennen.

HPCE bleek als techniek geschikt te zijn om de anionen en de enantiomeren van dichloorprop te bepalen. Aan de hand van de oppervlakten van de elutie pieken kan men de enantiomere ratio bepalen (ER = oppervlakte (S)-enantiomeer piek / oppervlakte (R)-enantiomeer piek). De reproduceerbaarheid bij HPCE is iets lager dan bij gaschromatografie op HPLC. De techniek is echter nog niet volledig ontwikkeld.

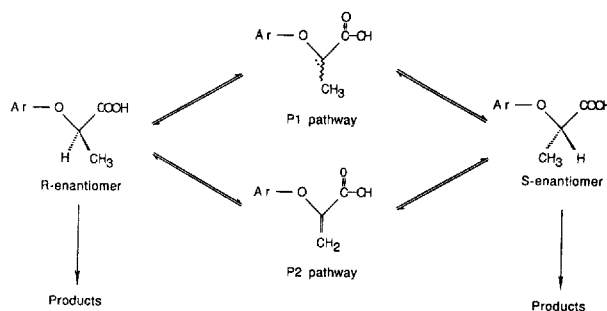
Zipper e.a. (1998) onderzochten de verhouding van (R)- en (S)-mecoprop [(R)- en (S)-2-(4-chloor-2-methylphenoxy)propionzuur] in het uitgeloogde water van een vuilnisstortplaats die gecontamineerd was met het racemaat van mecoprop. Tevens werden sorptie proeven uitgevoerd met (R)- en (S)-mecoprop in aquifer materiaal welke hoofdzakelijk bestaat uit een anorganische matrix. Uit de studie bleek dat mecoprop in de vuilnisstortplaats hoofdzakelijk bestaat uit het racemaat (enantiomere verhouding: ER = 1) maar naarmate het uitgeloogde naar het diepere gelegen grondwater bleek er een verrijking te ontstaan naar het (R)-enantiomeer. Een enantiomere verhouding (ER; gedefinieerd als het piek oppervlakte van het (R)-mecoprop gedeeld door het piekoppervlakte van het (S)-mecoprop door middel van een GC-scheiding op een chirale kolom) bereikte een waarde van 7,63 op een monsterlokatie met een diepte van 33 meter. De auteurs verklaarden dit verschil in enantioselectieve afbraak door microorganismen. Waarschijnlijk gebeurt de afbraak onder aerobe condities door specifieke enzymen.

Doordat tevens sorptie experimenten uitgevoerd werden met o.a. zandsteen, mergel, amorf SiO_2 , CaCO_3 , montmorillonite, $\delta\text{-Al}_2\text{O}_3$, goethite en MnO_2 kon bepaald worden dat chirale sorptie geen rol van betekenis speelt. Adsorptie coëfficiënten (K_d ; L/kg) voor de korrelgrootte fractie $< 63 \mu\text{m}$ lag in de buurt van 1 of kleiner dan 1. Voor amorf SiO_2 en montmorillonite was dit circa 30. Sorptie speelt voor mecoprop (een carbonzuur) geen of nauwelijks een rol. Abiotische enantioselectieve transformatie is niet waarschijnlijk aangezien geen chirale katalysator aanwezig is. Daarom kan ook dit proces

geen verandering in de ER bewerkstelligen.

De studie komt overeen met de onderzoeken van Müller en Buser (1997) en Buser en Müller (1997) omdat hier ook het (S)-enantiomeer als eerste verdwijnt. Voor de detectie wordt gebruikt gemaakt van 2,3,4,5,6,-pentafluorbenzylbromide om een verestering uit te voeren. Het 2,3,4,5,6,-pentafluorbenzylester van (R)- en (S)-mecoprop is 4500-maal gevoeliger voor elektron capture detectie (ECD) dan het corresponderende 2-chloorethylester. Als chirale kolomfase wordt heptakis(2,3-dimethyl-6-tert-butyl-dimethylsilyl)- β -cyclodextrine gebruikt.

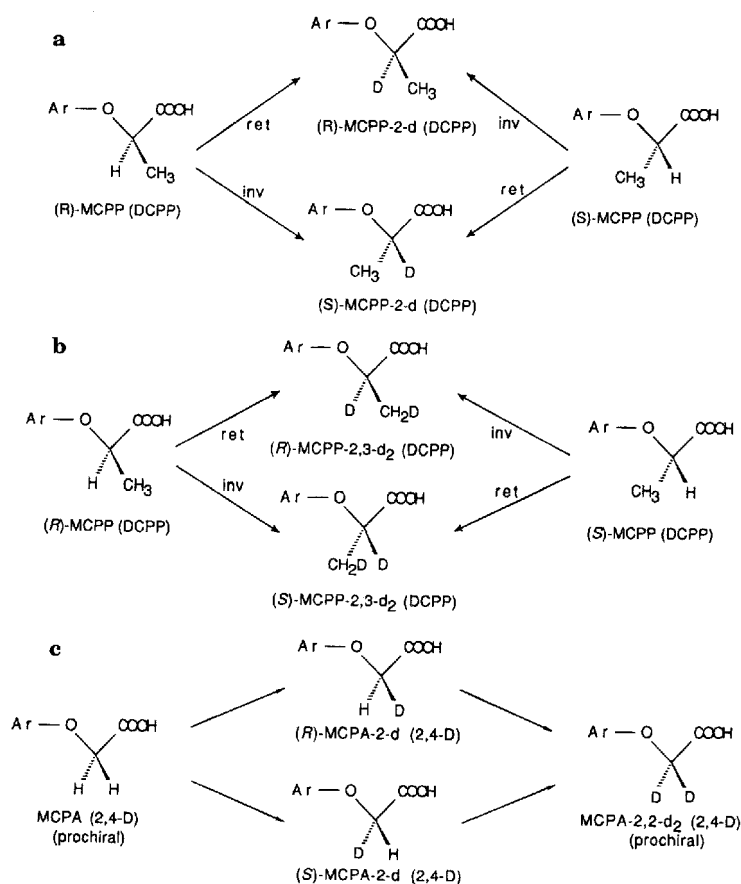
Buser en Müller (1997) onderzochten de enantiomerisatie en degradatie van fenoxo-alkaan-zuur herbiciden in grondmonsters onder laboratorium condities in aanwezigheid van D_2O . Vier verbindingen werden onderzocht: 2-(4-chloor-2-methylfenoxy)propionzuur (MCP), 2-(2,4-dichloorfenoxy)propionzuur (DCPP), het achirale 4-chloor-2-methylfenoxyazijnzuur (MCPA) en 2,4-dichloorfenoxyazijnzuur (2,4-D). De enantiomerisatie van 2-propionzuren kan via onderstaande hypothetische weg verlopen (figuur 5.11). Via het pad P1 ontstaat een carbanion als intermediair waarbij één H-atoom ontbreekt; via pad P2 ontstaat een intermediair waarbij twee H-atomen geëlimineerd zijn.



Figuur 5.11. Hypothetische mogelijkheden voor enantiomerisatie van 2-fenoxypropionzuren. Uit: Buser en Müller, 1997.

Doordat de enantiomerisatie uitgevoerd wordt in een grondmonster waarbij D_2O toegevoegd is wordt deuterium gebonden aan het centrale atoom. Er wordt aangenomen dat dit onder invloed van een biologisch systeem gebeurt. Mogelijk wordt het P2-reactiepad gemiddeld door een bacterie racemase enzym systeem en het P2-reactiepad door een oxidase/reductase enzym systeem. Door middel van een chirale GC, D-labeling en massaspectroscopie (MS/MS) kan aan de hand van het MS fragmentatie patroon geanalyseerd worden hoe het enantiomerisatie mechanisme verlopen is.

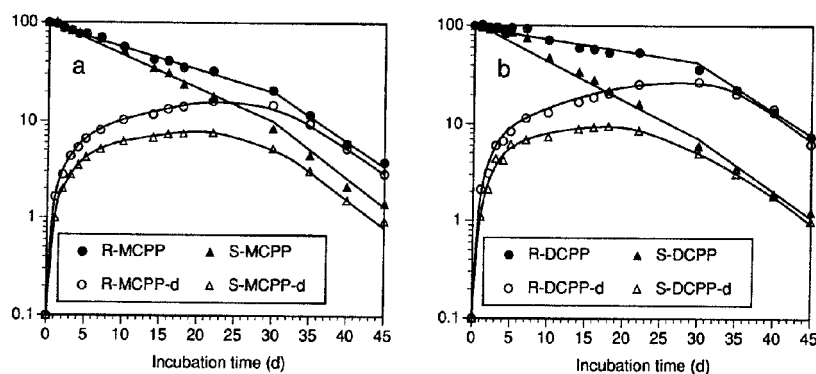
In figuur 5.12. zien we de ontstane deuterium producten. Door de reactie met deuterium wordt het achirale MCPA prochiraal en kunnen chirale (deuterium) producten ontstaan (zie reactieschema c, figuur 5.12.).



Figuur 5.12. Algemeen reactieschema. a. Deuterium analoge verbindingen van MCPP (of DCPP) gevormd via hypothetische reactieweg P1. b. 2,3-Dideuterium analoge verbindingen van MCPP (of DCPP) via hypothetische reactieweg P2. c. 2-Monodeuterium en 2,2-dideuterium analogen gevormd van MCPA en 2,4-D via reactieweg P1. ret = retentie van configuratie, inv = inversie van configuratie. Uit: Buser en Müller, 1997.

Er bleek dat de H-D uitwisseling exclusief plaats had gevonden op het C-2-atoom van MCPP en DCPP (hypothese pad P1). De uitwisseling bleek te verlopen met retentie en met inversie van de configuratie waarbij werden beide gelabelde deuterium enantiomeren gevormd. Ook voor MCPA en 2,4-D werden 2-deuterium- en 2,2-deuterium analogen (ongeveer 1 %) aangetoond. De chirale analytische techniek maakt geen onderscheid tussen chirale (R)- of (S)-monodeuterium MCPA verbindingen. Het is de verwachting dat de gedeuterieerde chirale analogen van MCPP en DCPP in dezelfde volgorde elueren. De deuterium analogen elueren echter ongeveer 2 seconden eerder dan de corresponderende H-verbindingen. De resultaten van de kinetische degradatie en enantiomerisatie van het racemische MCPP en DCPP worden weergegeven in figuur 5.13. De degradatie voldoet aan eerste-orde kinetiek met een initiële langzame (0-30 d) en een snellere fase van 30 tot 40 dagen.

De (S)-enantiomeren degraderen sneller dan de (R)-enantiomeren wat duidt op een enantioselectieve degradatie. Het (R)-enantiomeer wordt sneller gevormd dan het (S)-enantiomeer voor zowel MCPP als DCPP. Daarom is de enantiomerisatie snelheidsconstante k_{SR} groter dan k_{RS} . Dit heeft weer invloed op de evenwichtsconstante $K=k_{RS}/k_{SR}$. Het (R)-enantiomeer is de actieve herbicide, door het verschil in afbraak blijft het (R)-enantiomeer in een relatief hogere concentratie bestaan.



Figuur 5.13. Degradatie van a) racemisch-MCPP en b) racemisch-DCPP en de vorming van de gedeuterieerde analogen als gevolg van de incubatie in D₂O/bodemmonsters. Genormaliseerde concentraties (100 * c/c₀, logaritmische schaal) uitgezet tegen de incubatie tijd (in dagen). Uit: Buser en Müller, 1997.

Müller en Buser (1995) onderzochten met de analytische methode die door hen beschreven is, de degradatie van vijf acetamide pesticiden (alachloor, acetochloor, metalaxyl, metolachloor en dimethenamide) in bodemmateriaal en rioolwaterslib. De degradatie snelheden waren in de orde vanalachloor > acetochloor > dimethenamide > metolachloor > metalaxyl. Doordat er chirale hoge resolutie gaschromatografie (massa spectroscopie (HRGC-MS) toegepast werd kon de stereo- en enantioselectieve degradatie bepaald worden. Voor metalaxyl, metolachloor en dimethenamide was de afbraak stereo- en/of enantioselectief met name t.o.v. de C-chiraliteit. Axiaal-chirale resolutie was vaak beperkt mogelijk. De enantioselectiviteit van Metalaxyl was verschillend in twee media. De 1'S-(+)-enantiomeer degradeerde sneller in rioolslib dan de fungicide actieve 1'R-(-)-enantiomeer in bodemmateriaal. Metolachloor liet een stereoselectieve afbraak zien in rioolslib en bodemmateriaal. Hoewel de resolutie beperkt was was er sprake van een enantioselectieve afbraak. Omdat de componenten een atropisomerische relatie met elkaar hebben was er ook sprake van atropisomere selectiviteit met betrekking tot de degradatie.

Het onderzoek werd uitgebreid met veldwaarnemingen met oppervlakte water monsters (een monster uit een meer en uit een drainage kanaal) en één analyse van regenwater. De chromatografische vergelijkingen van piek oppervlakten van enantiomeren toonden aan dat de meest voorkomende acetamide metalochloor als racemaat aanwezig was en niet verschilde van het technische produkt. Dit gold ook voor dimethenamide. Metalaxyl werd gevonden in hoge concentratie (120 ng/L) in een drainage kanaal, waarschijnlijk werd deze toegepast als fungicide. Het 1'(S)-(+)-enantiomeer degradeerde sneller dan het 1'(R)-(-)-enantiomeer waarschijnlijk als gevolg van anaërobe condities. In het algemeen verschilde de ER niet van de technische produkten in milieumonsters. Dit duidt op weinig tot geen biologische degradatie.

Opmerking: Het onderzoek had veel sterkere conclusies kunnen trekken indien de zuivere enantiomeren voorhanden waren. Enantiomerisatie reacties kunnen nu niet gevolgd worden.

Aigner e.a. (1998) onderzochten de concentratie- en de enantiomere ratios van organochloorpesticiden in 40 bodemmonsters uit de graanproductie gebieden in de V.S. In totaal werden 11 verbindingen onderzocht nl: o,p'-DDT, p,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE, cis-chloordaan (CC), trans-chloordane (TC), heptachloor (HEPT), heptachloor epoxide (HEPX), dieldrin, α-hexachloorcyclohexaan (α-HCH), en trans-nonachloor. Van deze verbindingen

zijn α -HCH, CC, TC, HEPT, o,p'-DDT en de metabolieten oxychloordaan (OXY), HEPX en o,p'-DDD chiraal. De pesticiden kunnen uit de bodem verwijderd worden door fysische processen (vervluchtiging, uitloging en erosie) en chemische processen (chemische afbraak en microbiële afbraak). Alleen de microbiële afbraak kan resulteren in enantioselectieve afbraak. Alle chirale pesticiden werden als een racemisch mengsel van twee enantiomeren opgebracht. De enantiomere verhouding (ER= oppervlakte ratio van de (+)/(-) piek elutie vanaf de chirale cyclodextrine kolom) is bij de toepassing van de pesticide dus gelijk aan 1,00. o,p'-DDT gaf een selectieve degradatie te zien van het (+)-enantiomeer met een ER van 0.76 tot 0.86 in zes bodems terwijl vijf bodems een selectieve degradatie te zien gaven van het (-)-enantiomeer met een ER van 0.96 - 1.05. Deze waarden liggen dicht bij het racemische mengsel. Er is hier dus sprake van omgekeerde enantioselectiviteit.

Opmerking: Blijkbaar verloopt de afbraak via een ander biologisch mechanisme. Het (+)-enantiomeer van TC werd bij voorkeur het eerst afgebroken in alle bodems. De ER's varieerden van 0.48 tot 0.93. Het (-)-enantiomeer van CC werd in de meeste bodemmonsters afgebroken met een ER van 1.06 tot 1.56. In de vier bodemmonsters was de ER van CC dicht bij het racemische mengsel (ER = 0.97 - 1.02).

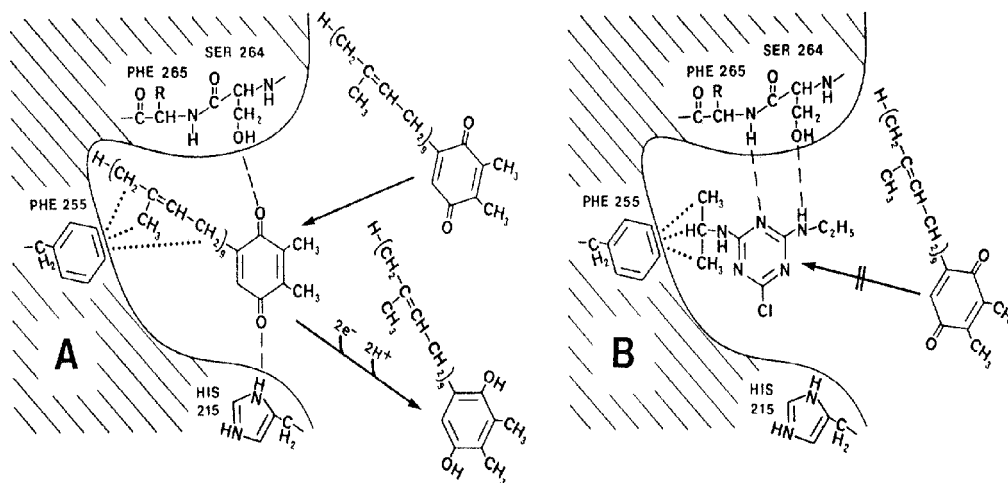
HEPX liet een enantiomere overmaat zien in het (+)-enantiomeer. Het is niet duidelijk waaruit deze afkomstig is; uit niet-racemische HEPX afbraak of uit selectieve vorming vanuit HEPT of een combinatie van beide processen. HEPX laat het grootste verschil in ER's zien van 1.17 tot 7.27.

Oxychloordane (OXY) is de hoofdmetsabooliet van CC, TC en nonachloor. Vijf bodems lieten een overmaat zien van (-)-OXY, negen bodems een overmaat van (+)-OXY en drie waren dicht bij het racemische mengsel. Net zoals HEPX is het onderlinge mechanisme niet duidelijk; perfecte afbraak, selectieve vorming van één enantiomeer of een combinatie van beide. De ER van OXY kan afhankelijk zijn van (+)- en (-)-TC en CC omdat deze (+)- en (-)-enantiomeren van chloordaan degraderen naar de corresponderende OXY-enantiomeren.

De concentratie α -HCH was te laag om een betrouwbare ER te bepalen.

5.4. Enantiomeren in biota.

De werking van pesticiden is vaak gecompliceerd. Toch is men op mechanistische en moleculaire schaal in staat om een gedetailleerd beeld te geven van de werking van herbicides die de inhibitie van fotosynthetisch elektron transport bewerkstelligen (Fuerst en Norman, 1991). Door de interactie van het herbicide met fotosysteem en door middel van een binding van D1-proteïne wordt het PSII (PhotoSystem) reactiecentrum geblokkeerd. In figuur 5.14. is dit te zien.



Figuur 5.14. Schematische figuur van plastoquinon (A) en atrazine (B) binding aan de actieve plaats van het D1-proteïne. Uit: Fuerst en Norman, 1991.

In figuur 5.14.A bindt plastoquinon aan het D1-proteïne en accepteert 2 elektronen en twee protonen en er ontstaat plastohydroquinon. In figuur 5.14.B bindt atrazine aan het D1-proteïne en voorkomt zo de binding met plastoquinon. Dit resulteert in de blokkering van het elektron transport en tevens in de continue vorming van triplet chlorofyl en singlet zuurstof die op hun beurt de peroxidatie van lipide membranen induceren. De herbicide-geïnduceerde lipide peroxidatie vernietigt het membraan welke leidt tot de degradatie van cellulaire compartimenten en zodoende tot fototoxiciteit. Het mechanisme van het fotosysteem PS-II inhibitie is een van de best begrepen systemen voor herbicide activiteit. Voor details in deze complexe materie verwijs ik naar de originele publikatie (Feurst en Norman, 1991).

Hühnerfuss e.a. (1993) geven een overzicht van 11 chirale contaminanten en hun enantiomere verhouding in verschillende compartimenten in het marine ecosysteem. Er zijn een aantal manieren om tot een bepaalde enantiomere verhouding te komen. Deze zijn in 4 classificaties in te delen:

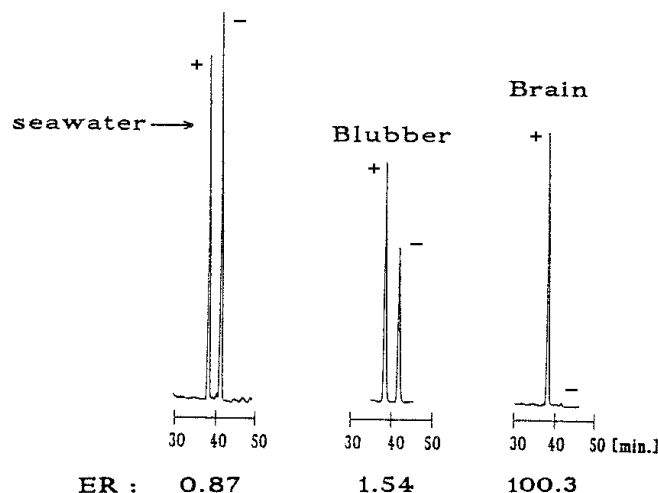
1. Enantiomere afbraak door marine microorganismen.
 - a. Beide enantiomeren worden afgebroken met verschillende snelheden.
 - b. Eén enantiomeer wordt selectief afgebroken. Dit kan een zeer grote enantiomere overmaat geven.
2. Enantioselectieve afbraak door enzymatische processen in mariene biota. Vaak wordt één enantiomeer bij voorkeur gemetaboliseerd. Zodat een significante enantiomere overmaat gevonden kan worden.
3. Enantiomeerselectieve actieve transport processen bv. de "bloed-hersenen-barrière" kunnen leiden tot aanzienlijke enantiomere overmaat.
4. Niet-enantioselectief fotochemische afbraak.

Van elke classificatie worden enkele voorbeelden gegeven. Het valt op dat

via classificatie 2 de afbraak van (-)- α -HCH zeer effectief is en daarom kunnen zeer hoge enantiomere verhoudingen (ER=(+)-enantiomeer/(-)-enantiomeer) gevonden worden in de lever van een Eideerd t.o.v. spier en nier weefsel. De lever, welke gespecialiseerd is in de afbraak, breekt (α)-HCH zeer enantioselectief af.

Een andere enantiomere verhouding welke optreedt is de hoge ER van α -HCH van circa 100 in hersenweefsel van Noordzee zeehonden (*Phoca vitulina*) ten opzichte van vet weefsel. Als verklaring wordt gegeven dat er een actief transport mechanisme tussen bloed- en hersenen plaatsvindt en dat deze barrière een sterk enantioselectief karakter heeft.

In figuur 5.15. staan de chromatogrammen van (α)-HCH in Noordzee water, in vetweefsel (blubber) en in hersenweefsel (brain).



Figuur 5.15. Enantiomere chromatogrammen met enantiomere verhoudingen van (+)- α -HCH en (-)- α -HCH in zeewater, vetweefsel en hersenweefsel van Noordzee zeehonden. Uit: Hühnerfuss e.a., 1993.

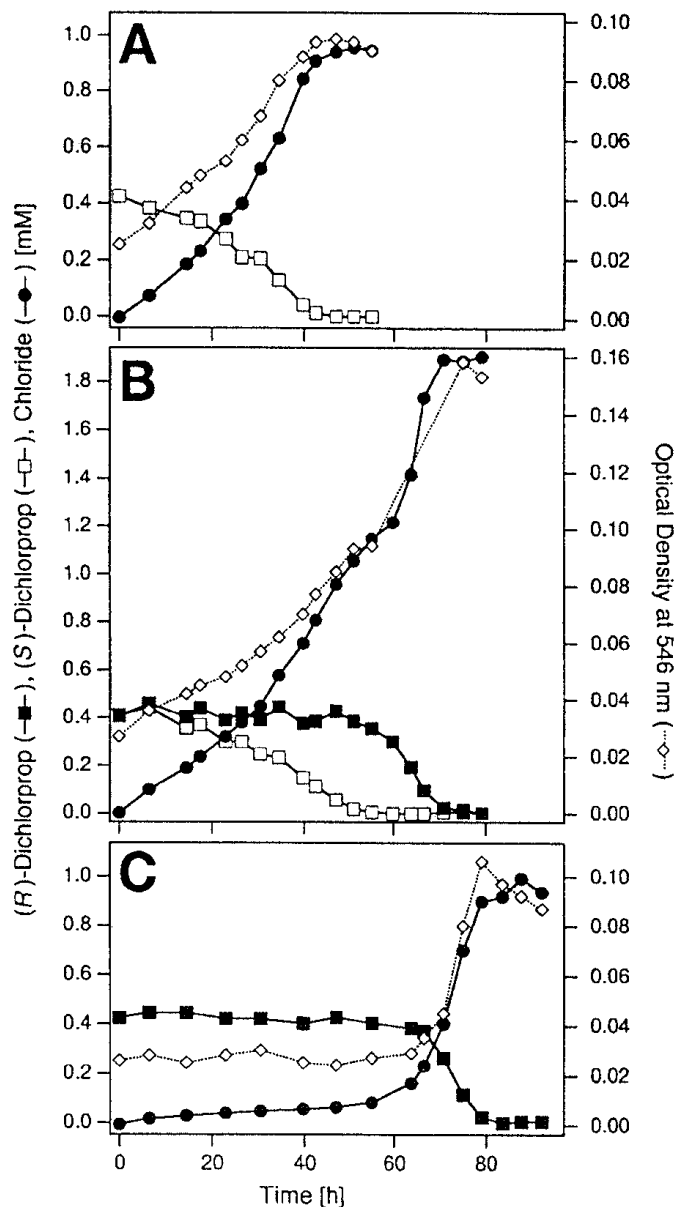
Het valt op dat vetweefsel en hersenweefsel een inverse enantiomere verhouding (ER) hebben ten opzichte van zeewater.

Het hersenweefsel heeft een zeer grote ER van circa 100. Die wordt toegeschreven aan de bloed-hersenen barrière. Enantiomere overmaat welke door enzymatische processen gevormd is kan veranderd worden door fotochemische niet-enantioselectieve afbraak (classificatie 4).

Müller e.a. (1992) waren één van de eersten die chirale capillaire kolommen prepareerden voor GC-ECD en GC-MS analyse. De fabricage wordt tot in detail besproken. Als chirale fase werd heptakis(2,3,6-tri-O-methyl- β -cyclodextrine) gebruikt. Hiermee konden de enantiomeren van α -HCH bepaald worden voor verschillende matrixen. In regenwater, bodemonsters, lucht, zeehond vetweefsel en walvisspek werden enantiomere ratios (ER= α -(+)-HCH / α -(-)-HCH) gevonden met behulp van GC-ECD van circa 1.075 , 1.099 , 1.020 , 2.326 en 3.778 . Het valt op dat met name in marine zoogdieren hogere ER voorkomen dan in milieumonsters (regen, bodem, lucht). Dit wordt verklaard door stereoselectieve opname door middel van stereoselectieve metabolisme. De afwijking van de initiële 1:1 ratio in milieumonsters is mogelijk door microbiële degradatie of microbiologische vorming vanuit het γ -HCH. γ -HCH kan ook getransformeerd worden naar α -HCH door niet-enantiomeer selectieve fotodegradatie reacties. Vaak kunnen deze efficiënter zijn dan microbiële omzetting (Malaiyandi en Shah, 1984).

Zipper e.a. (1998) onderzochten de enantioselectieve opname en degradatie

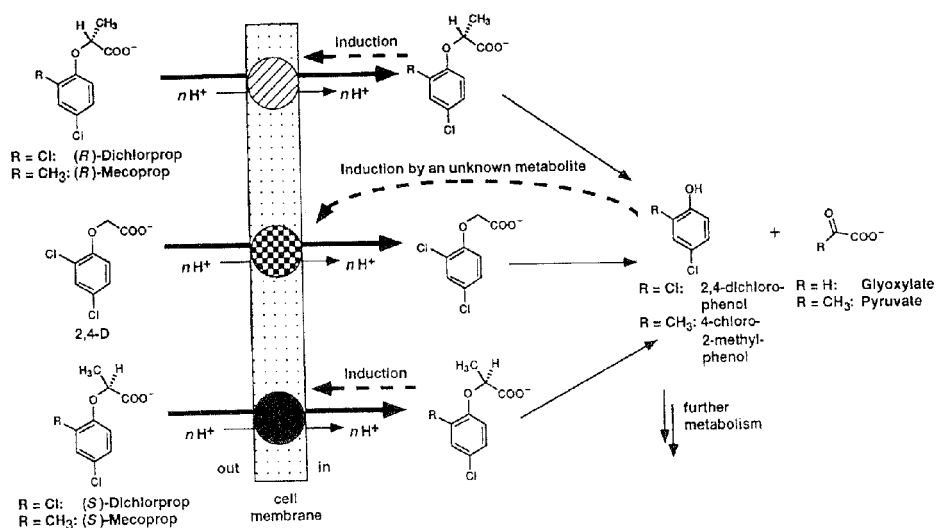
van de chiral herbicide dichloorprop [(R,S)-2-(2,4-dichloopenoxy)propionzuur}] door de bacteriestam *Sphingomonas herbicidovorans* MH. Deze bacteriestam was in staat om de beide enantiomeren van dichloorprop te degraderen met een voorkeur voor het (S)-enantiomeer. In figuur 5.16. is de degradatie te zien van de enantiomeren en het racemisch mengsel. Tevens wordt de vrije chloride concentratie en de optische dichtheid, welke een maat is voor de gevormde bacterie, gemeten.



Figuur 5.16. Groei experiment met *S. herbicidovorans* MH geïncubeerd met (R)-dichloorprop, (S)-dichloorprop en racemisch (R,S)-dichloorprop. De cultures groeiden in een chloride-vrij-complex medium gedurende 12 uur op 30 °C. a. Puur (S)-enantiomeer b. racemisch mengsel c. puur (R)-enantiomeer. Een A546 nm van 0.1 correspondeert met 20,8 mg (drooggewicht) bacteriecultuur per liter. Uit: Zipper e.a. (1998).

De groeicurve van *S. herbicidovorans* MH vindt plaats met alleen dichloorprop als enige koolstof- en als energiebron. (S)-dichloorprop heeft de snelste degradatie curve en is na 47 uur verdwenen uit de cultuur (figuur 5.16.a). (R)-Dichloorprop is na 82 uur gedegradeerd. Tevens werd de initiële opname snelheden en de affiniteitsconstante K_t bepaald na 15 seconden en na 2 minuten. Dit resulteerde in affiniteitsconstanten K_t van 108, 93, 117 μM en maximale opname snelheden van 19, 10 en 21 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg van proteïne})^{-1}$ voor respectievelijk (R)-dichloorprop, (S)-dichloorprop en 2,4-D. Door metabolische inhibitors kon de opname compleet stilgelegd worden. Dit was het geval voor een middel dat het proton transport

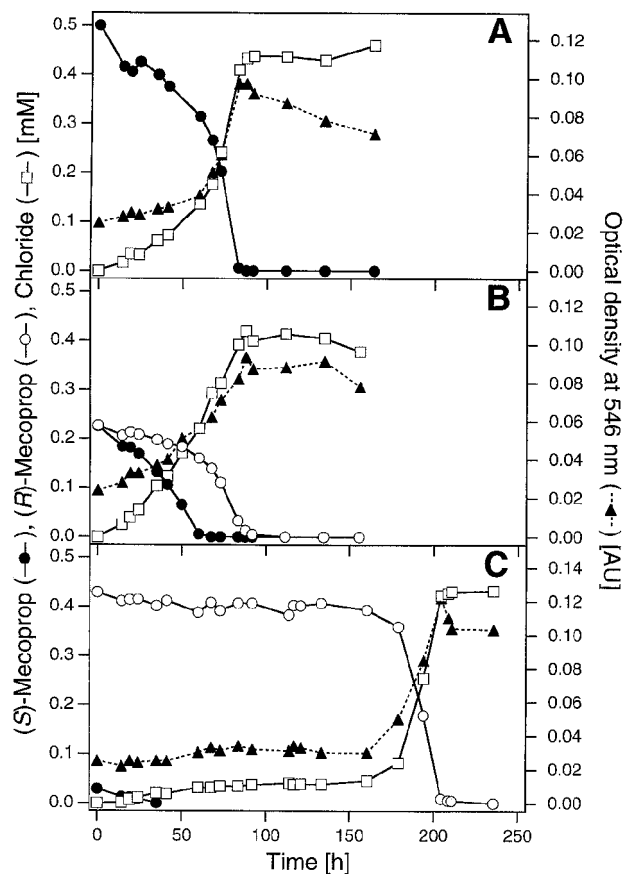
stillet. Het resulteerde in een complete afname van het transport van (R)-dichloorprop, (S)-dichloorprop en 2,4-D. Andere inhibitoren zoals ATP en K⁺-transport hadden een lager effect. De protonen concentratie (pH) bleek het belangrijkste effect te hebben op de opname. Het is bekend dat biologische membranen slecht doorlaatbaar zijn voor geladen moleculen, in dit geval gedeprotoneerde zuren. Diffusie door het membraan van neutrale moleculen gaat beter, in dit geval de geprotoneerde zuren. Zipper e.a. 1998 gaat uit van een geïnduceerd transport door de membranen. Deze wordt geïnduceerd door de chirale verbinding zodat selectief transport kan plaatsvinden. Daarnaast vindt enantioselectieve afbraak plaats. In figuur 5.17. wordt dit schematisch weergegeven. Aan de rechterzijde van het celmembraan vindt er (enantioselectieve) inductie van het transport plaats. Dit wordt gemedieerd door protontransport buiten (out) het celmembraan.



Figuur 5.17. Model voor de opname van (R)- en (S)-dichloorprop, (R)- en (S)-mecoprop en 2,4-D door *S. herbicidovorans* MH. De opname wordt enantiomeer geïnduceerd (induction), de protongradiënt is de drijvende kracht van de opname. n is groter dan 1. Uit: Zipper e.a. (1998).

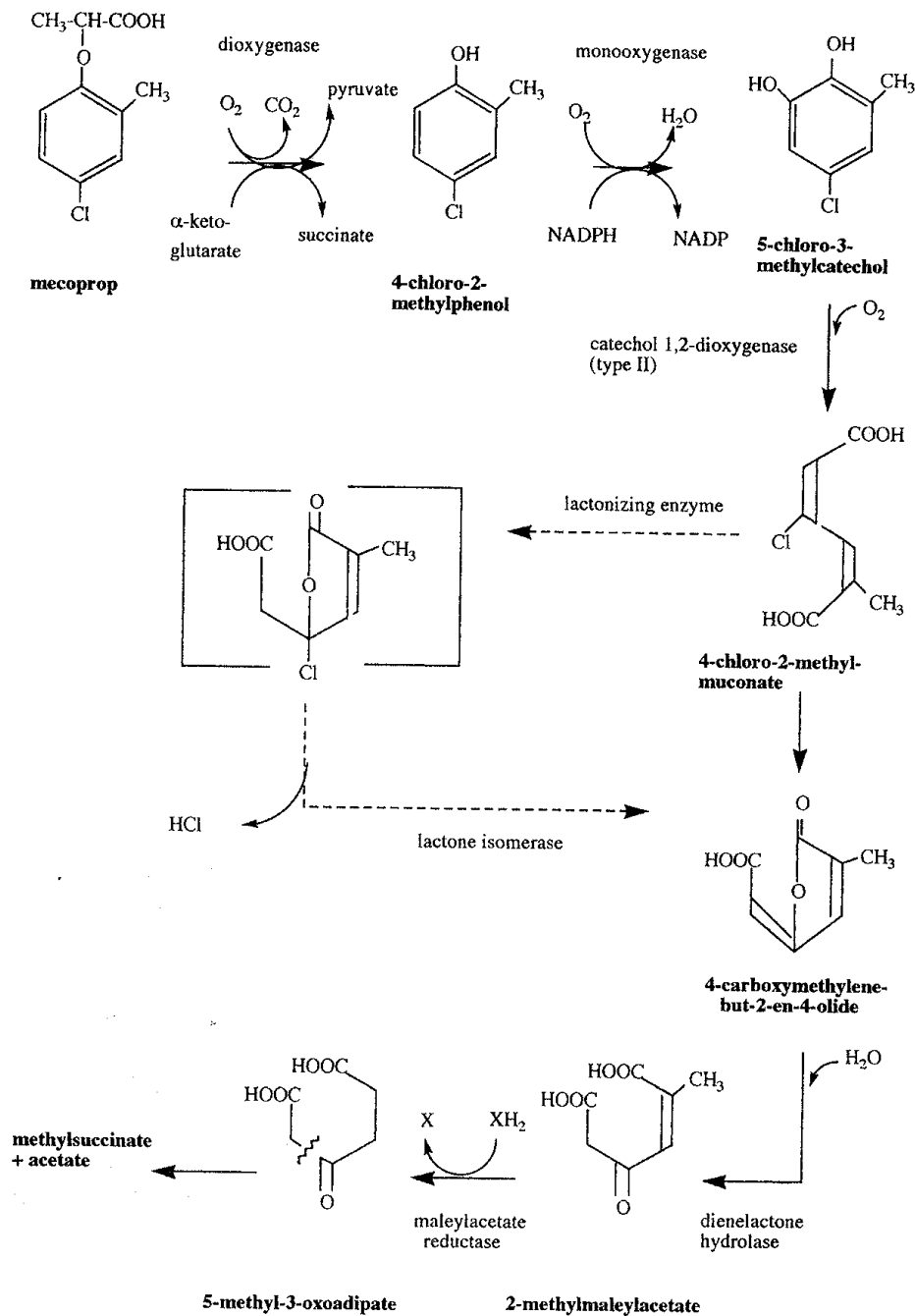
Zipper e.a. (1996) onderzochten de microbiële degradatie van de enantiomeren van het chirale herbicide mecoprop [(R,S)-2-(4-chloor-2-methylfenoxy)propionzuur] door *Sphingomonas herbicidovorans* sp.nov. Alleen mecoprop diende als koolstof- en energiebron. In figuur 5.18. is het groeiexperiment met *S. herbicidovorans* MH te zien met het (S)-enantiomeer, het racemische mengsel en het (R)-enantiomeer. Tevens werd de chloride concentratie en de biomassa gemeten gedurende 240 minuten. Het (S)-mecoprop is compleet verdwenen na 3,5 dagen zowel bij puur (S)-enantiomeer als bij het racemische mengsel. Voor het (R)-enantiomeer is dit ongeveer 7 dagen. Het (S)-enantiomeer degradeert dus aanzienlijk sneller. Dit wordt toegeschreven aan een mechanisme waarbij meer dan één enzym betrokken is. De groeisnelheid was lager bij het racemische mengsel ten opzichte van de pure enantiomeren. Blijkbaar is dit afhankelijk van de initiële concentratie van de enantiomeren. Nadat de bacteriestam gegroeid was op de verschillende substraten werd de bacterie opnieuw blootgesteld aan de drie verschillende substraten waarbij de zuurstof concentratie en zuurstof consumptie van substraten gemeten werd. Het bleek dat het hoogste zuurstof verbruik gemeten werd bij de bacteriestam gekweekt in het (S)-enantiomeer dat wederom gevoed werd met het (S)-mecoprop. Hetzelfde gold voor het (R)-

mecoprop. Echter bij de toevoeging van (S)-mecoprop aan het in (R)mecoprop gekweekte medium bleek het zuurstof gebruik een stuk lager. Dit gold ook voor een toevoeging van (R)-mecoprop aan de op een (S)-mecoprop gekweekte bacteriestam. Het racemische mengsel toegevoegd aan de (S)-mecoprop gekweekte bacteriestam had het hoogste zuurstof verbruik. Bij de metingen van de enantiomeren bleek dat de op een (S)-mecoprop gekweekte bacteriestam geen omzetting vertoonde indien (R)-mecoprop toegevoegd werd. Omgekeerd werd met een lagere snelheid wel (R)-mecoprop gedegradeerd bij de op (S)-mecoprop gekweekte bacteriestam. Blijkbaar zijn de bacteriestammen "geprogrammeerd" door het initiële toegevoegde substraat. De op een (S)-enantiomeer gekweekte bacteriestam bleek wel tot omzetting in staat. Er wordt geconcludeerd dat er twee enzymsystemen verantwoordelijk zijn voor de omzetting, waarvan er waarschijnlijk één systeem langzamer is. Een derde verklaring is de mogelijkheid van enantiomerisatie waarna afbraak op kan treden.



Figuur 5.18. Groei experiment met *S. herbicidovorans* MH geïncubeerd met a.) puur (S)-mecoprop, b.) (R,S)-mecoprop en c.) puur (R)-mecoprop. De bacteriestam is niet geïnduceerd met (enantiomeer) mecoprop. De adsorptie is een maat voor de hoeveelheid biomassa van de bacteriestam. Uit: Zipper e.a., 1996.

Tett e.a. (1997) onderzochten de biodegradatie van (R)-(+)-mecoprop door de bacteriestam *Alcaligenes denitrificans*. Deze bacteriestam werd geïsoleerd uit bodemmateriaal. Door middel van spectrofotometrie werd inzicht verkregen in de afbraakroute van (R)-(+)-mecoprop. In figuur 5.19. wordt de mogelijke afbraakroute weergegeven.



Figuur 5.19. Mogelijke afbraakroute van (R)-(+)-mecoprop door *Alcaligenes denitrificans*. De route tot 2-methyl-4-carboxymethyleenbut-2-en-4-olide (vaste pijlen) kan aangetoond worden, andere routes zijn niet aangetoond (gebroken pijlen). Tett e.a., 1997.

De afbraak van (R)-(+)-mecoprop was analoog aan die van 2,4-dichloorfenoxyazijnzuur (2,4-D). Het optische centrum wordt in de eerste stap afgebroken. In deze publikatie wordt echter geen chirale scheiding uitgevoerd. Het is daarom niet duidelijk of er enantiomerisatie optreedt naar het (S)-mecoprop. Uit andere studies van Buser en Müller (1998) blijkt

dat (R)-(+)-mecoprop omgezet kan worden naar het (S)-enantiomeer en dat vervolgens afbraak kan optreden.

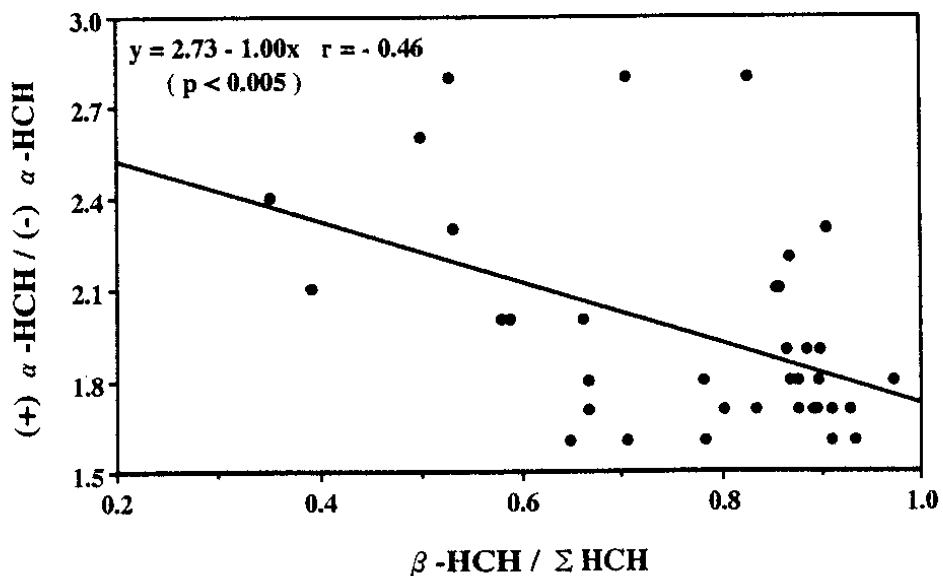
Een enkele bacteriestam *Alcaligenes denitrificans* kan (R)-(+)-mecoprop degraderen als enige bron van koolstof. In de bodemtoplaag verloopt deze afbraak via een aerobe mechanisme.

Wiberg e.a. (1998) bestudeerden enantiomere ratios (ER) van organochloorpesticiden in haring en in zeehonden die leven in het Zweedse kustgebied. Hiertoe werden drie-jarige mannelijke- en vrouwelijke haring, zeehonden vet en zeehonden lever geanalyseerd op enantiomeren van α -HCH, chloordaan (enantiomeren van cis- en transchloordaan) en metabolieten van chloordaan (enantiomeren van cis-, trans- en oxychloordaan, heptachloor-exo-epoxide). De enantiomere verhouding (ER = (+)- / (-) -enantiomeer) kwam per lokatie voor hetzelfde species overeen. De hogere trofische dieren zoals de zeehonden vertoonden een hogere enantiomere verhouding voor de onderzochte enantiomeren dan de haring. Er is dus een duidelijke afhankelijkheid van de soort (specie). De opname heeft een minder effect op de ER-verhouding dan de metabole capaciteit van de dieren. De lever heeft een hoge metabole capaciteit dan andere organen. In dit weefsel werden dan ook de grootste ER-verhoudingen gevonden. Dit verklaarde de bevindingen niet geheel, ook het enantioselectieve transport over membranen kan belangrijk zijn.

Tevens vond men bij een oude zieke zeehond ten opzichte van de 3- tot 5-jarige zeehonden verhoogde ER's in vet en lever van transchloordaan en heptachloor-exo-epoxide, octachloorchloordaan congenen en nonachloordaan congener. Dit betekent dat de gezondheid en/of de voedseltoestand invloed kan hebben op de ER verhouding.

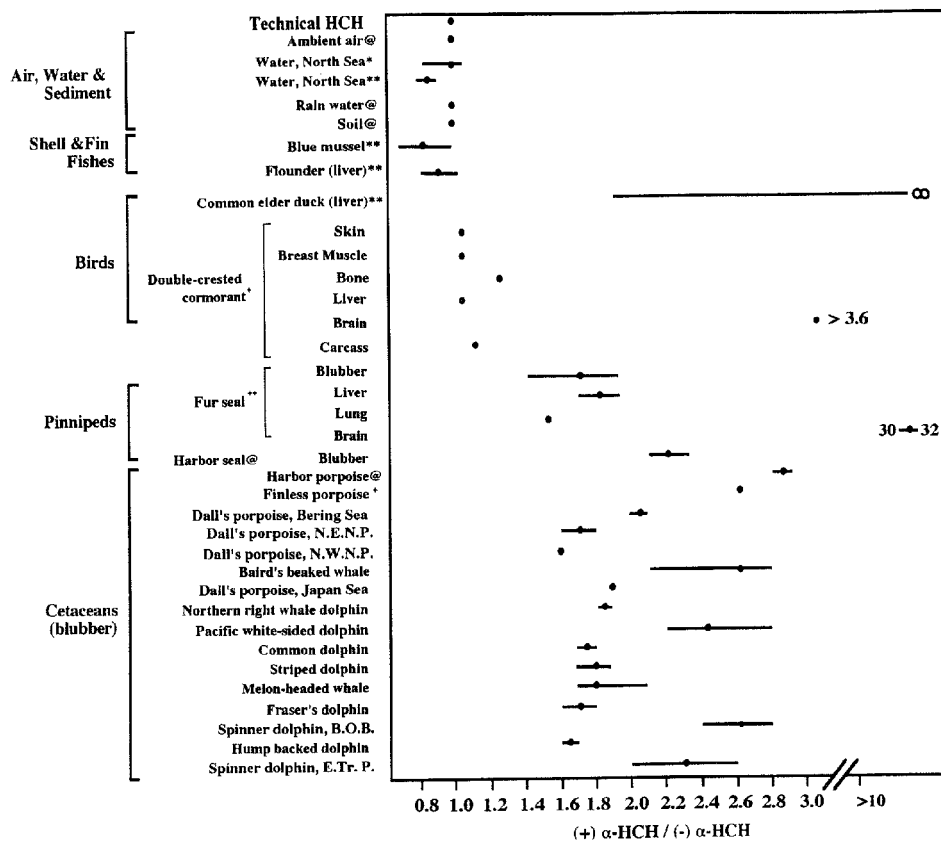
Enantioselectieve processen kunnen het resultaat zijn van een combinatie van processen bijvoorbeeld enantioselectieve degradatie, enantioselectieve opname, enantioselectief transport en metaboliet vorming.

Tanabe e.a. (1996) onderzochten de enantiomere ratios van α -chloorcyclohexaan (ER= (+)- α -HCH / (-)- α -HCH) in tien verschillende mannelijke walvisachtige zoogdier soorten. De bepaling werd uitgevoerd met behulp van capillaire gaschromatografie met β -cyclodextrine als chirale stationaire fase. De ER varieerde van 1,6 tot 2,8 in het vet van de walvisachtige zoogdieren. De ER veranderde in dezelfde species voor verschillende lokaties. Een mogelijke reden hiervoor is de voedselopname van de populatie in een bepaald gebied of de specie-specifieke metabolisme capaciteit. Voor de totale HCH isomeer (α -, β - en γ -HCH) concentratie werden hogere concentraties gevonden in de midden en hogere breedtegraden. Als enzym degradatie van α -HCH enantiomeren geïnduceerd wordt door de accumulatie van HCH-isomeren dan is de verwachting dat enantiomere verhoudingen gecorreleerd zijn met HCH concentraties. Dit was echter niet het geval. Dit betekent dat HCH isomeren α -HCH metabolisme enzymen niet induceren. De β -HCH concentraties ten opzichte van totaal HCH waren wel gerelateerd aan de enantiomere verhouding. Dit is te zien in figuur 5.20.



Figuur 5.20. Relatie tussen α -HCH enantiomere ratio en β -HCH/ Σ HCH. Uit: Tanabe e.a., 1996.

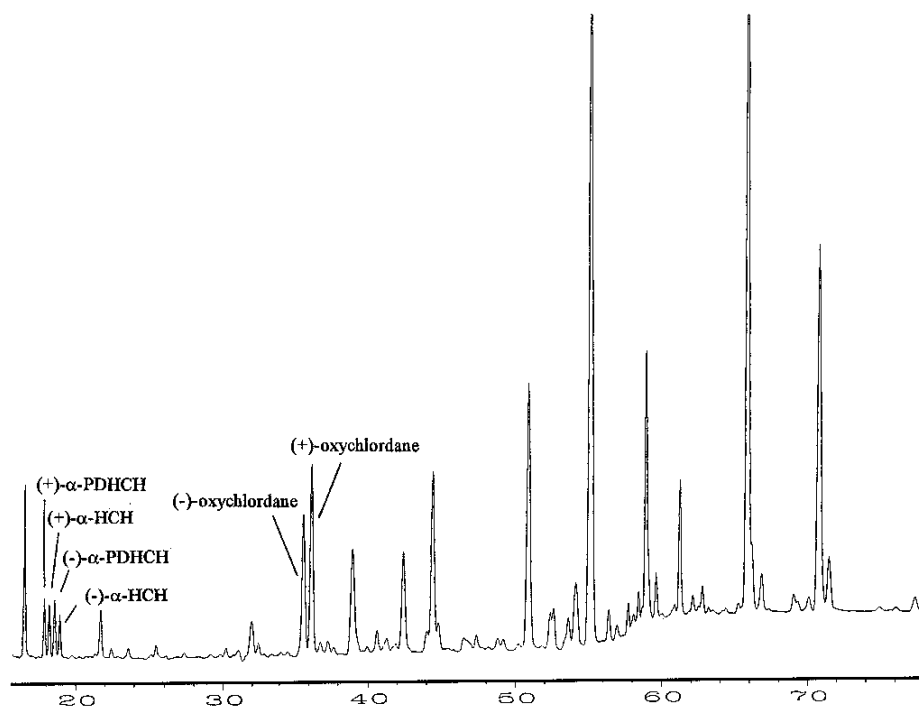
Het β -HCH isomeer is de meest persistente HCH en een hogere β -HCH/ Σ HCH betekent een hogere metabolische capaciteit van de species. De lineaire relatie (figuur 5.20.) betekent een degradatie van (+)- α -HCH ten opzichte van (-)- α -HCH. Deze relatie is evenredig met een hogere metabolische capaciteit. Vaak is de betekenis van een ER ongelijk aan 1 dat er een preferente degradatie optreedt voor een bepaald enantiomeer. Maar ook andere processen (voedsel opname, specifiek transport processen en specifiek metabolische door enzymen) kunnen de ER in een weefsel veranderen. In figuur 5.21. wordt van verschillende studies de ER van α -HCH uitgezet tegen de species. Het valt op dat hogere organismen bv. mariene zoogdieren een hogere ER van α -HCH hebben. Ook specifiek transport bv. via de bloed/hersenen barrière geeft een hogere ER. Daarnaast wordt een hoge ER gevonden in weefsel met een zeer hoge metabolische capaciteit zoals leverweefsel.



Figuur 5.21. Gemiddelde en bereik van α -HCH enantiomere verhoudingen in milieu monsters. Data van: @ Müller e.a., 1992, * Fuller e.a., 1991, ** Pfaffenberger e.a., 1992, + Iwata (niet gepubliceerde data), ++ Mössner e.a. 1992, N.E.N.P.: Noth-Eastern Nord Pacific, N.W.N.P.: North-Western North Pacific. B.O.B. Bay of Bengalen; E.Tr.P.: Eastern Tropical Pacific. Uit: Tanabe e.a., 1996.

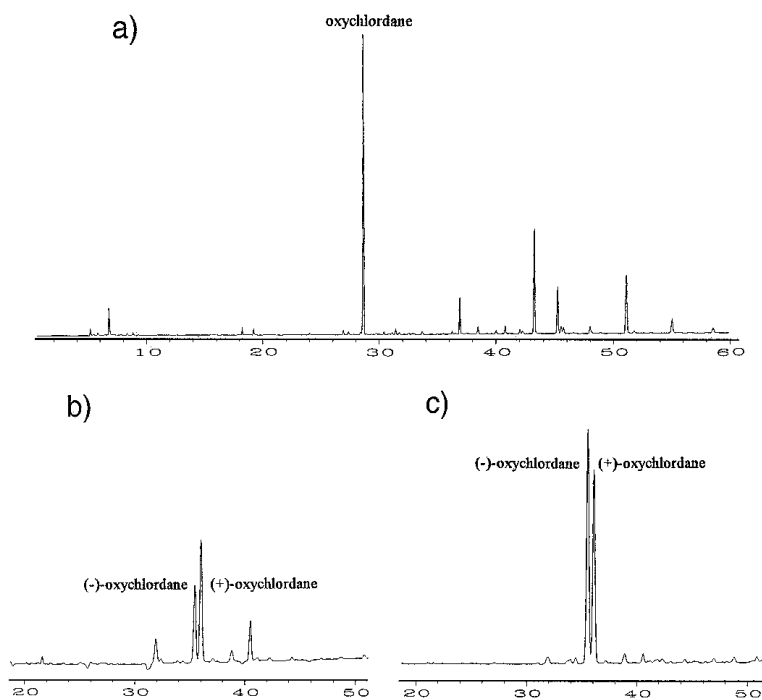
Vetter e.a. (1997) onderzochten vier chirale hoge resolutie gaschromatografie (HR-GC) kolommen die gemodificeerde cyclodextrines bevatten. Hiermee werden chirale organochloorverbindingen gescheiden. De chirale verbindingen bestonden uit α -hexachloorcyclohexaan (α -HCH), pergedeutereerd α -HCH (α -PDCH), β - en γ -pentachloorcyclohexeen (PCCH), oxychloordaan, cis- en trans-chloordaan, cis- en trans-heptachloorepoxide, PCB-95, PCB-132, PCB-149 en chirale toxafenen. Geen enkel kolom materiaal was in staat om alle enantiomeren te scheiden. Echter β -TBDM (35 % heptakis (6-O-t-butyl dimethylsilyl)-2,3-di-O-methyl)- β -cyclodextrine in OC-1701) was in staat om met verschillende temperatuursprogramma's alle enantiomeren behalve die van PCB-95 en chiraal taxafeen te scheiden. Deze scheidingstechnieken werden toegepast op biologische monsters, zoals monsters van vet en lever van mariene en terrestrische zoogdieren. De publikatie heeft primair een analytisch-chemisch karakter. Hierna wordt primair ingegaan op de enantiomere verhoudingen (ER= (+)-enantiomeer / (-)-enantiomeer) in de monsters van biota. Deze konden met een nauwkeurigheid van 6 % bepaald worden.

In figuur 5.22. zien we het chromatogram van de enantiomeren α -PDHCH (interne standaard) en oxychloordaan.



Figuur 5.22. Enantiomere scheiding van α -PDHCH (interne standaard), α -HCH en oxychloordaan in vet van een ijsbeer (*Ursus Maritimus*) op β -TBDM. GC (GC-ECD) programma 60 °C, 2 min, 25 °/min tot 160 °C (10 min); 1 °/min tot 200 °C; 10 °/min naar 220 °C (40 min). Uit: Vetter e.a., 1997.

In poolvossen (Vetter e.a., 1997) vond een merkwaardig verschijnsel plaats. Bij een lage oxychloordaan concentratie (1030 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was het (+)-oxychloordaan hoger dan het (-)-enantiomeer terwijl bij een hoge concentratie (8350 $\mu\text{g}/\text{kg}$) het (-)-enantiomeer een hogere concentratie had. In figuur 5.23. is dit te zien. Een verklaring voor dit verschijnsel wordt niet gegeven. In tabel 5.1 zijn de ER van (+)- en (-)-oxychloordaan in biota gegeven.



Figuur 5.23. Scheiding van oxychloordaan in van IJslandse poolvossen (*Alopex lagopus*). a. niet-chirale CP-Sil 2 kolom. b. chirale β -TBDM kolom; monster met verhoogde (+)-oxychloordaan (niveau: 1030 $\mu\text{g}/\text{kg}$). c. chirale β -TBDM; monsters met verhoogde oxychloordaan (niveau: 8350 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Tabel 5.1. Concentraties ($\mu\text{g}/\text{kg}$) van enantiomeren en enantiomere verhoudingen ER= (+)/(-) -enantiomeer van oxychloordaan in Poolvos. Uit: Vetter e.a., 1997.

Specie	Concentratie (+)-oxychloordaan min-max	Concentratie (-)-oxychloordaan min-max	ER min-max
Pool vossen lever monster aantal=9	6-3700	4-4650	0.8-2.0

Vetter e.a. (1997) geven slechts enkele kwantificaties van de ER verhoudingen. Voor de atropisomeren van PCB-149 en in het vet van de zeehond (harbor seal: *Phoca Vitulina*) werd een ER-verhouding (piek 1/piek 2) gevonden van ER = 1,6.

Voor een toxafeen verbinding B8-1413 (Parlar #26) werd in het vet van de antarctische zeehond (Antartic leopard seal); *Hydrurga leptonyx*) een ER (piek 1/piek 2) gevonden van ER (1/2) > 1. In totaal konden van 7 persistente toxafeen verbindingen enantiomere verhoudingen bepaald worden.

6. VERKLARENDE WOORDENLIJST STEREOCHEMIE

De stereochemie wint aan belangstelling in de farmacie en de produktie van gewasbeschermingsmiddelen. We trachten hier enkele begrippen weer te geven die gebruikt worden in dit verslag. Voor een gedetailleerde beschrijving verwijs ik naar een chemisch tekstboek (Ternay, 1979; March, 1977). De officiële terminologie van de stereochemie kan men vinden via het WWW van IUPAC (IUPAC, 1976) of als tijdschrift (IUPAC, 1976).

absolute configuratie: ruimtelijke rangschikking van atomen van een chiraal molecuul of een groep en zijn stereochemische vastlegging in bijvoorbeeld R en S configuraties.

achiraal: molecuul dat geen enantiomeer heeft.

asymmetrie: geen symmetrie elementen, geen as van symmetrie of een vlak van symmetrie.

asymmetrische synthese: chemische term voor stereoselectieve synthese van chirale verbindingen. Zie stereoselectieve synthese.

axiaal chiraliteit: stereoisomerie afkomstig van vlakken met vier groepen die een hoek maken ten opzichte van elkaar; ze bezitten een chirale as. Voorbeeld: PCB-95 heeft geen vrije rotatie om de centrale as tussen de fenylgroepen. Dit wordt veroorzaakt door substituenten op de ortho-plaats van de fenylring. Er bestaan dus enantiomeren van PCB-95.

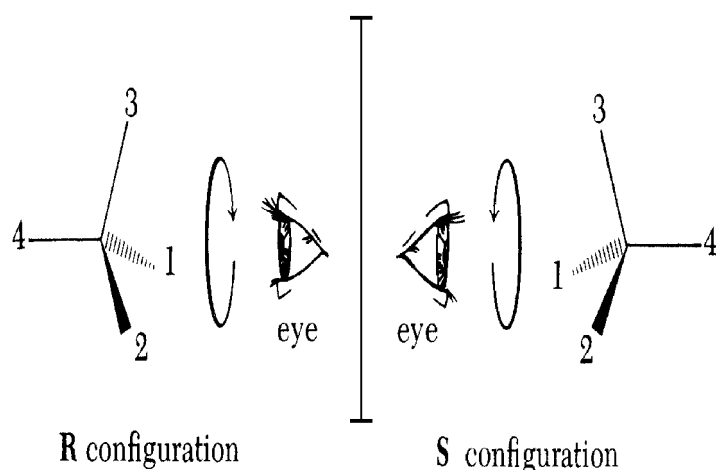
Cahn-Ingold-Prelog systeem (CIP): systeem dat de absolute configuratie bepaald van een chiraal molecuul aan de hand van prioriteiten van de substituenten. Cahn-Ingold-Prelog-systeem nomenclatuur wordt ook wel het "R,S"-systeem genoemd. Het R,S-systeem is gebaseerd op prioriteiten van substituenten om het chirale centrum. Deze prioriteiten zijn vastgelegd als volgorde regels. Om een chiraal centrum zijn vier substituenten met prioriteit 1,2,3 en 4. Deze worden zo neergelegd dat men met het oog via het chirale centrum naar de groep met de laagste prioriteit kijkt. Kijk men nu via de substituenten in de volgorde 1 --> 2 --> 3 naar een denkbeeldig cirkel. Als deze cirkel met de klok mee verloopt dan is de configuratie gedefinieerd als R (Latijn: rectus = rechts). In de figuur is dit te zien. Beschrijft de volgorde 1 --> 2 --> 3 een cirkel tegen de klok in dan is de configuratie gedefinieerd als S (Latijn: sinister = links). Zie figuur 6.1. Enantiomere chirale centra hebben tegengestelde configuraties.

De volgorde van het CIP-systeem bevat veel subregels. De belangrijkste regels zijn:

1. hogere atoomnummers hebben een hogere prioriteit dan lagere.
2. hoger massagetalen gaan voor lagere massagetalen.
3. niet-bindende elektronen hebben een lagere prioriteit dan atomen.

R en S worden aangegeven met haakjes van de naam voor een verbinding. Bijvoorbeeld: (R)-broomchloorfluormethaan.

Regel: Er is geen eenduidige relatie tussen de rotatie van een verbinding in gepolariseerd licht en de configuratie. Een R-configuratie kan gepolariseerd licht links of rechts draaien. Er is geen eenduidig verband tussen R en (+) of S en (-). De optische rotatie kan alleen experimenteel bepaald worden.



Figuur 6.1. Bepaling van de absolute configuratie van een chiraal centrum nadat de prioriteiten van de substituenten bepaald zijn. De chirale centra hebben tegengestelde configuraties. Uit: Ternay, 1979.

chiraal centrum: een atoom waaraan liganden gebonden zijn in een ruimtelijke vorm die niet tot dekking is te brengen met zijn spiegelbeeld vorm. Een chiraal centrum is uitbreiding van een asymmetrisch koolstof atoom. Bijvoorbeeld een viervoudig gebonden stikstof atoom, of een drievoudig gebonden fosfor atoom, of een andere ruimtelijke vorm. Regel: als een molecuul geen centrum van symmetrie heeft of een vlak van symmetrie dan is het molecuul chiraal.

chiraliteit: een eigenschap welke een verbinding laat bestaan uit spiegelbeelden die niet met elkaar tot dekking zijn te brengen.

chiroptisch: optische techniek om chirale verbindingen te onderzoeken.

cis-trans isomeren: stereoisomerie dat een verschil maakt tussen de positie van atomen ten opzichte van een referentie vlak. Het cis-isomeer zitten de atomen op dezelfde zijde, in het trans-isomeer zitten de atomen tegenovergesteld. Er zitten meestal 2 atomen tussen de cis- of trans-liganden.

D,L en DL systeem: een systeem is een standaard systeem om chirale stoffen in te delen naar het D- of L-isomeer. (+)-glyceraldehyde komt overeen met D (D-glyceraldehyde) en (-)-glyceraldehyde komt overeen met L (L-glyceraldehyde). Het systeem is niet voor 100 % consistent daarom wordt de voorkeur gegeven aan (+)- of (-)-benaming of het CIP-systeem (March, 1977).

dextrorotatory = (+) = d : rotatie van gepolariseerd licht met de klok mee naar rechts. Bijvoorbeeld: d-penicilline = (+)-penicilline.

diastereomeren: stereoisomeren die geen enantiomeren van elkaar zijn. Diastereoisomeren hebben andere fysische en chemische eigenschappen. Bijvoorbeeld: verschillende smeltpunten.

dl vorm: een paar enantiomeren

E,Z: zie Z,E-systeem.

enantiomeer ratio (ER): de verhouding dextrorotary / levorotary enantiomeer (rechtsdraaiend/linksdraaiend, (+)/(-)). Als het teken van de specifieke rotatie van de enantiomeren niet bekend is dan wordt ER bepaald door de ratio van de eerste/tweede eluerende enantiomeer onder exacte gedefinieerde chromatografische condities.

$$ER = \frac{(+)\text{-enantiomeer}}{(-)\text{-enantiomeer}}$$

Enantiomeren: Enantiomeren hebben identieke fysische en chemische eigenschappen met uitzondering van de volgende eigenschappen (March, 1977):

1. ze roteren een vlak van gepolariseerd licht in tegengestelde richting, in gelijke mate.
2. ze reageren met verschillende snelheden met andere chirale verbindingen. Het verschil in snelheid kan zo klein zijn dat er praktisch geen verschil is of het is zo groot dat een enantiomeer een normale snelheid heeft terwijl het ander in het geheel niet reageert. Om deze reden zijn veel verbindingen biologisch actief terwijl hun enantiomeer dat niet is. Met achirale verbindingen is er geen verschil in reactiviteit tussen enantiomeren. In het algemeen hebben enantiomeren dezelfde eigenschappen in symmetrische omgevingen maar in een asymmetrische omgeving zijn de eigenschappen verschillend.

Algemeen: enantiomeren hebben identiek fysische en chemische eigenschappen als het systeem waarin het bestudeerd wordt achiraal is. Ze verschillen in eigenschappen als het systeem chiraal is.

enantiomere overmaat (ee): de enantiomere overmaat (ee) is gedefinieerd als de overmaat van één enantiomeer t.o.v. de andere.

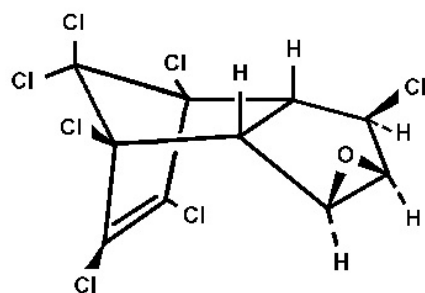
$$ee = \frac{E_1 - E_2}{E_1 + E_2}$$

E_1 en E_2 zijn de hoeveelheden van de enantiomeren en E_1 is het belangrijkste enantiomeer.

enantiomerisatie: omzetting van één enantiomeer in de andere enantiomeer

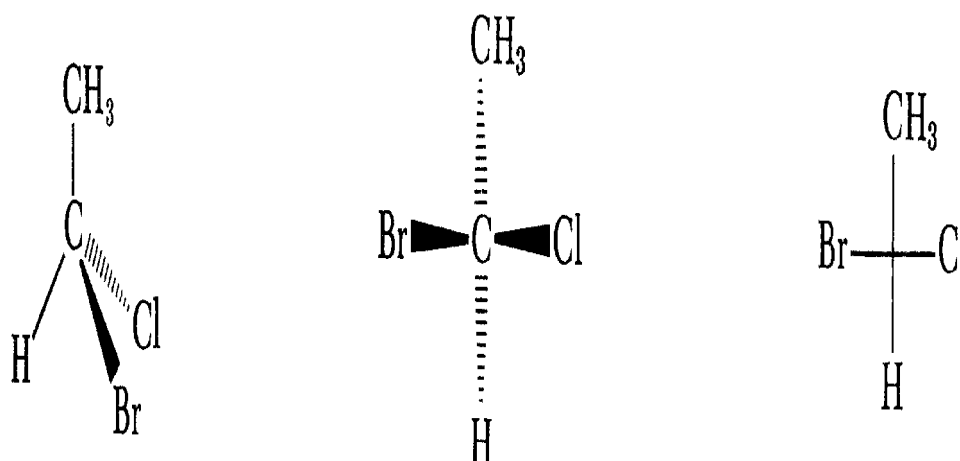
endo: relatieve oriëntatie van een groep aan een vrijstaand (niet-gebrugde) atoom ten opzichte van een bicyclische alkaan. Als de groep georiënteerd is naar de het cyclo-alkaan met het hoogste aantal atomen dan spreken we van endo.

exo: relatieve oriëntatie van een groep aan een vrijstaand (niet-gebrugde) atoom ten opzichte van een bicyclische alkaan. Als de groep georiënteerd is naar de het cyclo-alkaan met het laagste aantal atomen dan spreken we van exo. Zie hexachloor-exo-epoxide (figuur 6.2.).



Figuur 6.2. De pesticide hexachloor-exo-epoxide. De epoxide groep is georiënteerd naar het cyclo-alkaan met het laagste aantal atomen; de exo zijde.

Fischer projectie: methode om tetraëdische koolstof atomen op papier weer te geven. De bindingen die naar voren staan worden horizontaal afgebeeld en de verbindingen die achter het papier staan worden verticaal afgebeeld. Zie figuur 6.3.



Figuur 6.3. Verschillende stereometrische projecties voor 1-broom-1-chloorethaan.

De rechter afbeelding in figuur 6.3. geeft de Fischer projectie van 1-broom-1-chloorethaan. Links en midden geeft een wig-projectie van hetzelfde molecuul. Uit: Ternay, 1979.

Fischer-Rosanoff conventie: Emil Fischer (Nobelprijs 1902) gebruikte D(dexter) en L(laevis) als symbolen voor (+)-glyceraldehyde (D-glyceraldehyde) en (-)-glyceraldehyde (L-glyceraldehyde) en tekende de absolute configuratie als de Fischer projectie. De absolute configuratie kon hij toen nog niet bepalen. Achteraf bleek dat hij de juiste keuze had gemaakt voor deze configuratie (Bijvoet, Peerdam en van Bommel, Nature, 1951, **168**, 271). D kwam overeen met R en uiteraard L met S. Het DL-systeem gaat niet altijd op en daarom heeft het Cahn-Ingold-Prelog systeem de

voorkeur.

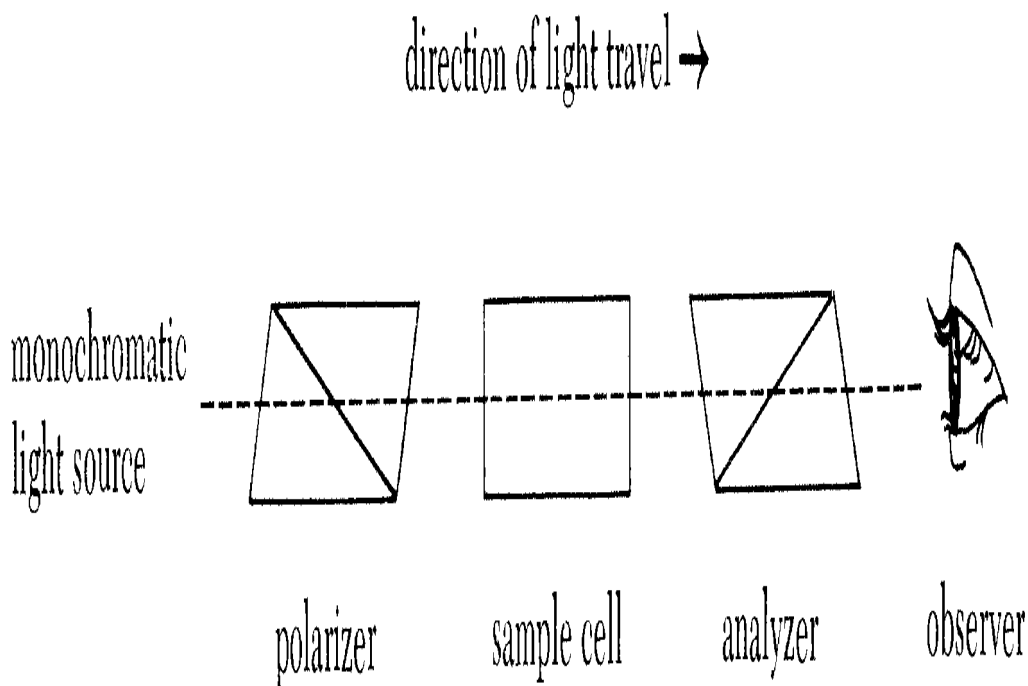
isomeer: één chemische entiteit van verschillende moleculen die gelijke stoïchiometrie hebben maar die verschillend zijn in structuurformule of stereochemische configuratie en daarom potentieel verschillende fysische of chemische eigenschappen bezit.

isomere ballast: belasting van het milieu door een racemisch mengsel (racemaat) van een pesticide. Het milieu wordt belast met het niet-actieve enantiomeer.

levorotatory = (-) = l : rotatie van gepolariseerd licht tegen de klok in naar links. Bijvoorbeeld: l-menthol = (-)-menthol. De voorkeur ligt bij het (+)- en het (-)- teken en niet bij d en l. Voorbeeld: (+)-(R)-mecoprop geeft zowel de optische rotatie (+) aan als de absolute configuratie (R).

MTR: Maximaal Toelaatbaar Risico. De concentratie of het gehalte waarbij 95 % van alle zoete of mariene organismen bescherming wordt geboden.

optische activiteit: de eigenschap van chirale moleculen om een vlak van gepolariseerd licht te draaien. Bepaling van de draaiingshoek van gepolariseerd licht (zie figuur 6.4.).



Figuur 6.4. Schematische voorstelling van een handmatige polarimeter. Een monochromatische lichtbundel bestaat uit één golflengte. De polarisator en

de analyse cel zijn Nicol prisma's. Het monster in de cel verandert (roteert) het licht. Uit: Ternay, 1979.

Experiment met gepolariseerd licht. Neem twee polaroid zonnebrillen, hou ze met een hoek van 90° op elkaar kijk hoeveel licht er door komt. Verander de hoek ten opzichte van elkaar en er zal het meer licht doorheen komen. Verklaring: licht wordt bij een onderlinge hoek van 90° in twee richting gedooft het is bijna volledig zwart. Door de hoek te veranderen komt er weer mee licht door.

polarimeter: instrument dat de mate van optische rotatie meet.

prochiraal: verbinding die chiraal kan worden als één identieke substituent door een achirale substituent wordt vervangen. Bijvoorbeeld: Caabc één a wordt vervangen door d. (a,b,c en d zijn verschillende substituenten om een centraal koolstof atoom).

racemaat: mengsel van enantiomeren

racemerisatie: de produktie van een racemaat uit chiraal start materiaal waarin één enantiomeer aanwezig is.

rotatie barrière: de potentiële energie barrière van de rotatie van een groep om een binding ten opzichte van de aanliggende groep of atoom

stereoselectieve synthese: een chemische reactie of reactie volgorde waarin één of meerdere nieuwe chirale elementen gevormd worden in een substraat molecuul en die enantiomere en diastereomere produkten vormt in ongelijke hoeveelheden. Ook wel asymmetrische synthese genoemd.

stereoselective toxiciteit: giftigheid die afhankelijk is van ruimtelijke vorm van molecuul of een gedeelte van een molecuul.

Z,E-systeem: Z (=zusammen = gezamenlijk) als groepen/atomen aan dezelfde zijde liggen (volgorden CIP-systeem) van een referentie vlak dat door een dubbele binding gaat.

Voorbeeld: alkenen ($R^1R^2C=CR^3R^4$ met $R^1 \neq R^2$, $R^3 \neq R^4$).

Als groepen/atomen tegenover elkaar liggen (volgorde CIP-systeem) van een referentie vlak dat door een dubbele binding gaat noemt men dit E. Dit systeem wordt niet gebruikt om gesubstitueerde ring systemen vast te leggen.

7. Literatuurlijst

- Aigner, E.J., Leone, A.D. en R.L. Falconer. Concentrations and enantiomeric ratios of organochlorine pesticides in soils from the U.S. corn belt. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, 1162-1168.
- Bidleman, T.F. en R.L. Falconer. Using enantiomers to trace pesticide emissions. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33, 206A-209A.
- Bidleman, T.F., Jantunen, L.M.M., Wiberg, K., Harner, T., Brice, K.A., Su, K., Falconer, R.L., Leone, A.D., Aigner, E.J. en W.J. Parkhurst. Soil as a source of atmospheric heptachlor epoxide. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, 1546-1548.
- Buser, H-R., Müller, M.D., en N. Theobald. Occurrence of the pharmaceutical drug Clofibric acid and the herbicide Mecoprop in various Swiss lakes and in the North Sea. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, 188-192.
- Buser, H-R. en M.D. Müller. Occurrence and transformation reactions of chiral and achiral phenoxyalkanoic acid herbicides in lakes and rivers in Switzerland. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, 626-633.
- Buser, H-R. en M.D. Müller. Environmental behavior of acetamide pesticide stereoisomers. 1. Stereo- and enantioselective determination using chiral high-resolution gas chromatography and chiral high-performance liquid chromatography. *Environ. Sci. Technol.*, 1995, 29, 2023-2030.
- Buser, H-R. en M.D. Müller. Conversion reactions of various phenoxyalkanoic acid herbicides in soil. 2. Elucidation of the enantiomerization process of chiral phenoxy acids from incubation in D₂O/soil system. *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31, 1960-1967.
- Dugas H. en C. Penney. *Bioorganic Chemistry. A Chemical Approach to Enzyme Action*. 1981, Springer-Verlag NY, ISBN 0-387-90491-3.
- Faller, J., Hühnerfuss, H., König, W.A., Krebber, R. en P. Ludwig. Do marine bacteria degrade alfa-Hexachlorocyclohexane stereoselectively? *Environ. Sci. Technol.*, 1991, 25, 676-678.
- Faller, J., Hühnerfuss, H., König, W.A. en P. Ludwig. Gas chromatographic separation of the enantiomers of marine organic pollutants. *Mar. Pollut. Bull.*, 1991, 22, 82-86.
- Fuerst, E.P. en M.A. Norman. Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Sci.*, 1991, 39, 458-464.
- Garrison, A.W., Schmitt, P., Martens, D. en A. Kettrup. Enantiomeric selectivity in the environmental degradation of dichlorprop as determined by high-performance capillary electrophoresis. *Environ. Sci. Technol.*, 1996, 30, 2449-2455.
- *Hegeman, W.J.M. en R.W.P.M Laane. Enantiomeric Ratios of Organochlorine Pesticides in Air, Soil, Water and Biota; Mechanism of Enantiomeric Enrichment of α -Hexachlorocyclohexane, Mecoprop, Cis-Chlordane, Trans-Chlordane, Heptachlor exo-Epoxide and Oxychlordane. 1999, concept.
- Hühnerfuss, H., Faller, J., Kallenborn, R., König, W.A., Ludwig, P., Pfaffenberger, B., Oehme, M., en G. Rimkus. Enantioselective and nonenantioselective degradation of organic pollutants in the marine ecosystem. *Chirality*, 1993, 5, 393-399.

-
- IUPAC, 1996. Commission on Nomenclature of Organic Chemistry, Section E: Stereochemistry (Recommendations 1974), *Pure Appl. Chem.*, 1976, 45, 11-30. Internet: <http://www.chem.qmw.ac.uk/IUPAC/stereo/>.
- Jantunen, L.M.M. en T.F. Bidleman. Organochlorine pesticides and enantiomers of chiral pesticides in arctic ocean water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1998, 35, 218-228.
- Jantunen, L.M. and T.F. Bidleman. Air-water gas exchange of hexachlorocyclohexanes (HCHs) and the enantiomers of alpha-HCH in arctic regions. *J. Geophys. Res.*, 1996, 101, 28837-28846.
- Jantunen, L.M. en T.F. Bidleman. Correction to: Air-water gas exchange of hexachlorocyclohexanes (HCHs) and the enantiomers of alpha-HCH in arctic regions. *J. Geophys. Res.*, 1997, 102, 19279-19282.
- Ludwig, P., Hühnerfuss, H., König, W.A., en W. Gunkel. Gas chromatographic separation of the enantiomers of marine pollutants. Part 3. Enantioselective degradation of alpha-hexachlorocyclohexane and gamma-hexachlorocyclohexane by marine microorganisms. *Mar. Chem.*, 1992, 38, 13-23.
- Luong, J.H.T. en A.L. Nguyen. Achiral selectivity in cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. *Review. J. Chromatogr. A* 1997, 792, 431-444.
- Malaiyandi, M. en S.M. Shah. Evidence of photoisomerization of hexachlorocyclohexane. *J. Environ. Sci. Health*, 1984, A19, 887-910.
- March, J. Stereochemistry. Chpt. 4. In: *Advanced Organic Chemistry*, 2nd ed.; John Wiley and Sons: New York, 1985, pp. 86-150.
- Mössner, S., Spraker, T.R., Becker, P.R. and K. Ballschmiter. Ratios of enantiomers of alpha-HCH and determination of alpha-, beta-, and gamma-HCH isomers in brain and other tissues of neonatal northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). *Chemosphere*, 1992, 24, 1171-1180.
- Müller, M.D. en H-R. Buser. Conversion reactions of various phenoxyalkanoic acid herbicides in soil. 1. Enantiomerization and enantioselective degradation of the chiral 2-phenoxypropionic acid herbicides. *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31, 1953-1959.
- Müller, M.D. en H-R. Buser. Environmental behavior of acetamide pesticide stereoisomers. 2. Stereo- and enantioselective degradation in sewage sludge and soil. *Environ. Sci. Technol.*, 1995, 29, 2031-2037.
- Müller, M.D., Schlabach, M. en M. Oehme. Fast and precise determination of alpha-hexachlorocyclohexane enantiomers in environmental samples using chiral high-resolution gas chromatography. *Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26, 566-569.
- Penmetsa, K.V., Leidy, R.B. en D. Shea. Enantiomeric and isomeric separation of herbicides using cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1997, 790, 225-234.
- Schmitt, Ph., Garrison, A.W., Freitag, D. en A. Kettrup. Application of cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography to the separation of selected neutral pesticides and their enantiomers. *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 419-429.
-

-
- Ulrich, E.M. en R.A. Hites. Enantiomeric ratios of chlordane-related compounds in air near the Great Lakes. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, 1870-1874.
- Tanabe, S., Kumaran, P., Iwata, H., Tatsukawa, R. and N. Miyazaki. Enantiomeric Ratios of alpha-hexachlorocyclohexane in blubber of small cetaceans. *Mar. Pollut. Bull.*, 1996, 32, 27-31.
- Ternay, A.L. Jr. Contemporary organic chemistry. Saunders Comp. 1979.
- Tett, V.A., Willetts, A.J. en H.M. Lappin-Scott. Biodegradation of the chlorophenoxy herbicide (R)-(+)-mecoprop by *Alcaligenes denitrificans*. *Biodeg.*, 1997, 8, 43-52.
- Vetter, W., Klobes, U., Luckas, B. en G. Hottinger. Use of 6-O-tert.-butyldimethylsilylated β -cyclodextrins for the enantioseparation of chiral organochlorine compounds. *J. Chromatogr. A.*, 1999, 846, 375-381.
- Vetter, W. en V. Schurig. Enantioselective determination of chiral organochlorine compounds in biota by gas chromatography on modified cyclodextrines. Review. *J. Chromatog. A*, 1997, 774, 143-175.
- Vetter, W., Klobes, U., Hummert, K. en B. Luckas. Gas chromatographic separation of chiral organochlorines on modified cyclodextrin phases and results of marine biota samples. *J. High Resol. Chromatogr.*, 1997, 20, 85-93.
- Wiberg, K., Oehme, M., Haglund, P., Karlsson, H., Olsson, M. en C. Rappe. Enantioselective analysis of organochlorine pesticides in herring and seal from the Swedisch marine environment. *Mar. Pollut. Bull.*, 1998, 36, 345-353.
- Zipper, C., Suter, M.J.-F., Haderlein, S.B., Gruhl, M. en H.-P. Kohler. Changes in the enantiomeric ratio of (R)- to (S)-Mecoprop indicate in situ biodegradation of this chiral herbicide in a polluted aquifer. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, 2070-2076.
- Zipper, C., Bunk, M., Zehnder, A.J.B. en H.-P.E. Kohler. Enantioselective uptake and degradation of the chiral herbicide dichlorprop [(RS)-2-(2,4-dichlorophenoxy)propanoic acid] by *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *J. Bacteriol.*, 1998, 180, 3368-3374.
- Zipper, C., Nickel, K., Angst, W. en H.-P.E. Kohler. Complete microbial degradation of both enantiomers of a chiral herbicide mecoprop [(RS)-2-(4-chloro-2-methylphenoxy)propionic acid] in an enantioselective manner by *Sphingomonas herbicidovorans* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62, 4318-4322.
- *Hegeman, W.J.M. en R.W.P.M Laane. Enantiomeric Enrichment of Chiral Pesticides in the Environment. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. *Rev Environ Contam Toxicicol*, 2002, 173:85-116. Definitieve publicatie.

8. Toevoeging Literatuurlijst

Hierin vindt u literatuur voor chirale verbindingen in het milieu. Het is per jaar gegroepeerd. Het is bestemd voor de geïnteresseerde onderzoeker.

1999

Rochat, B., Baumann, P. and K.L. Audus. Transport mechanisms for the antidepressant citalopram in brain microvessel endothelium. *Brain Res.*, 1999, 831, 229-236.

Rouleau, C., Borg-Neczak, K., Gottofrey, J. and H. Tjälve. Accumulation of waterborn Mercury(II) in specific areas of fish brain. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33, 3384-3389.

Aga, D.S., Heberle, S., Rentsch, D., Hany, R. and S.R. Müller. Sulfonic and oxanilic acid metabolites of acetanilide herbicide: separation of diastereomers and enantiomers by Capillary Zone Electrophoresis and identification by ¹H NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33, 3462-3468.

Vetter, W. and G. Scherer. Persistancy of toxaphene components in mammals that can be explained by molecular Modeling. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33, 3458-3461.

Buser, H-R., Poiger, T. and M.D. Müller. Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33, 2529-2535.

Miura, M., Terashita, Y., Funazo, K. and M. Tanaka. Separation of phenoxy acid herbicides and their enantiomers in the presence of selectively methylated cyclodextrin derivatives by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A.*, 1999, 846, 359-367.

Koske, G., Leupold, G., Angerhöfer, and H. Parlar. Multidimensional gas chromatographic enantiomer quantification of some chlorinated xenobiotics in cod liver and fish oils. *Chemosphere*, 1999, 39, 683-688.

Wania, F., Mackay, D., Li, Y.-F., Bidleman, T.F., and A. Strand. Global chemical fate of alpha-hexachlorocyclohexane. 1. Evaluation of a global distribution model. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1999, 18, 1390-1399.

Wania, F. and D. Mackay. Global chemical fate of alpha-hexachlorocyclohexane. 2. Use of a global distribution model for mass balancing, source apportionment, and trend prediction. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1999, 18, 1400-1407.

T.F. Bidleman and R.L. Falconer. Enantiomer Ratios for Apportioning Two Sources Of Chiral Compounds. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33, 2299-2301.

Kohler, H.-P.E., Nickel, K., Bunk, M. and C. Zipper. Microbial transformation of the chiral pollutants mecoprop and dichlorprop. In: *Novel Approaches for Bioremediation of Organic Pollution*. Fass, R., Flashner Y. and S. Reuveny (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publ., New York, ISBN: 0-306-46102-1, 1999 p. 13-20.

Ramos, L., Hernandez, L.M. and M.J. Gonzalez. Simultaneous separation of coplanar and chiral polychlorinated biphenyls by off line pyrenyl silica liquid chromatography and gas chromatography. Enantiomeric ratios of chiral congeners. *Anal. Chem.*, 1999, 71, 70-77.

Saari, R.E., Hogan, D.A. and R.P. Hausinger. Stereospecific degradation of the phenoxypropionate herbicide dichlorprop. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 1999, 6, 421-428.

Schneiderheinze, J.M., Armstrong, D.W. and A. Berthod. Plant and soil enantioselective biodegradation of racemic phenoxyalkanoic herbicides. *Chirality*. 1999, 11, 330-337.

Reich, S., Jimenez, B., Marsili, L., Hernandez, L.M., Schurig, V. and M.J. Gonzalez. Congener specific determination and enantiomeric ratios of chiral polychlorinated biphenyls in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Mediterranean Sea. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33, 1787-1793.

Overbeeke, P.L.A., Ottosson J., Hult, K., Jongejan, J.A. and J.A. Duine. The temperature dependence of enzymatic kinetic resolutions reveals the relative contribution of enthalpy and entropy to enzymatic enantioselectivity, *Biocatal. Biotransform.*, 1999, 17, 61-79.

CTB. Dutch Board for Authorisation of Pesticides. Annual report 1998, march 1999.

Bidleman, T.F. Transport and Fate. Highlights of: degradation and fate, air-surface exchange and physicochemical properties. Symposium paper. Dioxin 1998, 17-21 august 1998, Stockholm, Sweden.

Harner, T., Kylin, H., Bidleman, T.F. and W.M.J. Strachan. Removal of alpha- and gamma-Hexachlorocyclohexane and enantiomers of alpha-hexacyclohexane in the easter Atlantic ocean. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33, 1157-1164.

Gilliom, R.J., Barbash, J.E., Kolpin, D.W. and S.J. Larson. Testing water quality for pesticide pollution. U.S. Geological survey investigation reveal widespread contamination of the nation's water resources. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33, 164A-169A.

Spangler, L.A., Mikalojczyk, M., Burdge, E.L., Kielbasinski, P., Smith, H.C., Lyzwa P., Fisher, J.D. and J. Omelanczuk. Synthesis and biological activity of enantiomeric pairs of phosphosulfonate herbicides. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 318-321.

1998

Vetter, W., Bartha, R., Stern, G. and G. Tomy. Enantioselective determination of two major compounds of technical toxaphene in Canadian lake sediment cores from the last 60 years. *Organohalogen Compounds*, 1998, 35: 343-346.

Hühnerfuss, H. Chromatographic enantiomer separation of chiral xenobiotics and their metabolites - a versatile tool for process studies in marine and terrestrial ecosystems. *Organohalogen Compounds*, 1998, 35, 319-324.

Wiberg, K., Letcher, R., Sandau, C., Norstrom, R., Tysklind, M. and T. Bidleman. Enantioselective analysis of organochlorines in the arctic marine food chain: chiral biomagnification factors and relationships of enantiomeric ratios, chemical residues and biological data. *Organohalogen Compounds*, 1998, 35, 371-374.

Klobes, U., Vetter, W., Luckas, B. and G. Hottinger. Enantioselective determination of 2-endo,3-exo,5-endo,6-exo-8,8,9,10-octachlorobornane (B8-1412) in environmental samples. *Organohalogen Compounds*, 1998, 35, 359-362.

-
- Bergman, Å., Ellerichmann, T., Franke, S., Hühnerfuss, H., Jakobsson, E., König, W.A. and C. Larsson. Gas chromatographic enantiomer separations of chiral PCB methyl sulfones and identification of selectively retained enantiomers in human liver. *Organohalogen Compounds*, 1998, 35, 339-342.
- Falconer, R., Leone, A., Bodner, C., Wiberg, K., Bidleman, T., Jantunen, L., Harner, T., Parkhurst, W., Alegria, H., Brice, K. and K. Su. Using enantiomeric ratios to determine sources of chlordane to ambient air. *Organohalogen Compounds*, 1998, 35, 331-334.
- Jantunen, L.M., Kylin, H., and T.F. Bidleman. Air-water gas exchange of HCHs and the enantiomers of alpha-HCH in the South Atlantic Ocean and Antarctica. *Organohalogen Compounds*, 1998, 35, 347-350.
- Harner, T., Bidleman, T.F., Kylin, H. and W.M.J. Strachan. Air-water gas exchange of Hexachlorocyclohexanes (HCHs) and the enantiomers of alpha-HCH in the eastern Arctic Ocean. *Organohalogen Compounds*, 1998, 35, 355-358.
- Vetter, W., Klobes, U., Luckas, B. Hottinger, G. and G. Schmidt. Determination of (+/-) elution orders of chiral organochlorines by liquid chromatography with a chiral detector and by enantioselective gas chromatography. *J. AOAC Int.*, 1998, 81, 1245-1251.
- Ellerichmann, T., Bergman, Å., Franke, S., Hühnerfuss, H., Jakobsson, E., König, W.A. and C. Larson. Gas chromatographic enantiomer separations of chiral PCB methylsulfones and identification of selectively retained enantiomers in human liver. *Fresenius Environ. Bull.*, 1998, 7, 244-257.
- Klobes, U., Vetter W., Luckas, B., Skirnisson, K. and J. Plötz. Levels and enantiomeric ratios of alpha-HCH, oxychlordane, and PCB 149 blubber of harbour seals (*Phoca vitulina*) and grey seals (*Halichoerus grufus*) from iceland and further species. *Chemosphere*, 1998, 37, 2501-2512.
- Kallenborn, R., S. Planting, J.-E. Haugen and S. Nybø. Congener-, isomer- and enantiomer-specific distribution of organochlorines in dippers (*Cinclus Cinclus L.*) from southern Norway. *Chemosphere*, 1998, 37, 2489-2499.
- Wengatz, I., Stautamire, D.W., Gee, S.J. and B.D. Hammock. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the pyrethroid insecticide fenprothrin. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46, 2211-2221.
- T.D. Bucheli^a, S.R. Müller, S. Heberle and R.P. Schwartzbach. Occurrence and behavior of pesticides in rainwater, roof runoff, and artificial stormwater infiltration. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, 3457-3464.
- T.D. Bucheli^b, S.R. Müller, A. Voegelin and R.P. Schwartzbach. Bituminous roof sealing membranes as major source of the herbicide (R,S)-mecoprop in roof runoff waters: potential contamination of groundwater and surface waters. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, 3465-3471.
- Iwata, H., Tanabe, S., Iida, T., Baba, N., Ludwig, J.P., and R. Tatsukawa. Enantioselective accumulation of alfa-hexachlorocyclohexane in Northern Fur Seals and Double-Crested Cormorants: effects of biological and ecological factors in the higher trophic levels. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, 2244-2249.
- Willet, K.L., Ulrich, E.M. and R.A. Hites. Different toxicity and environmental fate of hexachlorocyclohexane isomers. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, 2197-2207.
-

-
- Eykholt, G.R. and D.T. Davenport. Dechlorination of the chloroacetanilide herbicides alachlor and metolachlor by iron metal. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, 1482-1487.
- Lu, C. and R.A. Renske. Air and surface chlorpyrifos residues following residential broadcast and aerosol pesticide applications. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, 1386-1390.
- Murai, S., Imajo, S., Takasu, Y., Takahashi, K. and K. Hattori. Removal of phthalic acid esters from aqueous solution by inclusion and adsorption on beta-cyclodextrin. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, 782-787.
- Brubaker Jr., W.W., and R.A. Hites. OH reaction kinetics of gas-phase alpha- and gamma-hexachlorocyclohexane and hexachlorobenzene. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, 766-769.
- Stangroom, S.J., MacLeod, C.L. and J.N. Lester. Photosensitized transformation of the herbicide 4-chloro-2-methylphenoxy acetic acid (MCPA) in water. *Wat. Res.*, 1988, 32, 623-632.
- Finizio, A., Bidleman, T.F. and S.Y. Szeto. Emission of chiral pesticides from an agricultural soil in the Fraser valley, British Columbia. *Chemosphere*, 1998, 36, 345-355.
- Chapman, P.M., Fairbrother, A. and Derek Brown. A critical evaluation of safety (uncertainty) factors for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1998, 17, 99-108.
- Zipper, C., Bolliger, C., Fleismann, T., Suter, M.J.-F., Angst, W., Müller and H.-P.E. Kohler. Fate of herbicides Mecoprop, Dichlorprop, and 2,4-D in aerobic and anaerobic sewage sludge as determined by laboratory batch studies and enantiomer-specific analysis. In: C. Zipper. *Microbial degradation and environmental fate of chiral phenoxyalkanoic acid herbicides*. Ph.D. Thesis. 1998, Chpt. 5., 73-92.
- Zipper, C., Fleismann, T. and H.-P.E. Kohler. Aerobic biodegradation of chiral phenoxyalkanoic acid derivatives during incubation with activated sludge. In: C. Zipper. *Microbial degradation and environmental fate of chiral phenoxyalkanoic acid herbicides*. Ph.D. Thesis. 1998, Chpt. 6., 93-105.
- Schurig, V. and S. Reich. Determination of the rotational barriers of atropisomeric polychlorinated biphenyls (PCBs) by a novel stopped-flow multidimensional gaschromatographic technique. *Chirality*, 1998, 10, 316-320.
- Wiberg, K., Letcher, R., Sandau, C., Duffe, J., Norstrom, R., Haglund, P. and T. Bidleman. Enantioselective gas chromatography/Mass spectrometry of methylsulfonyl PCBs with application to arctic marine mammals. *Anal. Chem.*, 1998, 70, 3845-3852.
- Bidleman, T.F., Jantunen, L.M., Harner, T., Wiberg, K., Wideman, J.L., Brice, K., Su, K., Falconer, R.L., Aigner, E.J., Leone, A.D., Ridal, J.J., Kerman, B., Finizio, A., Alegria, H., Parkhurst, W.J., and S.Y. Szeto. Chiral pesticides as tracers of air-surface exchange. *Environ. Pollut.*, 1998, 101, 1-7? (IN PRESS)
-

1997

- Van Haelst, A.G., Tromp, P.C.B., Govers, H.A.J. and P. de Voogt. On the possible coplanar conformation and dioxin-type toxicity of tetrachlorbenzyltoluenes. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 1997, 16, 214,-218.
- Weber, K., Kreuzig, R., and M. Bahadir. On enantioselective separation of phenoxypropionates using permethylated β -cyclodextrin HPLC and GC columns. *Chemosphere*, 1997, 35, 13-20.
- Oehme, M., Müller, L. and H. Karlsson. High-resolution gas chromatographic test for the characterisation of enantioselective separations of organochlorine compounds. Application to tert.-butyldimethylsilyl β -cyclodextrin. *J. Chromatog. A*, 1997, 775, 275-285.
- Hargrave, B.T., Barrie, L.A., Bidleman, T.F., and H.E. Welch. Seasonality in exchange of organochlorines between arctic air and seawater. *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31, 3258-3266.
- Ridal, J.J., Bidleman, T.F., Kerman, B.R., Fox, M.E. and W.M.J. Strachan. Enantiomers of alfa-hexachlorocyclohexane as tracer of air-water gas exchange in Lake Ontario. *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31, 1940-1945.
- Müller, M.D., Buser, H-R. and C. Rappe. Enantioselective determination of various chlordane components and metabolites using high-resolution gas chromatography with a beta-cyclodextrin derivative as chiral selector and electron-capture negative ion mass spectrometry detection. *Chemosphere*, 1997, 34, 2407-2417.
- Nezel, T., Müller-Plathe, F., Müller, M.D. and H-R. Buser. Theoretical considerations about chiral PCBs and their methylthio and methylsulfonyl metabolites being possibly present as stable enantiomers. *Chemosphere*, 1997, 35, 1895-21906.
- Vetter, W., Krock, B., Klobes, U. and B. Luckas. Enantioselective analysis of a heptachlorobornane isolated from the technical product Melipax by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45, 4866-4870.
- Falconer, R.L., Bidleman, T.F. and S.Y. Szeto. Chiral pesticides in soils of the Fraser Valley, British Columbia. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45, 1946-1951.
- Kodama, S., Yamamoto, A. and A. Matsunaga. S-Oxygenation of thiobencarb in tap water processes by chlorination. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45, 990-994.
- Vink, J.P.M. Pesticide biotransformation and fate in heterogeneous environments. Ph.D. Thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands, 1997.
- Desiderio, C., Polcaro, C.M. and S. Fanali. Stereoselective analysis of herbicides by capillary electrophoresis using sulfobutyl ether β -cyclodextrin as chiral selector. *Electrophoresis*, 1997, 18, 227-234.
- Jakubetz, H., Juza, M. and V. Schurig. Electrokinetic chromatography employing an anionic and a cationic β -cyclodextrin derivative. *Electrophoresis*, 1997, 18, 897-904.
- El Rassi, Z. Capillary electrophoresis of pesticides. Review. *Electrophoresis*, 1997, 18, 2465-2481.

Sevcik, J., Lemr, K., Stransky, Z., Vecera, T. and J. Hlavac. Possible uses of micellar electrokinetic capillary chromatography and high-performance liquid chromatography for the chiral discrimination of some pyrethroids. *Chirality*, 1997, 9, 162-166.

Biedermann, P.U., Shurig, V. and I. Agranat. Enantiomerization of environmentally significant overcrowded polychlorinated biphenyls (PCBs). *Chirality*, 1997, 9, 350-353.

Vetter, W., Klobes, U., Luckas, B. and G. Hottinger. Enantiomer separation of selected atropisomeric polychlorinated biphenyls including PCB 144 on tert.-butyldimethylsilylated β -cyclodextrin. *Journal Chromatogr. A*, 1997, 769, 247-252.

Vetter, W., Klobes, U., Luckas, B. and G. Hottinger. Enantiomeric resolution of persistent compounds of technical toxaphene (CTTs) on t-butyldimethylsilylated β -cyclodextrin phases. *Chromatographia*, 1997, 45, 255-262.

Crommentuijn, T., Kalf, D.F., Polder, M.D., Posthumus, R. and E. van de Plassche. Maximum permissible concentrations and negligible concentrations for pesticides. 1997. (RIVM no. 601501002 RIVM report Annex with underlying data).

Wiberg, K., Jantunen, L.M., Harner, T., Wideman, J.L., Bidleman, T.F., Brice, K., Su, K., Falconer, R.L., Leone, A.D., Parkhurst, W. and H. Alegria. Chlordane enantiomers as source markers in ambient air. *Organohalogen Compd.*, 1997, 33, 209-213.

Blaser, H.-U. and F. Spindler. Enantioselective catalysis for agrochemicals: the case history of the Dual Magnum herbicide. *Chimia*, 1997, 51, 297-299.
Kohler, E., H.-P., Angst W., Giger, W., Kanz, C., Müller, S. and M. J.-F. Suter. Environmental fate of chiral pollutants - the necessity of considering stereochemistry. *Chimia*, 1997, 51, 947-951.

1996

Haglund, P. Isolation and characterisation of polychlorinated biphenyl (PCB) atropisomers, *Chemosphere*, 1996, 32, 2133-2140.

Möller, K., Hühnerfuss, H. and D. Wölfe. Differential effects of the enantiomers of α -Hexachlorocyclohexane (α -HCH) on cytotoxicity and growth stimulation in primary Rat hepatocytes. *Organohal. Compounds*, 1996, 29, 357.

Verschueren, K. Handbook on Environmental Data on Organic Chemicals. 3th edition. 1996. Van Nostrand Reinhold. ISBN: 0-442-01916-5.

de Voogt, P. Ecotoxicology of chlorinated aromatic hydrocarbons. In: Chlorinated Organic Micropollutants. R.E. Hester and R.M. Harrison (eds.) Issues in Environmental Science and Technology, Number 6, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1996, p 89-112.

Blanch, G.P., Glausch, A., Schurig, V., Serrano, R. and M.J. Gonzalez. Quantification and determination of enantiomeric ratios of chiral PCB 95, PCB 132, and PCB 149 in shark liver samples (*C. coelolepis*) from the Atlantic Ocean. *J. High Res. Chromatogr.*, 1996, 19, 392-396.

McConnell, L.L., Kucklick, J.R., Bidleman, T.F., Ivanov, G.P. and S.M. Chernyak. Air-water gas exchange of organochlorine compounds in Lake Baikal, Russia. *Environ. Sci. Technol.*, 1996, 30, 2975-2983.

Simoni, S., Klinke, S., Zipper, C., Angst, W. and H.-P.E. Kohler. Enantioselective metabolism of chiral 3-phenylbutyric acid, an intermediate of linear alkylbenzene degradation, by *Rhodococcus rhodochrous* PB1. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62, 749-755.

Mechref, Y. and Z. El Rassi. Capillary electrophoresis of herbicides. 1. Precolumn derivatization of chiral and achiral phenoxy acid herbicides with a fluorescent tag for electrophoretic separation in the presence of cyclodextrins and micellar phases. Anal. Chem., 1996, 68, 1771-1777.

Williams, A. Opportunities for chiral agrochemicals. Review. Pestic. Sci., 1996, 46, 3-9.

Haglund, P. and K. Wiberg. Determination of gas chromatographic elution sequences of the (+)- and (-)-enantiomers of stable atropisomeric PCBs on Chrasil-Dex. J. High Resolut. Chromatogr., 1996, 19, 373-376.

1995

Govers, H.A.J. and P. De Voogt. Gas chromatographic derivation of the solubility parameters of polychlorinated biphenyls with the inclusion of *cis-trans* and optical isomerism and orientational disorder. SAR QSAR Environ Res., 1995, 3, 315-324.

Letcher, R.J., Norstrom, R.J. and Å. Bergman. An integrated analytical method for determination of polychlorinated aryl methyl sulfone metabolites and polychlorinated hydrocarbon contaminants in biological matrices. Anal. Chem., 1995, 67, 4155-4163.

Jantunen, L.M. and T.F. Bidleman. Reversal of air-water gas exchange of hexachlorocyclohexanes in the Bering and Chukchi Seas: 1993 versus 1988. Environ. Sci. Technol., 1995, 29, 1081-1089. (data, locatie info voor Jantunen and Bidleman, 1997)

Buser, H.-R. and M.D. Müller. Isomer-selective and enantiomerselective determination of DDT and related compounds using chiral high-resolution gas chromatography/mass spectrometry and chiral high-performance liquid chromatography. Anal. Chem., 1995, 67, 2691-2698.

Oehme, M., Schlabach, M., Hummert, K., Luckas, B., and E.S. Nordøy. Determination of levels of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, biphenyls and pesticides in harp seals from the Greenland Sea. Sci. Total Environ., 1995, 162, 75-91.

Glausch, A., Hahn, J. and V. Schurig. Enantioselective determination of chiral 2,2',3,3',4,6'-hexachlorobiphenyl (PCB 132) in human milk samples by multidimensional gas chromatography/electron capture detection and by mass spectrometry. Chemosphere, 1995, 30, 2079-2085.

Hühnerfuss, H., Pfaffenberger, B., Gehrke, B., Karbe, L., König, W.A., and O. Landgraff. Stereochemical effects of PCBs in the marine environment: seasonal variation of coplanar and atropisomeric PCBs in blue mussels (*Mytilus edulis* L.) of the German Bight. Mar. Pollut. Bull., 1995, 30, 332-340.

Buser, H.-R. and M.D. Müller. Isomer and enantioselective degradation of hexachlorocyclohexane isomers in sewage sludge under anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol., 1995, 29, 664-672.

Schurig, V., Glausch, A. and M. Fluck. On the enantiomerization barrier of atropisomeric 2,2',3,3',4,6'-hexachlorobiphenyl (PCB132). *Tetrahedron: Assymetry.*, 1995, 6, 2161-2164.

Reist, M., Testa, B., Carrupt, P.-A., Jung, M. and V. Schurig. Racemization, enantiomerization, diastereomerization, and epimerization: their meaning and pharmacological significance. *Chirality*, 1995, 7, 396-400.

Falconer, R.L., Bidleman, T.F., Gregor, D.J., Semkin, R. and C. Teixeira. Enantioselective breakdown of alfa-hexachlorocyclohexane in a small arctic lake and its watershed. *Environ. Sci. Technol.*, 1995, 29, 1297-1302.

Falconer, R.L., Bidleman, T.F. and D.J. Gregor. Air-water gas exchange and evidence for metabolism of hexachlorocyclohexanes in resolute bay, N.W.T. *Sci. Total Environ.*, 1995, 160/161, 65-74.

Hummert, K., Vetter, W. and B. Luckas. Levels of alpha-HCH, lindane, and enantiomeric ratios of alpha-HCH in marine mammals from the northern hemisphere. *Chemosphere*, 1995, 31, 3489-3500.

1994

Pfaffenberger, B., Hühnerfuss, H., Gehrcke B., Hardt, I., König, W.A. and G. Rimkus. Gas chromatographic separation of the enantiomers of bromocyclohexane in fish samples. *Chemosphere*, 1994, 29, 1385-1391.

Glausch, A, Nicholson, G.J., Fluck, M. and V. Schurig. *J. High Resol. Chromatogr.*, 1994, 17, 347-349.

Müller, M.D. and H.-R. Buser. Identification of the (+)- and (-)-enantiomers of chiral chlordane compounds using chiral high-performance liquid chromatography/chiroptical detection and chiral high-resolution gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 1994, 66, 2155-2161.

Tanabe, S., Sung, J.K., Choi, D., Baba, N., Kiyota, M., Yoshida, K. and R. Tatsukawa. Persistent organochlorine residues in northern fur seal from the Pacific coast of Japan since 1971. *Environ. Pollut.*, 1994, 85, 305-314.

Hardt, I.H., Wolf, C. Gehrcke, B., Hochmuth, B., Pfaffenberger, B., Hühnerfuss, H. and W.A. König. Gas chromatographic enantiomer separation of agrochemicals and polychlorinated biphenyls (PCBs) using modified cyclodextrins. *J. High Res. Chromatogr.*, 1994, 17, 859-864.

König, W.A., Hardt, I.H., Gehrcke, B., Hochmuth, D.H., Hühnerfuss, H., Pfaffenberger, B. and G. Rimkus. Optically active reference compounds for environmental analysis obtained by preparative enantioselective gas chromatography. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1994, 33, 2085-2087. German version: *Angew. Chem.*, 1994, 106, 2175-2177.

Kallenborn, R., Oehme, M., Vetter, W. and H. Parlar. Enantiomer selective separation of toxaphene congeners isolated from seal blubber and obtained by synthesis. *Chemosphere*, 1994, 28, 89-98.

Tett, V.A., Willetts, A.J. and H.M. Lappin-Scott. Enantioselective degradation of the herbicide mecoprop [2-(2-methyl-4-chlorophenoxy)propionic acid] by mixed and pure bacterial cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1994, 14, 191-200.

Pfaffenberger, B., Hardt, I., Hühnerfuss, H., König, W.A., Rimkus, G., Glausch, A., Schurig, V. and J. Hahn. Enantioselective degradation of α -Hexachlorocyclohexane and cyclodiene insecticides in roe-deer liver samples from different regions of Germany. *Chemosphere*, 1994, 29, 1543-1554.

Deo, P.G., Karanth, N.G. and N.G.K. Karanth. Biodegradation of hexachlorocyclohexane isomers in soil and food environment. *Crit. Rev. Microbiol.*, 1994, 20, 57-78.

Van de Plassche, E.J. towards integrated environmental quality objectives for several compounds with a potential for secondary poisoning. 1994. (RIVM no. 679101012 + RIVM report Annex with underlying data).

Oehme, M., Kallenborn, R., Wiberg, K. and C. Rappe. Simultaneous enantioselective separation of chlordans, nonachlor compounds and *o,p'*-DDT in environmental samples using tandem capillary columns. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1994, 17, 583-588.

1993

Ariëns, E.J. Nonchiral, homochiral and coposite chiral drugs. *TiPS*, 1993, 141, 68-75.

Millership, J.S. en A. Fitzpatrick. Commonly used chiral drugs: a survey. *Chirality*, 1993, 5, 573-576.

LaManna, J.C., Harrington, J.F., Vendel, L.M., Abi-Saleh, K., Lust, W.D. and S.I. Harik. Regional blood-brain lactate influx. *Brain Res.*, 1993, 614, 164-170.

Möller, K. and H. Hühnerfuss. On the diversity of enzymatic degradation pathways of α -hexachlorocyclohexane as determined by chiral chromatography. *J. High Resol. Chromatog.*, 1993, 16, 672-673.

Iwata, H., Tanabe, S. Sakai, N. and R. Tatsukawa. Distribution of persistent organochlorines in the oceanic air and surface seawater and the role of oceans on their global transport and fate. *Environ. Sci. Technol.*, 1993, 27, 1080-1098.

Buser, H-R. and M.D. Müller. Enantioselective determination of Chlordane components, metabolites, and photoconversion products in environmental samples using chiral high-resolution gas chromatography and mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 1993, 27, 1211-1220.

Van Urk, G., Kerkum, F. and C.J. van Leeuwen. Insects and insecticides in the lower Rhine. *Wat. Res.*, 1993, 27, 205-213.

1992

Gintautas, P.A., Daniel, S.R. and D.L. Macalady. Phenoxyalkanoic acid herbicides in municipal landfill leachates. *Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26, 517-521.

Hühnerfuss, H., Kallenborn, R., König, W.A. and G. Rimkus. Preferential enrichment of the (+)- α -Hexachlorocyclohexane enantiomer in cerebral matter of harbour seals. *Organohalogen Compd.*, 1992, 10, 97-100.

Buser, H.R. and M.D. Müller. Enantiomer separation of chlordane components and metabolites using chiral high-resolution gas chromatography and detection by mass spectrometric techniques. *Anal. Chem.*, 1992, 64, 3168-3175.

Hühnerfuss, H. and R. Kallenborn. Chromatographic separation of marine organic pollutants. *J. Chromatogr.*, 1992, 580, 191-214.

Buser, H.-R., Müller, M.D. and C. Rappe. Enantioselective determination of chlordane components using chiral high-resolution gas chromatography-mass spectroscopy with application to environmental samples. *Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26, 1533-1540.

Thurman, E.M., Goolsby, D.A., Meyer, M.T., Milis, M.S., Pomes, M.L. and E.W. Kolpin. A reconnaissance study of herbicides and their metabolites in surface water of the midwestern United States using immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26, 2440-2447.

Hoff, R.M., Muir, D.C.G. and N.P. Grift. Annual cycle of polychlorinated biphenyls and organohalogen pesticides in air in Southern Ontario. 1. Air concentration data. *Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26, 266-275.

Hoff, R.M., Muir, D.C.G. and N.P. Grift. Annual cycle of polychlorinated biphenyls and organohalogen pesticides in air in Southern Ontario. 2. Atmospheric transport and sources. *Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26, 276-283.

Hühnerfuss, H., Faller, J., König, W.A. and P. Ludwig. Gas chromatographic separation of the enantiomers of marine pollutants. 4. Fate of hexachlorocyclohexane isomers in the Baltic and North Sea. *Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26, 2127-2133.

Ludwig, P., Gunkel, W. and H. Hühnerfuss. Chromatographic separation of the enantiomers of marine pollutants. Part 5: Enantioselective degradation of phenoxy-carboxylic acid herbicides by marine microorganisms. *Chemosphere*, 1992, 24, 1423-1429.

Pfaffenberger, B., Hühnerfuss, H., Kallenborn, R., Köhler-Günther, A., König, W.A. and G. Krüner. Chromatographic separation of the enantiomers of marine pollutants. Part 6: Comparison of the enantioselective degradation of alpha-hexachlorocyclohexane in marine biota and water. *Chemosphere*, 1992, 25, 719-725.

Vink, J.P.M. and K.P. Groen. Mathematical description of accelerated transformation of 1,3-dichloropropene in soil; a microbiological assessment. *Sci. Total Environ.*, 1992, 123/124, 591-603.

Heron, G. and T.H. Christensen. Degradation of the herbicide mecoprop in an aerobic aquifer determined by laboratory batch studies. *Chemosphere*, 1992, 24, 547-557.

Eckhardt, W., Francotte, E., Herzog, J., Margot, P., Rihs, G. and W. Kunz. Synthesis and fungicidal activities of CGA 80000 (alpha-[N-(3-chloro-2,6-xyllyl)-2-methoxyacetamido]-gamma-butyrolactone) and of its four isomers. *Pestic. Sci.*, 1992, 36, 223-232.

1991

Kwon, Y.-W. and D.J. Triggle. Chiral aspects of drug action at ion channels: a commentary on the stereoselectivity of drug actions at voltage-gated ion channels with particular reference to Verapamil actions at the Ca²⁺ channel. *Chirality*, 1991, 3, 393-404.

Kaye, B. Chiral drug metabolism; a perspective. *Biochem. Soc. Trans.*, 1991, 19, 456-459.

Oehme, M. Further evidence for long-range air transport of polychlorinated aromates and pesticides: North America and Eurasia to the Arctic. *Ambio*, 1991, 20, 293-297.

König, W.A., Icheln, D., Runge, T., Pfaffenberger, B., Ludwig, P., and H. Hühnerfuss. Gas chromatographic enantiomer separation of agrochemicals using modified cyclodextrines. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1991, 14, 530-536.

Kallenborn, R., Hühnerfuss, H. and W.A. König. Enantioselektiver Metabolismus von (±)-alfa-1,2,3,4,5,6,-Hexachlorcyclohexan in Organen der Eiderente. *Angew. Chem.* 1991, 103, 238-329?. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, 30, 320-321.

1989

Püttmann, M., Mannschreck, A., Oesch, F. and L. Robertson. *Biochem. Pharmacol.*, 1989, 38, 1345-1352.

Blessington, B. and N. Crabb. Proposed primary reference method for the determination of some commercially important chiral aryloxypropionate herbicides in both free acid and ester forms. *J. Chromatogr.*, 1989, 483, 349-358.

1988

Slooff, W. en A.J.C.M. Matthijsen (eds). Integrated criteria document hexachlorcyclohexanes. RIVM rapport: 758473011, october 1988.

1986

Bewick, D.W. Stereochemistry of fluzifop-butyl transformation in soil. *Pestic. Sci.*, 1986, 17, 349-356.

1984

Mathur, R., Saxena, D.M. and H.C. Agarwal. Growth of a ciliate Protozoan, *Tetrahymena pyriformis* in the presence of different isomers of hexachloro-cyclohexane (HCH). *Acta Protozoolog.*, 1984, 23, 165-174.

Simonyi, M. On chiral drug action. *Med. Res. Rev.*, 1984, 4, 359-413.

1982

Moser, H., Rihs, G., en H. Sauter. Der Einfluss von atropisomerie und chiralem Zentrum auf die biologische Aktivität des Metolachlor. *Z. Naturforsch.*, 1982, 87B, 451-462.

1980

Miyazaki, A., M. Sakai en S. Marumo. Synthesis and biological activity of optically active heptachlor, 2-chloroheptachlor, and 3-chlorheptachlor. J. Agric. Food Chem., 1980, 28, 1310-1311.

1978

Miyazaki, A., Hotta, T., Marumo, S. en M. Sakai. Sythesis, absolute stereochemistry, and biological activity of optical active cyclodiene insecticides. J. Agric. Food Chem., 1978, 26, 975-977.

1976

McBain, W.A., Lewin, V. en W.H. Wolfe. Differing estrogenic activity for the enantiomers of o,p'-DDT in immature female rats. Can. J. Physiol. Pharm., 1976, 54, 629-632.

Roberts, T.R. en G. Stoydin. The degradation of (Z)- and (E)-1,3-dichloropropenes and 1,2-dichloropropane in soil. Pestic. Sci., 1976, 7, 325-335.

1975

Canton, J.H., Greve, P.A., Slooff, W. and G.J. van Esch. Toxicity, accumulation and elimination studies of α -Hexachlorocycloheane (α -HCH) with freshwater organisms of different trophic levels. Wat. Res., 1975, 9, 1163-1169.

1970

Schwemmer, B., Cochrane, W.P. en P.B. Polen. Oxychlordane, animal metabolite of chlordane: isolation an synthesis. Science, 1970, 169, 1087.