Toxikokinetik von östrogenartig wirkenden Industriechemikalien und Phytoöstrogenen

- Etablierung und Anwendung von analytisch-chemischen Verfahren -

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Universität Dortmund

vorgelegt von
Andreas Upmeier
aus Dortmund

Dortmund
- 2001 -

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. B. Lippert
Tag der mündlichen Prüfung:	15.05.2001

„All things are endocrine and nothing is without endocrine potential. Solely the dose determines that a thing is not an endocrine disruptor“

(F. W. Jekat 1998, frei nach Paracelsus)

„in vivo veritas“

(H. Michna 1999, während eines Projekttreffens)

„meinen lieben Eltern und meiner lieben Schwester gewidmet“

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1997 bis Mai 2000 am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund durchgeführt und stand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, für die Betreuung der Arbeit und für die kontinuierliche Unterstützung in allen Bereichen meiner wissenschaftlichen Tätigkeiten.

Herrn Prof. Dr. B. Lippert möchte ich für die freundliche Übernahme des Koreferates danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. G. H. Degen für die ständige und intensive Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Hilfen in allen Bereichen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. H. Certa der Toxikologie der Hüls AG in Marl danke ich für die Möglichkeit, einen Teil meiner experimentellen Untersuchungen in seinem Bereich durchführen, und somit meine analytischen Kenntnisse dort erweitern zu können. Hierbei möchte ich insbesondere auch Frau R. Hamphoff-Köhler und Frau B. Schendzielorz für ihre kompetente Mitarbeit und die freundliche Aufnahme in den dortigen Kollegenkreis danken.

Während meiner experimentellen Arbeit wurde ich von Frau Dr. U. Schuhmacher und Frau Dr. P. Janning durch zahlreiche Anregungen und Diskussionen intensiv unterstützt, wofür ich mich ganz herzlich bedanke.
Weiterhin danke ich Frau D. Dannappel und Frau A. Castro für die umfangreichen und zuverlässigen Hilfen bei den Probengewinnungen und -aufarbeitungen.

Für die Bereitstellung von Probenmaterial danke ich desweiteren Herrn Prof. H. Michna und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe an der Deutschen Sporthochschule in Köln.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dr. M. Blaszkewicz und Herrn Dr. M. Kleber für ihre stete Diskussionsbereitschaft bei analytischen Fragestellungen und an Herrn C. Lippmann für seinen unermüdlichen praktischen Beistand bei der Lösung technischer Probleme.

Schließlich danke ich noch allen nicht namentlich genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für das angenehme Arbeitsklima und die kollegiale Zusammenarbeit.

Abschließend gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meinen lieben Eltern, für ihre stete Unterstützung während meines gesamten bisherigen beruflichen Werdeganges.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

a	Blindwertbeitrag
Abb.	Abbildung
APEO	Alkylphenolethoxylat
AUC	area under the curve (Fläche unter der Kurve)
BHT	Butylhydroxytoluol (2,6-Di-*tert*-butyl-*p*-kresol)
BPA	Bisphenol A, 2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)propan
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
BUT	*p-tert*-Butylphenol
c	Konzentration
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
CEFIC	Conseil Européen des Fédération de l'Industrie Chimique
CI	Chemische Ionisation
CIIT	Chemical Industry Institute of Toxicology (Centers for Health Research)
c_L	Nachweisgrenze
DA/Han	Dark Agouti / Hannover
DAS	4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DDD	Dichlordiphenyldichlorethan
DDE	Dichlordiphenyldichlorethen
DES	Diethylstilbestrol
DB	Durabond
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAC	endocrine active compound
EC_{50}	Konzentration, die zu 50 % der maximalen Aktivität führt
ECETOC	European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals
ED	endocrine disruptor, endokriner Disruptor
EDC	endocrine-disrupting chemical
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
ER	estrogen receptor, Östrogenrezeptor
ESI-LC/MS	electrospray ionization-liquid chromatography/mass spectrometry
EU	Europäische Union
F	Bioverfügbarkeit
GC	Gaschromatographie
Gl.	Gleichung
GLP	Good Laboratory Practice (Gute Laborpraxis)
HAA, HAC	hormonally active agent, hormonally active compound
HPLC	high-performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
ID	innerer Durchmesser
IfADo	Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund
i.p.	intraperitoneal

i.v.	intravenös
IS	Interner Standard
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KG	Körpergewicht
m	Steigung einer Kalibrierfunktion
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspekrometrie
MTBE	Methyl-*tert*-butylether
n	Anzahl der Messungen
NOAEL	no observed adverse effect level
NP	Nonylphenol
OP	*p*-*tert*-Octylphenol
p.a.	*pro analysis*
p.o.	*per os* (oral per Schlundsonde)
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCB	polychlorierte Biphenyle
PTFE	Polytetrafluorethylen
r^2	Regressionskoeffizient zum Quadrat
RP	reversed phase
RPP	relative proliferative Potenz
RUCA	rat uterine carcinoma cells
s.c.	*subcutaneus*, subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIM	single ion monitoring (Einzelionenmonitoring)
SPI	The Society of the Plastics Industry, Inc.
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin
TMCS	Trimethylchlorsilan
UV-VIS	Ultraviolett-sichtbare Strahlung
VB	Vollblut
VCI	Verband der Chemischen Industrie e.V.
VK	Variationskoeffizient
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WHO	World Health Organization
WR	Wiederfindungsrate
x_i	Zahlenwert einer Probe
$\bar{x}$	Mittelwert
y	Meßsignal
YES	yeast estrogen system (Hefetest)
σ_{abs}	absolute Standardabweichung
σ_{rel}	relative Standardabweichung

1 Einleitung

1.1 Ausgangssituation

Seit einigen Jahren wird sowohl in der Öffentlichkeit als auch in der Wissenschaft intensiv darüber diskutiert, inwieweit Chemikalien mit Wirkungen auf das Hormonsystem die menschliche Gesundheit beeinflussen können.
So werden verminderte Spermienzahlen und vermehrtes Auftreten von Hodentumoren bei Männern sowie Brustdrüsentumoren bei Frauen hiermit in Verbindung gebracht, ebenso ein gestörtes Reproduktionsverhalten wildlebender Tiere. Als Ursache werden in die Umwelt freigesetzte Chemikalien mit hormonähnlicher Wirkung angesehen. Als weitere Quelle gelten von Mensch und Tier ausgeschiedene Hormone mit Steroidstruktur. Diese Diskussion wurde vor allem durch die Veröffentlichung von Colburn, Dumanoski und Myers „Die bedrohte Zukunft: Gefährden wir unsere Fruchtbarkeit und Überlebensfähigkeit“ (1996), im Original “Our stolen future“, allgemein bekannt.

Beispiele

Begründet werden oben genannte Vermutungen u. a. durch die Folgen der zwischen 1945 und 1970 durchgeführten Behandlung Schwangerer bei drohender Fehlgeburt (insgesamt 4 - 6 Millionen Frauen) mit dem synthetischen Östrogen Diethylstilböstrol (DES) in hohen Dosen. DES weist eine höhere östrogene Potenz auf als das endogene Östrogen 17β-Östradiol (Golden et al. 1998). Herbst et al. (1971) fanden heraus, daß es bei den Töchtern dieser Frauen zu einem vermehrten Auftreten einer ansonsten seltenen Form von Vaginalkrebs kam. Bei den Söhnen traten Entwicklungsstörungen der Geschlechtsorgane auf.

Als weiteres Indiz wird die Publikation von Carlsen und Mitarbeitern (1992) angeführt: Sie hatte insgesamt 61 frühere Untersuchungen über die Spermienzahlen bei Männern ohne Anzeichen von Fertilitätsstörungen ausgewertet und festgestellt, daß zwischen 1938 und 1990 eine Abnahme von 113 Millionen auf 66 Millionen Spermien pro Milliliter Samenflüssigkeit zu verzeichnen war. Die bereits genannten Entwicklungsstörungen und dieser Rückgang der Spermienzahlen könnten nach einer Hypothese von Sharpe und Skakkebæk (1993) mit einer erhöhten Exposition *in utero* gegenüber östrogenähnlich wirkenden Arzneimitteln, pflanzlichen Östrogenen und Industriechemikalien mit östrogener Wirkung in der Umwelt zusammenhängen. Andere Arbeitsgruppen dagegen zweifeln eine Abnahme der Spermienanzahl generell an, wobei sie auf nicht vergleichbare Auszählungsmethoden und fehlerhafte Schlußfolgerungen der retrospektiven epidemiologischen Studien hinweisen. So berichten Rasmussen et al. (1997) von gleichbleibender Spermienkonzentration in Dänemark während der letzten 20 - 30 Jahre. Auch Handelsman (1997) hat in Australien bei potentiellen Samenspendern im Zeitraum 1980 - 1995 keine zeitabhängigen Unterschiede in der Spermienkonzentration feststellen können.

Die Angst vor Entwicklungsstörungen durch hormonell aktive Chemikalien wird auch durch Erkenntnisse an wildlebenden Tieren unterstützt. So zum Beispiel die Beobachtung, daß DDT bei Greifvögeln, die am Ende der Nahrungskette stehen, im Körper akkumulierte und zu Reproduktionsstörungen führte (z. B. zu dünne, nicht intakte Eierschalen). Ein weiteres Beispiel ist die Beobachtung von Guilette et al. (1994) nach einem Industrieunfall in Florida. Dort waren größere Mengen des Insektizids Dicofol (1,1-Bis-(4-chlorphenyl)-2,2,2-trichlorethanol; wahrscheinlich mit DDT kontaminiert), das strukturell dem DDT verwandt ist, in einen See gelangt. Einige Jahre später wurden bei Alligatormännchen verkleinerte Penisse festgestellt und die Schlupfrate der Nachkommen war signifikant verringert. Bei einigen Raubfischarten und Möwen, die sich von belasteten Fischen ernährten, wurden bei den Nachkommen mehr Weibchen als Männchen gezählt.

Stoffe mit östrogenem Wirkpotential

Chemikalien mit östrogen-ähnlichen Wirkungen werden generell als „Xenoöstrogene“ bezeichnet. Im angelsächsischen Sprachraum werden diese und andere endokrin wirksamen Stoffe als “endocrine disruptors“ oder mit dem Oberbegriff “endocrine-disrupting chemicals“ bezeichnet. Zunehmend setzen sich Bezeichnungen wie “endocrine active compound“ oder “hormonally active compound/agent“ durch, welche die hormon-ähnliche Wirkung wertungsfreier beschreiben. Endokrin wirksame Substanzen sollten nicht *per se* -wie der Begriff „Disruptor“ suggerieren könnte- als negativ oder schädlich wirkende Verbindungen gesehen werden, da am Beispiel der Phytoöstrogene erkennbar ist, daß ihnen auch positive oder sogar therapeutische

Bedeutungen zugeschrieben werden können (s. Kap. 1.7 „Phytoöstrogene"). Eine endokrine Modulation ist also nicht zwangsläufig mit einem adversen Effekt gleichbedeutend.

Viele der Chemikalien und Stoffe, die der Mensch mit der Nahrung aufnimmt, oder denen er in seiner Umwelt ausgesetzt ist, stehen im Verdacht, ein östrogenähnliches Wirkpotential zu besitzen. Bei diesen handelt es sich um Herbizide, Fungizide, Organochlor-Insektizide, Nematozide, Schwermetalle, polychlorierte Biphenyle und Phthalate. Dazu kommen die Phytoöstrogene, d. h. pflanzliche Inhaltsstoffe mit einem östrogenen Wirkpotential (s. Kap. 1.7; Harborne 1995, Schäfer et al. 1996).
Von Colburn et al. (1993) wurden 45 Chemikalien zusammengestellt, denen ein Einfluß auf das Reproduktionssystem des Menschen zugeschrieben wird, darunter die polychlorierten Biphenyle, Dibenzodioxine, Dibenzofurane und DDT. In einer Literaturstudie von Gülden et al. (1997) werden ca. 180 synthetische Chemikalien mit einer östrogenen Aktivität aufgeführt. Die Anzahl der Chemikalien mit bekanntem östrogenen Wirkpotential wird mit mehreren Hundert angegeben. Meist handelt es sich um Phenole und Bisphenole. Einige nicht-phenolische aromatische Verbindungen entfalten östrogenähnliche Aktivität nach der Metabolisierung zu Phenolen (z. B. Methoxychlor, PAK, PCB) oder sind auch ohne Metabolisierung aktiv (z. B. *o,p'*-DDT). Einige andere Stoffe sind aktiv, ohne über eine aromatische Struktur zu verfügen (Endosulfan, Dieldrin, Kepon, Toxaphen). Unter den in der Umwelt vorkommenden Stoffen sind neben den Pflanzenschutzmitteln insbesondere die antiöstrogenen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK), z. B. aus der unvollständigen Verbrennung fossiler Energieträger, von Bedeutung.
Stoffe mit Verdacht auf ein östrogenes Wirkpotential sind in Tabelle 1 exemplarisch aufgelistet.
In der Abbildung 1 sind beispielhaft die Strukturformeln von Substanzen mit mehr oder weniger ausgeprägtem östrogenem Wirkpotential dargestellt.

Tab. 1: Stoffe mit Verdacht auf ein östrogenes Wirkpotential (Schäfer et al. 1996)

Pestizide	Aldrin Atrazin 2,4-Dichlorphenol Dicofol DDT (*o,p'*-Komponente) Dieldrin Endosulfan Heptachlor Hexachlorcyclohexan (β-HCH und γ-HCH = Lindan) Kepon (Chlordecon) Methoxychlor Toxaphen
Andere Chemikalien	Alkylphenole (*p*-Nonylphenol, *p*-Octylphenol) Benzophenon Bis-(2-ethylhexyl)adipat (DEHA) Bisphenol A Bisphenol A-dimethacrylat Butylbenzol *t*-Butylhydroxyanisol Nitrotoluol Phthalate (Butylbenzylphthalat, Di-n-butylphthalat) Polychlorierte Biphenyle Polychlorierte Hydroxybiphenyle
Phytoöstrogene	Coumestrol Daidzein Formononetin Genistein Tetrahydrocannabiol
Mykotoxine	Zearalenon α- und β-Zearalenol

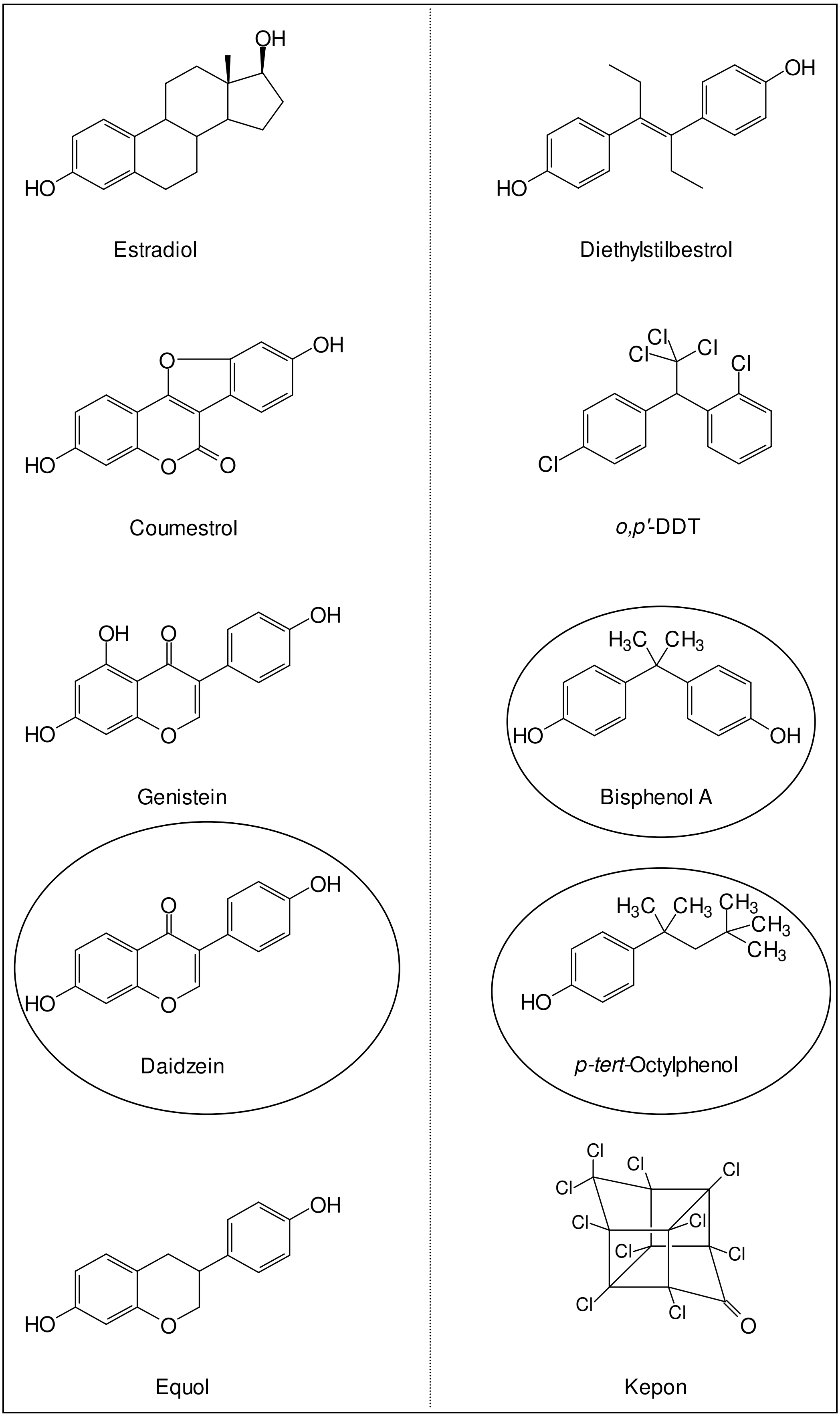


Abb. 1: Stoffe mit östrogenem Wirkpotential
Linke Spalte: natürlich vorkommende Stoffe, rechte Spalte: synthetische Stoffe
(eingekreiste Stoffe sind Modellsubstanzen der vorliegenden Studien)

In Analogie zu dem Zitat von Paracelsus über die Bedeutung der Dosis für eine Wirkung wurde über sogenannte “endocrine disrupting chemicals“ gesagt:
“All things are endocrine and nothing is without endocrine potential.
Solely the dose determines that a thing is not an endocrine disruptor“ (Jekat 1998).
Damit wird angedeutet, daß wohl sehr viele Stoffe über ein hormonelles Wirkpotential verfügen. Die entscheidenden Größen für eine Bewertung sind jedoch die Wirkstärke (östrogene Potenz) der Substanzen und die Höhe der Exposition (Dosis).

1.2 Prüfverfahren

In Screening-Tests kann mit Rezeptorbindungsstudien die Affinität von unterschiedlichsten Stoffen zum Östrogenrezeptor *in vitro* geprüft werden (s. Tabelle 2; Gaido et al. 1997). Abbildung 2 zeigt schematisch wie z. B. das Phytoöstrogen Daidzein anstelle von 17β-Östradiol an einen Östrogenrezeptor binden kann. Für Phytoöstrogene und synthetische Chemikalien ist allerdings festzustellen, daß sie aufgrund ihrer geringen Affinität zum Östrogenrezeptor generell eine erheblich geringere Wirkstärke besitzen als die im menschlichen Körper natürlich vorkommenden Hormone selbst. Außerdem läßt sich anhand von Bindungsstärken allein nicht zwischen Östrogenen und Antiöstrogenen unterscheiden; zudem können im sogenannten YES-Assay (Hefetest) sowohl Agonisten als auch Antagonisten eine Reportergen-Aktivierung verursachen. Sonnenschein et al. (1995) untersuchten *in vitro* die proliferationssteigernde Wirkung in östrogen-sensitiven Zellen und fanden für die untersuchten Chemikalien wie *p-tert*-Octylphenol oder Bisphenol A eine um 3 bzw. 4 Größenordnungen geringere Wirkstärke gegenüber dem körpereigenen Östradiol (s. Tabelle 3).

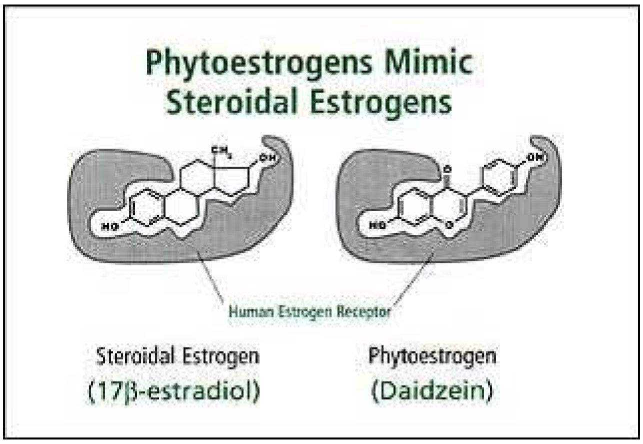


Abb. 2: Imitation von 17β-Östradiol durch Daidzein am Östrogenrezeptor
(Quelle: http://www.novogen.com/html/update.html; 12.11.1999)

Tab. 2: Östrogene Potenz im Hefetest (YES-Assay)
Bindung an Östrogenrezeptor und Expression eines Reportergens
(Gaido et al. 1997)

Stoff	**EC_{50} [mol/l]** *	**relative Wirkstärke** $EC_{50\ Testsubstanz}$ / $EC_{50\ Östradiol}$
Östradiol	$2{,}25 \times 10^{-10}$	1,00
Diethylstilböstrol	$3{,}53 \times 10^{-10}$	1,57
Coumestrol	$1{,}74 \times 10^{-8}$	77
Estriol	$6{,}16 \times 10^{-8}$	273
Dihydrotestosteron	$4{,}31 \times 10^{-7}$	2 000
p-Nonylphenol	$1{,}10 \times 10^{-6}$	5 000
Bisphenol A	$3{,}40 \times 10^{-6}$	15 000
ICI 164,384	$1{,}45 \times 10^{-5}$	64 000
β-Sitosterol	$4{,}92 \times 10^{-5}$	220 000
Testosteron	$5{,}09 \times 10^{-5}$	226 000
Methoxychlor	$1{,}20 \times 10^{-3}$	5 000 000
o,p'-DDT	$1{,}81 \times 10^{-3}$	8 000 000
o,p'-DDD	$3{,}32 \times 10^{-3}$	15 000 000
o,p'-DDE	$5{,}34 \times 10^{-3}$	24 000 000

*EC_{50}: Konzentration, die zu 50 % der maximalen östrogenen Aktivität führt

Tab. 3: Östrogene Potenz im E-Screen-Test
Proliferation von Brustkrebszellen MCF-7
(Sonnenschein et al. 1995)

Stoff	**Konzentration* [nmol/l]**	**RPP** [%]**
Östradiol	0,03	100
p-Octylphenol	100	0,03
p-Nonylphenol	1 000	0,003
Benzylbutylphthalat	10 000	0,0003
Bisphenol A	1 000	0,003
Bisphenol A-dimethacrylat	1 000	0,003

*Mindestkonzentration zur Auslösung einer meßbaren Proliferation

**RPP: Relative Proliferative Potenz

$$RPP\ [\%] = (c_{Östradiol} / c_{Testsubstanz}) \times 100$$

Zum „Screening" möglichst vieler Stoffe auf ihr östrogenes Potential wurden schnelle und kostengünstige *in-vitro*-Tests entwickelt. Für die rezeptorvermittelte Wirkung lassen sich wie bereits erwähnt mit zellulären Testsystemen (Gülden et al. 1997, Zacharewski 1997, Vollmer et al. 1996) relative Wirkstärken *in vitro* ableiten.
Bei diesen *in vitro*-Tests ist jedoch nachteilig, daß z. B. die Toxikokinetik und Bioverfügbarkeit (Resorption, Verteilung, Bindung an Serumproteine, Metabolismus, Eliminierung; s. Kap. 1.3) nicht erfaßt und die östrogene Aktivität im Organismus nicht korrekt abgebildet werden können. Diese Faktoren haben jedoch einen wesentlichen Einfluß auf die Wirksamkeit im Organismus. Darüber hinaus können endogene Hormonspiegel und endokrine Regelmechanismen den qualitativen und quantitativen Befund *in vivo* modulieren. Daher weisen auch Gülden et al. (1997) eindringlich auf die bessere Aussagekraft von *in-vivo*-Tests hin. Positive Daten lediglich aus Rezeptorbindungsstudien oder aus *in-vitro*-Experimenten, bei denen häufig sehr hohe Konzentrationen zur Erzielung biologischer Effekte erforderlich sind, lassen am

östrogenen Potential einiger Stoffe unter *in-vivo*-Bedingungen zweifeln. Dies gilt besonders, wenn unterschiedliche Testsysteme zu widersprüchlichen Ergebnissen führen oder wenn die Ergebnisse *in vivo* nicht verifiziert werden können.
Je nach Art des Testsystems dienen diese qualitativ zum Nachweis einer östrogenen Wirkung (*Potential*) oder quantitativ zum Nachweis der östrogenen Wirkstärke (*Potenz*). Es ist jedoch unumstritten, daß die östrogene Wirksamkeit eines Stoffes abschließend nur mit den aufwendigen klassischen *in-vivo*-Testverfahren nachgewiesen werden kann (Ashby et al. 1997, Crisp et al. 1997 & 1998, Gülden et al. 1997, Zacharewski 1997), insbesondere auch als Basis für regulatorische Eingriffe.

1.3 Toxikokinetik

Aufgabe der Toxikokinetik ist die quantitative Untersuchung der Invasion eines Stoffes und toxikologisch relevanter Metaboliten in den Organismus und der Elimination aus dem Organismus in Abhängigkeit von der Zeit. Hierbei versteht man unter der Invasion die Aufnahme eines Stoffes in den Blutkreislauf (Resorption), seine Verteilung mit dem Blutstrom und seine Speicherung in Organen und Geweben (Distribution). Die Elimination beschreibt die Entfernung eines Stoffes aus dem Organismus. Diese umfaßt zwei Prozesse, die Ausscheidung (Exkretion) der unveränderten Substanz und die zu Folgeprodukten (Metaboliten) führende Biotransformation (Metabolismus) (Greim und Deml 1996).

Die Toxikokinetik ist von grundlegender Bedeutung für das Verständnis von Dosis-Wirkungs-Beziehungen, da anhand toxikokinetischer Daten die innere Belastung mit dem ultimal wirksamen Stoff ermittelt und mit der Wirkungsintensität verknüpft werden kann.
In toxikokinetischen Studien bestimmt man die Konzentrations-Zeit-Verläufe der applizierten Substanz und relevanter Metaboliten in Körperflüssigkeiten, Organen und Exkrementen. Aus den Konzentrations-Zeit-Verläufen lassen sich toxikokinetische Parameter wie Bioverfügbarkeit, Eliminations-Halbwertszeit u. a. errechnen (s. Kap. 2.9).

Nach der Aufnahme werden viele Stoffe über die sogenannten Phase-I-Reaktionen (z. B. Oxidation oder Reduktion) oder Phase-II-Reaktionen (z. B. Glucuronidierung

oder Sulfatierung) insbesondere in der Leber in besser wasserlösliche Verbindungen überführt, die dann über die Niere mit dem Harn ausgeschieden werden (Greim und Deml 1996). Allerdings werden nur Stoffe bis zu einer gewissen Größe auf diesem Wege ausgeschieden; beim Menschen hauptsächlich solche mit Molmassen unterhalb von 475 Da, bei Ratten unterhalb von 300 Da (Nau 1994).
Stoffe mit größeren Molmassen gelangen über die Galle in den Darm. Gallengängige Stoffe müssen aber nicht nur eine Mindestgröße aufweisen, sondern auch eine polare Gruppe enthalten. Beide Bedingungen können nach Konjugationsreaktionen der Phase II erfüllt sein. Die quantitativ größte Bedeutung hat hierbei die Konjugation mit Glucuronsäure, die durch Glucuronyltransferasen katalysiert wird. Die Konzentrationen von Fremdstoffen in der Galle können die im Plasma um ein Vielfaches übertreffen, so daß es zu hohen Konzentrationen im hepatobiliären System kommen kann. Manche der mit der Galle in den Darm gelangten Stoffe werden durch bakterielle Enzyme weiter metabolisiert. Beispielsweise können Glucuronsäurekonjugate durch bakterielle β-Glucuronidasen gespalten werden. Die freigesetzten Substanzen können über den Darm rückresorbiert werden, gelangen dann über das Pfortaderblut in die Leber und, nach Konjugation mit Glucuronsäure, mit der Galle wieder in den Darm, wo sie erneut freigesetzt werden. Dieser Prozess wird auch als *enterohepatischer Kreislauf* bezeichnet (Greim und Deml 1996).

Neben den reinen applizierten Testsubstanzen werden also auch im Organismus gebildete Metabolite mit dem Blutstrom verteilt, gespeichert und schließlich eliminiert. In dieser Arbeit wird im folgenden der nicht-metabolisierte Anteil der applizierten Substanz als „freier Gehalt“ bezeichnet. Daneben werden „Gesamt-Gehalte“ betrachtet, welche die Summe aus den „freien Gehalten“ und den Phase-II-Metaboliten bzw. Konjugaten darstellen. Wenn im nachfolgenden Text nicht näher spezifiziert, so sind stets die „freien Gehalte“ gemeint. Bei den untersuchten Modellsubstanzen weisen ausschließlich diese im Gegensatz zu den Konjugaten östrogene Aktivität auf.

1.4 Projektbeschreibung und Stoffauswahl

Die in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Aufgaben und Ergebnisse sind in das Forschungsvorhaben
„Vergleich der östrogenen Potenz ausgewählter synthetischer Chemikalien und natürlicher Östrogene. Bewertung einzelner Verbindungen“,
das als Verbundprojekt durchgeführt worden ist, eingegliedert. Dieses Verbundprojekt wurde vom Verband der Chemischen Industrie e.V. (VCI) finanziert, stand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt und ist unter Nennung der beteiligten Partner in folgende Teilbereiche gegliedert:

- Hormonelle Charakterisierung der Prüfsubstanzen mit Hilfe des RUCA-I Zellsystems
  (Prof. Dr. G. Vollmer, Lübeck / Dresden)

- *In vitro*-Aktivitätsbestimmung hormonell wirkender Verbindungen
  (Prof. Dr. G. Eisenbrand, Kaiserslautern)

- Hormonelle Aktivität der Prüfsubstanzen *in vivo*
  (Prof. Dr. Dr. H. Michna und Dr. P. Diel, Köln)

- Toxikokinetische Untersuchungen
  (Prof. Dr. G. H. Degen und Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt, Dortmund)

Ziel des Verbundprojektes war es, für eine toxikologische Bewertung östrogenartig wirkender Chemikalien wichtige Grunddaten zusammenzutragen. Erst für wenige der derzeit in Diskussion stehenden Substanzen war zuvor die relative Wirksamkeit ermittelt oder ihr Wirkmechanismus (östrogen, anti-östrogen) exakt aufgeklärt worden. Dazu dienten primär *in vitro*-Systeme wie RUCA-Zellen und MCF-7-Zellen.
Entscheidender für toxikologische Beurteilungen ist die *in-vivo*-Situation, die man hier im Versuch am Ganztier nachstellen kann. Bei den vorliegenden Wirkungsstudien wurden Ratten als Versuchstierspezies verwendet. An Ratten des selben Stammes wurden auch die Studien zur Toxikokinetik ausgewählter Prüfstoffe durchgeführt. Dies geschah mit dem Ziel, das Schicksal der Substanzen im Säugerorganismus modellhaft zu untersuchen. Hierbei wurde die Kinetik nach Gabe einer Einzeldosis sehr detailliert betrachtet. Darüber hinaus wurden Substanzspiegel in Tieren be-

stimmt, welche die Prüfstoffe im Rahmen von Wirkstudien mehrfach hintereinander erhalten hatten, um Hinweise auf eine mögliche Anreicherung im Organismus zu bekommen.

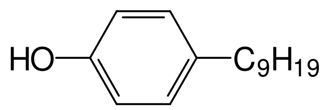
Stoffauswahl

Aus der Stoffklasse *synthetischer Chemikalien* mit hormonähnlicher Wirkung wurden jeweils Vertreter aus der Gruppe der Alkylphenole (*p-tert*-Octylphenol / Nonylphenol) und der Bisphenole (Bisphenol A) ausgewählt. Die Stoffe sind seit mehreren Jahren in laufender wissenschaftlicher Diskussion. *p-tert*-Octylphenol wurde als Modellsubstanz für Alkylphenole bzw. *p*-Nonylphenol gewählt, da dieses im Gegensatz zum *p*-Nonylphenol als reines Isomer vorliegt (s. Kap. 1.5). Die Analytik für die kinetischen Betrachtungen wären bei Verwendung eines Nonylphenol-Isomerengemisches weitaus aufwendiger gewesen.
Bei den *Phytoöstrogenen* wurde als primär zu untersuchende Substanz Daidzein gewählt. Bei dem Großteil der Daidzein-Analysen wurde im Rahmen des Verbundprojektes parallel auch Genistein quantifiziert. Zu einem geringeren Anteil wurden auch Equol-Gehalte (Daidzeinmetabolit) semiquantitativ bestimmt. Auf die Befunde zu Genistein und Equol wird in dieser Arbeit aber nur am Rande eingegangen.
Für diese zur Untersuchung ausgewählten Stoffe, deren Basisdaten für *in vitro*-Potenz bereits ermittelt worden waren, sollten grundlegende toxikokinetische Parameter wie Bioverfügbarkeit und Eliminationshalbwertszeit in *in vivo*-Versuchen bestimmt werden. Die tatsächliche *in vivo*-Wirksamkeit der einzelnen Substanzen wurde durch Parameter wie Veränderung des Uterusgewichtes bei ovariektomierten Tieren und weitere Endpunkte ermittelt (Arbeitsgruppe Prof. H. Michna, Köln).

1.5 Bedeutung und Vorkommen der Industriechemikalien *p*-Nonylphenol und *p-tert*-Octylphenol

p-Nonylphenol

Synonyma:	*p*-Nonylphenol, 4-Nonylphenol (IUPAC)
Abkürzung:	NP
CAS-Nr.:	84 852-15-3
Summenformel:	$C_{15}H_{24}O$
Strukturformel:	



Molmasse:	220,34 $gmol^{-1}$

Chemische Eigenschaften

Das *p*-Nonylphenol ist die Hauptkomponente des technischen Nonylphenols. Das technische Nonylphenol (Isononylphenol, immer mit verzweigter Seitenkette) ist ein Gemisch aus verschiedenen Isomeren und Homologen. Zum einen weist die C_9-Seitenkette unterschiedliche Verzweigungen auf, zum anderen ist die Verknüpfung zum Ring von mehreren Stellen der Seitenkette aus möglich, und weiterhin kann die Seitenkette am Ring entweder in der *p*- oder in der *o*-Position stehen. Technisch üblich ist ein etwa 9:1-Gemisch von *p*- zu *o*-Substitution. Weiterhin enthält das technische Nonylphenol stets geringe Mengen des bei der Produktion mit entstehenden Dinonylphenols (überwiegend 2,4-Dinonylphenol). Außerdem sind im technischen Nonylphenol rohstoffbedingt auch noch geringere Anteile von Alkylphenolen mit C_8- (Octylphenol) und C_{10}-Seitenketten enthalten.

Die Nonylphenole sind hochviskose, farblose bis gelblich-klare Flüssigkeiten mit schwachem phenolischem Geruch.

Verwendung

In Westeuropa wurden jährlich ca. 70 000 t Nonylphenol produziert (Stand 1987; BUA 1988), davon der größte Anteil bei der Hüls AG in Marl.

Das technische Nonylphenol wird fast ausschließlich als Zwischenprodukt für chemische Umsetzungen verwendet. In mengenmäßig eher relativ geringem Umfang wird aber auch das unveränderte Nonylphenol eingesetzt, so z. B. zum Markieren des steuerbegünstigten leichten Heizöls, gelegentlich in speziellen Fällen als Alterungsschutzmittel, in Gerbereien und auch als Komponente in Pestizidformulierungen.

Die Hauptmenge des Nonylphenols (etwa 70 - 80 % des Verbrauchs in Westeuropa) wird durch Umsetzung mit Ethylenoxid zu grenzflächenaktiven Ethoxylaten weiterverarbeitet. Diese werden für unterschiedliche Zwecke in Haushalt, Gewerbe und Industrie eingesetzt (Haushaltsreiniger, Desinfektionsreiniger, Bohrhilfsmittel, Verlaufmittel in der Fotoindustrie, Färbehilfsmittel etc.).

1986 schloß die Alkylphenolethoxylate (APEO) herstellende bzw. verarbeitende Industrie der Bundesrepublik Deutschland mit dem Bundesministerium des Innern eine freiwillige Vereinbarung, die den Verzicht auf den APEO-Einsatz zum Gegenstand hat. Der Anlaß für diese freiwillige Vereinbarung waren die von Stephanou und Giger (1982) und Giger (1984) veröffentlichten Untersuchungsergebnisse, die zeigen, daß Nonylphenol in dem Schweizer Fluß Glatt nachweisbar ist und in größeren Mengen (bis zu 2,5 g/kg Trockensubstanz) im Faulschlamm in Kläranlagen angereichert wird.

Von den 1985 verwendeten 17 000 t APEO gelangten schätzungsweise 12 000 t ins Abwasser. Hiervon entfielen ca. 4 500 t auf Haushaltswasch- und Reinigungsmittel, die restlichen 7 500 t entfielen auf den industriellen Bereich.

Die in Haushaltsmitteln und im industriellen Bereich eingesetzten APEOs wurden bis Anfang der neunziger Jahre ersetzt.

Einsatzgebiete des Nonylphenols sind noch

- Herstellung von Schmieröladditiven
- Kunststoff- und Kautschukindustrie
  (Antioxidans, Alterungsschutzmittel, PVC-Stabilisator)
- Phenolharze für Kunstharze und Lacke
- Epoxidharzherstellung

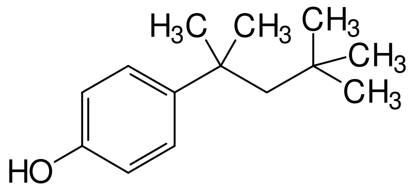
p-tert-Octylphenol

Synonyma: *p-tert*-Octylphenol, 4-*tert*-Octylphenol (IUPAC)
1,1,3,3-Tetramethylbutylphenol

Abkürzung: OP

CAS-Nr.: 140-66-9

Strukturformel:



Summenformel: $C_{14}H_{22}O$

Molmasse: 206,33 $gmol^{-1}$

p-tert-Octylphenol wurde wie bereits in Kap. 1.4 beschrieben als Modellsubstanz für *p*-Nonylphenol gewählt, da dieses im Gegensatz zum *p*-Nonylphenol als reines Isomer vorliegt.

Chemische Eigenschaften

p-tert-Octylphenol ist ein farbloser bis weißer, kristalliner Feststoff mit schwach phenolartigem Geruch.

Verwendung

Die Einsatzgebiete von *p-tert*-Octylphenol sind im wesentlichen wie auch bei anderen strukturverwandten Alkylphenolen identisch mit denen von Nonylphenol (s. oben). Jedoch wird das Octylphenol im Vergleich zum Nonylphenol in erheblich geringeren Mengen produziert; ca. 1/10 der Nonylphenol-Produktion (Nimrod und Benson 1996). Ein großer Teil des Octylphenols dient als Ausgangsstoff für Folgesynthesen in der Produktion von phenolischen Harzen. *p-tert*-Octylphenol ist außerdem in technischem Nonylphenol rohstoffbedingt in geringen Anteilen enthalten.

Exposition

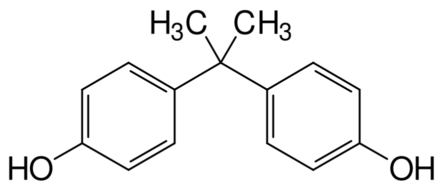
Vom Menschen werden ca. 10 µg Nonylphenol pro Tag bzw. maximal ca. 2 µg/kg KG am Tag umweltbedingt aufgenommen, können also als „normale" Belastung angesehen werden. Als Hauptpfad für die Aufnahme gelten Kontaminationen in Wasser bzw. in Nahrung (s. Tab. 4); am Arbeitsplatz außerdem Haut und Atemwege.

Tab. 4: Potentielle tägliche Exposition gegenüber NP und OP beim Menschen

Expositionsquellen und geschätzte maximale Tagesaufnahme von NP	
	[µg/Tag]
• nach Günther 1998:	
Nonylphenol in Nahrung	10
• nach Müller und Schlatter 1998:	
Nonylphenol aus der Umwelt	
als „worst-case"-Szenario	<160
	[µg/kg KG]
• nach EU-Reports 1997 & 1999:	
Nonylphenol aus der Umwelt	
als „reales" Szenario	1,26 - 5,31
***p*-Alkylphenol-Kontaminationen in der Umwelt**	
	[µg/l]
• nach Weeks et al. 1996:	
Nonylphenol in Flußwasser	0,7
• nach BUA 1988 und dort zitierter Literatur:	
Nonylphenol in vers. Flüssen	0,04 - 325
• nach Stachel et al. 2001:	
p-Alkylphenole in der Elbe:	0,010 - 0,221
• nach Holtey-Weber 2000:	
Nonylphenol in Trinkwasser:	< 0,14
Octylphenol in Trinkwasser:	< 0,06

1.6 Bedeutung und Vorkommen der Industriechemikalie Bisphenol A

IUPAC-Name:	2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)propan
Synonyma:	Bisphenol A
	Dihydroxydiphenylpropan
	(4,4'-Dihydoxydiphenyl)dimethylmethan
	4,4'-Isopropylidendiphenol
	Diphenylolpropan
	Dian
Abkürzung:	BPA bzw. 4,4'-BPA
CAS-Nr.:	80-05-7
Summenformel:	$C_{15}H_{16}O_2$
Strukturformel:	



Molmasse: 228,29 $gmol^{-1}$

Chemische Eigenschaften

Bisphenol A ist ein farbloser, schuppenförmiger bis kristalliner Feststoff mit schwach phenolartigem Geruch. In polaren organischen Lösungsmitteln wie z. B. Methanol, Ethanol und Ethern, Aceton und Ethylacetat ist BPA gut löslich, dagegen schwerlöslich in n-Alkanen, Cycloalkanen und aliphatischen Chlorkohlenwasserstoffen.

Die chemischen Eigenschaften von Bisphenol A (BPA) werden vor allem durch das aromatische Ringsystem und die beiden phenolischen OH-Gruppen bestimmt. Daher zeigt BPA die gleichen Reaktionen wie entsprechende Monophenole. Aufgrund der Bifunktionalität eignet es sich für Polymerisationsreaktionen.

Verwendung

In den USA zählt Bisphenol A zu den 50 am meisten produzierten Chemikalien. So wurden 1995 beispielsweise über 800 000 t produziert (Jennings 1994; Kirschner 1996).

Die technisch bedeutsamsten Umsetzungen bzw. Polymerisationsreaktionen verlaufen unter Ether- und Esterbildung an den Hydoxylgruppen.

Die Umsetzung mit Phosgen führt zu Polyestern der Kohlensäure (Polycarbonaten), thermoplastischen, glasklaren Kunststoffen mit hervorragenden mechanischen und elektrischen Eigenschaften.

Die Reaktion mit Epichlorhydrin verläuft über die Bildung des Diglycidylethers zu polymeren Epoxidharzen, die nach Vernetzung (Härtung) vor allem Anwendung in schlagfesten Lacken und nichtschmelzbaren Harzmassen finden.

Die Bromierung durch Substitution an beiden aromatischen Ringen liefert Tetrabrombisphenol-A, ein technisch wichtiges Monomer für flammhemmende Polymere auf der Basis von Polycarbonat oder Polyester (Dermer 1977).

Exposition

Vom Menschen werden ca. 10 µg pro Tag bzw. maximal ca. 1 µg/kg KG am Tag umweltbedingt aufgenommen, können also als „normale“ Belastung angesehen werden (s. Tab. 5). Höhere BPA-Belastungen können am Arbeitsplatz wie z. B. in der Polycarbonatproduktion auftreten (dermale und inhalative Aufnahme). Sie sind aber offenbar nicht relevant, weil es bisher keine arbeitsmedizinischen Beobachtungen über hormonelle Wirkungen bei exponierten Personen gibt. Als Hauptpfad für die Aufnahme von BPA gilt die Nahrung. Ob eine Belastung von BPA-freisetzenden Kunststoff-Zahnfüllungen ausgeht, ist Gegenstand derzeitiger Diskussionen und wird weiter untersucht (u. a. Arenholt-Bindslev et al. 1999; Fung et al. 2000).

Tab. 5: Potentielle tägliche Exposition gegenüber Bisphenol A beim Menschen

Expositionsquellen und geschätzte mittlere Tagesaufnahme von BPA

- nach Brotons et al. 1995; Howe und Borodinsky 1998; Howe et al. 1998; Wingender et al. 1998:

	[µg/Tag]
Konservendosen (4,2 - 22,9 µg/300 g-Dose)	6,3
Getränkedosen	< 0,75

- nach Olea et al. 1996:

Zahnfüllungen (3,3 - 30 mg/l Speichel)	90 - 931* (innerhalb 1 h)

* *Hinweis: Werte in dieser Höhe konnten von anderen Forschungsgruppen nicht reproduziert werden! (z. B. Arenholt-Bindslev et al. 1999)*

geschätzte mittlere Tagesaufnahme als „worst case"-Szenario

- nach ERCCWG, SPI 1998:

	[µg/kg KG / Tag]
Säugling:	0,105
Erwachsener (70 kg):	0,0125

- nach der Beratungskommission in der Sektion Toxikologie der DGPT (Degen et al.) 1998: 1

1.7 Phytoöstrogene

1.7.1 Bedeutung und Vorkommen von Phytoöstrogenen

Phytoöstrogene sind Pflanzeninhaltsstoffe, die sehr verschiedenartige Funktionen haben. Sie können Pflanzen sowohl vor Pilzverfall und ultravioletter Strahlung schützen, Pflanzenschädlinge abwehren oder auch eine wichtige Rolle in der Wachstums- und Entwicklungsregulation der Pflanze spielen. Einige dieser Phytoöstrogene ähneln strukturell den natürlichen Östrogenen von Wirbeltieren und Menschen (Harborne 1995). Neuere Erkenntnisse zeigen, daß sie beim Menschen, als Nahrungsbestandteil (z. B. in sojahaltigen Nahrungsmitteln) verzehrt, sowohl als Östrogenagonisten als auch als Östrogenantagonisten wirken können (Barrett 1996; Brzezinski 1999; Fitzpatrick 2000). Erste Hinweise auf die biologische Wirksamkeit der Phytoöstrogene lieferte die Beobachtung einer stark reduzierten Fertilität bei australischen Schafen nach Aufnahme einer bestimmten Kleesorte. Als Ursache konnten die Stoffe Formononetin und dessen Metabolit Equol identifiziert werden (Harborne 1995).

In den letzten 10 Jahren zielten verschiedene Arbeiten darauf ab, solche Phytoöstrogene zu ermitteln, die in der menschlichen Nahrung eine Rolle spielen (Barrett 1996). Dabei konnte man zwei wesentliche Typen von Phytoöstrogenen identifizieren: die Lignane und die Isoflavone. Die Hauptvertreter der Lignane sind die beiden Verbindungen Enterolacton und Enterodiol, deren Vorstufen in Getreiden, Früchten und Gemüsen vorkommen. Die bekanntesten Vertreter der Isoflavone sind Daidzein und Genistein; die höchsten Konzentrationen kommen in Soja und Sojaprodukten vor.

Die Wirkstärke der Isoflavone liegt etwa 2 - 4 Größenordnungen niedriger als die des natürlichen Östrogens 17β-Östradiol (Golden et al. 1998, Safe 1995). Auf der anderen Seite ist aber die teilweise sehr hohe Exposition mit diesen Stoffen zu berücksichtigen. Die Plasmaspiegel von Phytoöstrogenen können ernährungsabhängig um Größenordnungen höher liegen als die von endogenen Östrogenen (Safe 1995, Setchell et al. 1997). Bei Neugeborenen und Kleinkindern, die sojahaltige Diät erhalten hatten, wurden hohe Isoflavon-Konzentrationen im Plasma gefunden (Setchell et al. 1997; s. Tab. 6 in Kap. 1.7.2). Dabei ist zu beachten, daß Phytoöstrogene nach der Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt in der Leber glucuronidiert und/oder sulfatiert und im Urin oder mit der Galle ausgeschieden werden. Da bei Neugeborenen die Glucuronidierung noch in erheblich geringerem Umfang als bei Erwachsenen stattfindet, kann mit einer höheren Konzentration der Phytoöstrogene bei Neugeborenen gerechnet werden.

Am Beispiel der Phytoöstrogene läßt sich exemplarisch zeigen, daß eine aus *in-vitro*-Testsystemen abgeleitete Charakterisierung als Agonist bzw. Antagonist allein nicht zwangsläufig die Wirkqualität unter physiologischen Bedingungen beschreibt. So zeigen Phytoöstrogene ein agonistisches Potential in der pharmakologischen Testung; die bei der erwachsenen Frau beobachteten Effekte weisen hingegen auf eine Minderung der östrogenen Aktivität und somit auf eine antagonistische Wirkung hin. Dies ist verständlich, da die Wirkung eines starken (physiologischen) Agonisten (17β-Östradiol) durch die Anwesenheit eines schwächeren Agonisten (Phytoöstrogen, welches ebenfalls den Rezeptor besetzt) vermindert werden kann. In Lebensabschnitten, in denen der physiologische Agonist in weit geringerem Maße vorhanden ist, können Phytoöstrogene hingegen östrogen-agonistisch wirken. Ob eine biologische Wirkung ausgelöst wird, ist von der Konzentration am Wirkort abhängig (Brzezinski 1999; Mäkelä et al. 1999; BUA 1999).

In experimentellen Studien mit Frauen wurde ein physiologischer Effekt von phytoöstrogenreicher Nahrung in Form einer Verlängerung der follikulären Zyklusphase nachgewiesen. Da die Zellteilungsrate in der Brustdrüse während der Follikelphase etwa vierfach niedriger ist als in den übrigen Zyklusphasen, wird für Frauen mit längerem Zyklus ein niedrigeres Brustkrebsrisiko erwartet. Dies könnte auch die niedrigeren Brustkrebsraten bei japanischen Frauen erklären, da diese erheblich höhere Phytoöstrogenmengen mit der Nahrung über Soja und Sojaprodukte aufnehmen, und Japanerinnen im Mittel einen längeren Menstruationszyklus haben als Frauen aus westlichen Ländern (Cassidy 1996, Barrett 1996, Golden et al. 1998; Murkies et al. 1995).

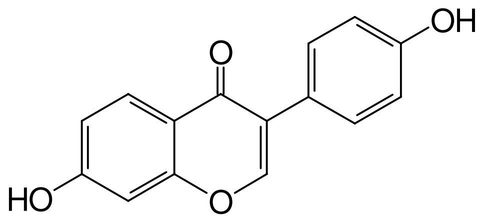
Die vorliegenden epidemiologischen Studien geben außerdem Hinweise auf eine Schutzfunktion bestimmter Nahrungsbestandteile (z. B. Sojaprodukte), die reich an Phytoöstrogenen und Ballaststoffen sind, gegen Colon-, Lungen-, Magen- und Prostatakrebs. Dies konnte z. T. auch in Langzeitstudien an Ratte und Maus bestätigt werden (Adlercreutz et al. 1992; Adlercreutz 1995).

Die epidemiologischen Studien sollten jedoch noch mit Vorsicht interpretiert werden, da sich der Schutzeffekt von sojahaltiger Nahrung nicht in allen Studien und bei allen Populationsgruppen bezüglich der gleichen Tumorlokalisation gezeigt hat. Außerdem sind gerade bei der Ernährung sehr viele andere, die Krebsentstehung ebenfalls beeinflussende Faktoren zu berücksichtigen.

Trotz der Hinweise auf mögliche positive Effekte einer phytoöstrogenreichen Ernährung darf nicht übersehen werden, daß über etwaige nachteilige Wirkungen insbesondere auf die Fruchtbarkeit und den sich entwickelnden Organismus wenig Informationen vorliegen. Immerhin sind seit den Erfahrungen mit Diethylstilböstrol die fatalen Auswirkungen einer *in-utero*-Exposition mit hohen Hormondosen bekannt (s. Kap. 1.1). Die wissenschaftlichen Befunde sind derzeit noch nicht genügend verifiziert, um eindeutige Empfehlungen für phytoöstrogenhaltige Nahrungsergänzungsmittel auszusprechen. Dennoch sind bereits eine Vielzahl solcher Präparate auf dem Markt erhältlich (Phyto Soya®, Women's Soy Isoflavones™ etc.), deren empfohlene therapeutische Dosis lediglich abgeschätzt erscheint (s. Tab. 6).

1.7.2 Bedeutung und Vorkommen von Daidzein

IUPAC-Name:	4',7-Dihydroxyisoflavon
Synonym:	Daidzein
CAS-Nr.:	486-66-8
Summenformel:	$C_{15}H_{10}O_4$
Strukturformel:	



Molmasse: 254,24 $gmol^{-1}$

Exposition

Im Vergleich zu umweltrelevanten Konzentrationen von Chemikalien können Phytoöstrogene wie Daidzein in Abhängigkeit von den Ernährungsgewohnheiten in erheblich größeren Mengen mit der menschlichen Nahrung aufgenommen werden.

Bei Asiaten und Vegetariern ist z. B. bekannt, daß sie mit der Nahrung täglich ca. 1 mg/kg KG aufnehmen (s. Tab. 6).

Wie bereits in Kap. 1.7.1 erwähnt wurden von Setchell et al. (1997) Isoflavon-Plasmaspiegel bei Säuglingen analysiert. Bei den mit sojahaltiger Säuglingsnahrung ernährten Kindern fanden sich erheblich höhere Plasmaspiegel für Daidzein und Genistein als bei gestillten oder mit Kuhmilch ernährten Säuglingen. Auf der Grundlage von Körperdosen entsprachen die Phytoöstrogenmengen bei Babynahrung auf Sojabasis etwa dem 6 - 11fachen derjenigen Dosen, die bei erwachsenen Frauen endokrin wirksam waren (verlängerter Menstruationszyklus). In Relation zu den endogenen Östrogenspiegeln von Säuglingen (40 - 80 pg/ml) lagen die Spiegel an Daidzein und Genistein 13 000 - 22 000fach höher. Trotz der geringen Wirkstärke der Isoflavone (1/100 - 1/10 000 derjenigen von Östradiol) wäre eine endokrine Wirkung in diesem Fall durchaus zu vermuten. Dennoch sind bislang keine nachteiligen Wirkungen bekannt geworden, obwohl Sojadiäten seit über 30 Jahren bei Säuglingen aus Gründen wie z. B. einer Kuhmilchallergie zur Anwendung kommen (Barrett 1996, Setchell et al. 1997).

Tab. 6: Expositionssituation und Isoflavon-Plasmaspiegel beim Menschen

geschätzte mittlere Tagesaufnahme bei verschiedenen Populationen		
(nach Cassidy 1996; Tham et al. 1998)		[mg/Tag]
UK		< 1
USA		1 - 3
Ostasiatische Bevölkerung		50 - 100
Equolausscheidung im Urin (nach Adlercreutz 1995)		
Japan: 20fach höher im Vergleich zu westlichen Ländern		
Plasmaspiegel (Summe aus Daidzein + Genistein)		[ng/ml])
(nach Kurzer und Xu 1997; Setchell et al. 1997)		
Japaner		40 - 240
Vegetarier		28 - 100
Säugling, gefüttert mit Babynahrung auf Sojabasis		980
Säugling, gefüttert mit konventioneller Babynahrung auf Kuhmilchbasis oder Muttermilch		5
Empfohlene therapeutische Dosis von Phytoöstrogen-Präparaten		
(nach den jeweiligen Packungsbeilagen)		[mg/Tag]
1. Women's Menopause Formula™:	Isoflavone	100
	davon 10 % Genistein	10
	Klee-Extrakt	50
2. Women's Soy Extreme™:	Soja-Extrakt	400
	davon 10 % Isoflavone	40
	Klee-Extrakt	50
	davon 8 % Isoflavone	4
3. Women's Soy Isoflavones™:	Isoflavone	10 - 40
4. Phyto Soya®:	Isoflavone	35

(Präparate 1 - 3 von Firma Natrol, Chatsworth, CA, USA; Präparat 4 von Arkopharma, Achern, BRD)

1.8 Aufgabenstellung

Im Rahmen des Verbundprojektes (s. Kap. 1.4) sollten für ausgewählte Stoffe, deren Basisdaten für *in vitro*-Potenz bereits zuvor ermittelt worden waren, grundlegende toxikokinetische Parameter wie Bioverfügbarkeit und Eliminationshalbwertszeit in *in vivo*-Versuchen bestimmt werden.

Die Toxikokinetik der ausgewählten Industriechemikalien und des Phytoöstrogens Daidzein und ihre Bioverfügbarkeit wurden an weiblichen DA/Han-Ratten nach Einmalgabe verschiedener Dosen *per os* und *i.v.* untersucht. In einer Serie von Tierversuchen wurden zur Bestimmung der systemisch verfügbaren Substanzkonzentrationen Blutproben entnommen und Gewebe asserviert, um die Substanzen und ihre Metabolite zu quantifizieren. Die Etablierung der dafür erforderlichen Analytik war ein essentieller Teil dieser Arbeit, da die Erhebung von toxikokinetischen Parametern ohne zuverlässige und nachweisstarke Analyseverfahren nicht möglich gewesen wäre. Zu Beginn konnten hierbei bestehende methodische Erfahrungen in der Toxikologie der Hüls AG in Marl mit *p-tert*-Octylphenol genutzt werden. Für die im Anschluß zu prüfenden Chemikalien (Bisphenol A und Daidzein) war die Analytik zunächst zu etablieren. Da Konzentrations-Zeitverläufe im Blut Hinweise auf eine enterohepatische Rezirkulation der Substanzen lieferten (s. Kap. 1.3), wurden zusätzlich Untersuchungen zur biliären Ausscheidung zweier ausgewählter Prüfstoffe (*p-tert*-Octylphenol und Daidzein) durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Gerät		Lieferant
GC-MS-Anlage I (Toxikologie der Hüls AG, Marl):		
	GC 5890A Serie II	Hewlett Packard
	MS 5988A	Hewlett Packard
	Säule: DB-5-MS (30 m, 0,32 mm ID, 0,25 µm Film)	J&W Scientific
	GC/MS Chemstation Computer System 59970C	Hewlett Packard
	GC/MS Chemstation Computer System 5970	Hewlett Packard
GC-MS-Anlage II (IfADo, Dortmund):		
	GC Varian Star 3400 CX	Varian
	Ionenfalle MS/MS-System Saturn 4D	Varian
	Autosampler 8200 CX	Varian
	Säule: DB-5-MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Film)	J&W Scientific
	Software: Saturn GC/MS Version 5.0, 8200/SPME PC Control Software Version 4.5	Varian
GC-MS-Anlage III (IfADo, Dortmund):		
	GC 5890A Serie II	Hewlett Packard
	MS 5970	Hewlett Packard
	Säule: DB-5-MS (30 m, 0,32 mm ID, 0,25 µm Film)	J&W Scientific
	GC/MS Workstation 59970	Hewlett Packard
	Gauge Controller 59822 A	Hewlett Packard
HPLC-Anlage:	2 Pumpen LC-10 AD	Shimadzu
	System-Controller SCL-10 A *VP*	Shimadzu
	UV-VIS-Detektor SPD-10 AV *VP*	Shimadzu
	Säule: Luna 3 µm C18(2), 150 x 1 mm	Phenomenex
	Vorsäule: Luna 3 µm C18(2), 30 x 1 mm	Phenomenex
	Splitter Acurate AC 200 VAR	LC Packings
	Degasser Degasys DG-1210	VDS optilab
	Software: CLASS VP Chromatography Data System Version 4.2	Shimadzu
Eis-Automat		Ziegra
Flaker Ice System AF 10		Scotsman
Gefrierschrank (-20 °C)		Liebherr

Gefrierschrank VX 53 O (-80 °C)		Jouan
Homogenisator POTTER		B. Braun
Kühlschrank		Privileg
Labormixer VIBRAX-VXR		IKA Labortechnik
Magnetrührer Ikamag		IKA Labortechnik
Magnetrührer MR 2000		Heidolph
pH-Meter:	pH-Meter E 532	Metrohm
	pH-Meter MP 225	Mettler
Reacti-Therm		Pierce
Rollenmischer Assistent RM 5 & 348		Heinemann
Rotationsmischer 3300		Eppendorf
Rotationsmixer 34526		Breda Scientific
Schüttler Landgraf Hannover		GFL
SPE-Einheit		Merck Lichrolut
Thermomixer		Eppendorf
Ultraschallbad Sonorex Super RK 510 H		Bandelin
Vortexer		Heidolph
Waagen:	Analysenwaage AE 163 & AE 160	Mettler
	Präzisionswaage 1574 MP 1	Sartorius
Wasser-Anlage:	prima reverse osmosis	Elga
	maxima ultra pure water	Elga
Zentrifugen:	Eppendorfzentrifuge 5415 C	Eppendorf
	Ultrazentrifuge TGA-50	Kontron
	Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann

2.2 Labor- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Lieferant
Eppendorf-Gefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
Filter Spartan 3/30	Schleicher & Schuell
Glasgefäße, diverse	Brand, Hirschmann, Schott
Lichrolut RP18-Kartuschen	Merck
Meßkolben (10, 20, 50, 100, 250, 500 und 1000 ml)	Brand
Mikroschraubgefäße steril aus Polypropylen (2 ml)	Sarstedt
Milliliter- u. Mikroliter-Pipetten mit variablen Volumina	Eppendorf, Gilson
OMI™-2 Indicating Purifier	Supelco

Pipettenspitzen	Eppendorf, Sarstedt
Präparierbesteck (Skalpell, Pinzetten...)	Fleischhacker
Spritzen (2 µl, 5 µl, 10 µl)	Hamilton, Unimetrics, SGE
Supelcarb™ HC	Supelco
Vials (2 ml) mit Schraubdeckel, PTFE-Membran und Microscale-Einsatz	Chromacol
Wägeschiffchen 609	Schleicher & Schuell
Zentrifugenröhrchen	Eppendorf, Sarstedt

2.3 Chemikalien

2.3.1 Modellsubstanzen

Substanz	Lieferant
p-tert-Octylphenol, > 98 %	Hüls AG
Bisphenol A, 99,94 %	Bayer
Daidzein, HPLC gradient-grade	Biomol

2.3.2 Reagenzien

Substanz	Lieferant
Acetonitril, HPLC gradient-grade	Roth
Ammoniumacetat	Merck
Ascorbinsäure	Merck
Biochanin A, HPLC gradient-grade	Roth
N,O-Bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA), inklus. 1 % Trimethylchlorsilan (TMCS)	Sigma-Aldrich
p-tert-Butylphenol, > 98 %	Hüls AG
1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB)	Merck
Dichlormethan	Merck
Diethylether	Merck
Diisopropylether, puriss.	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Eisessig	Merck
Equol	Apin Chemicals Ltd.

Ethanol	Merck
Ethylacetat	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Dinatriumsalz	Merck
Formononetin	Roth
Genistein	Indofine Chemical Company
β-Glucuronidase (*Escherichia coli* K12; Aktivität 10 U/mg)	Roche
Helium 5.0	Messer Griesheim
Heparin, Na-salz	Serva
Ketamin	Sigma-Aldrich
Methanol	Baker
Methyl-*tert*-butylether (MTBE)	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natrium-dihydrogenphosphat Monophosphat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydroxid	Merck
1,2-Propandiol, > 99,5 %	Sigma-Aldrich
Proteinase K (*Triticharium album*; Aktivität 32,2 U/mg)	Quiagen
Salzsäure	Riedel de Haën
Schwefelsäure, konz.	Merck
Stickstoff 4.6	Messer Griesheim
Sulfatase (*Abalone entrails*, Type VIII; Aktivität 23 U/mg)	Sigma-Aldrich
Tetrabutylammoniumchlorid	Merck
Triethylamin	Merck
Xylazin	Sigma-Aldrich
Zitronensäure	Merck

Alle verwendeten Reagenzien waren von *p.a.*- oder höherer Qualität, wenn nicht anders angegeben.

2.3.3 Lösungen

2.3.3.1 Puffer zur Probenaufarbeitung

3 M Triethylammoniumsulfatpuffer pH 7,0:

30,36 g Triethylamin werden eingewogen und ca. 30 ml bidest. Wasser zugesetzt, Rühren im Abzug, dann langsam konz. Schwefelsäure zupipettieren (exotherme Reaktion), lange rühren lassen. Wenn gerade noch 2 Phasen erkennbar sind, verdünnte Schwefelsäure zugeben bis pH 7,0, abschließend mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen.

1 M Ammoniumacetatpuffer, pH 7,0:

7,708 g Ammoniumacetat in 100 ml bidest. Wasser lösen
(pH liegt bei ca. 6,96, daher keine weitere Einstellung notwendig).

1 M Ammoniumacetatpuffer, pH 5,0:

7,708 g Ammoniumacetat in ca. 70 ml bidest. Wasser lösen und mit Essigsäure auf pH 5,0 einstellen. Abschließend mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen.

10 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 5,0:

1:100-Verdünnung des o. g. 1 M Ammoniumacetatpuffer, pH 5,0.

Hydrolysepuffer I

13,6 g Natriumacetat, 1,0 g Ascorbinsäure und 0,1 g EDTA werden eingewogen, anschließend mit bidest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt und mit Essigsäure auf pH 5,0 eingestellt. Aufbewahrung im Kühlschrank notwendig.

Hydrolysepuffer II

1:10-Verdünnung des o. g. Hydrolysepuffers I.

Lysepuffer

0,438 g Natriumchlorid, 0,931 g EDTA (pH 8,0) und 1,0 g SDS werden eingewogen und anschließend mit bidest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Lösungen für die enzymatischen Hydrolyse
Sulfatase wurde in Wasser gelöst (Aktivität 100 U/ml), aliquotiert und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.
Mit Proteinase K wurde entsprechend verfahren (Aktivität 575 U/ml).
Einmal aufgetaute Aliquots wurden direkt verbraucht und nicht wieder eingefroren.
ß-Glucuronidase (Aktivität 10 U/ml) wurde ohne weitere Aufarbeitung direkt verwendet.

2.3.3.2 Kalibrierlösungen

Zur Kalibrierung wurden den Proben (Vollblut/Plasma, Galle oder Gewebehomogenat) von Kontrolltieren jeweils definierte Mengen an Testsubstanz zugesetzt. Hierbei wurde nach folgendem Schema verfahren bzw. pipettiert:

Tab. 7: Schema zum Ansetzten der Kalibrier-Lösungen (gilt für alle Testsubstanzen)

Kalibrier-lösung Nr.	Stammlsg.* Int. Std. [µl]	Verdünnung der Stammlsg.* der Testsubstanz	verd. Lösung Testsubstanz [µl]	Konzentration Kalibrier-Lsg. [ng/Ansatz]
1	10	-	0	0
2	10	III (1:1000)	5	5
3	10	III (1:1000)	10	10
4	10	II (1:100)	5	50
5	10	II (1:100)	10	100
6	10	I (1:10)	5	500
7	10	I (1:10)	10	1000

* Konz. der Stammlösungen jeweils 1 g/l; späteres Extraktionsmittel = Verdünnungsmittel

2.4 Versuchstiere

Es wurden weibliche DA/Han-Ratten verwendet, die zu Beginn der Studie ca. 123 - 164 g wogen und ca. 8 Wochen alt waren. Für die Studien mit *p-tert*-Octylphenol, die in der Toxikologie der Hüls AG (Marl) durchgeführt wurden, wurden Ratten der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) verwendet. Die Versuchstiere der ande-

ren Studien stammen von der Firma Møllegard (Ry, Dänemark). Die Tiere wurden jeweils in Fünfergruppen in Macrolon-Käfigen des Typs IV gehalten. Die Käfige waren mit Einstreu desTyps HW, 300/500 W der Firma JELU-WERK Ludwigsmühle (Rosenberg, Deutschland) versehen. Als äußere Bedingungen wurden eine Raumtemperatur von 22 ± 3 °C, eine relative Luftfeuchtigkeit von 30 - 70 % und ein 12 h Tag-Nacht-Zyklus gewährleistet. Den Tieren stand Standard-Rattenfutter (Ssniff R/M-Haltung, Ssniff Spezialfutter GmbH, Soest, Deutschland) und Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung. Bei den Tieren, denen die jeweilige Testsubstanz oral verabreicht wurde, ist das Futter ca. 16 h zuvor entfernt worden.
Bei allen Tieren gab es eine Akklimatisierungsphase von mindestens 5 Tagen.

Untersuchungen zur Kinetik nach Einmalapplikation von *p-tert*-Octylphenol in DA/Han-Ratten und Studien zur Ausscheidung von *p-tert*-Octylphenol bzw. Daidzein mit der Galle wurden in der Toxikologie der Hüls AG bzw. am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund durchgeführt (Dosierung, Blutabnahme, Sektion und Asservierung von Geweben). Die Tierversuche zur Kinetik von Bisphenol A und Daidzein wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. H. Michna an der Deutschen Sporthochschule Köln durchgeführt. Die Analytik der in Köln asservierten Proben erfolgte am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund.

2.5 Studiendesign der tierexperimentellen Untersuchungen

Alle dargestellten Studien wurden mit detaillierter Dokumentation & Datenarchivierung und z. T. unter Verwendung von Standardarbeitsanweisungen etc. durchgeführt. Dies gilt insbesondere für die Untersuchungen mit *p-tert*-Octylphenol, die in der Toxikologie der Hüls AG gemäß der GLP-Prinzipien erfolgten (Good Laboratory Practice). Allerdings erfolgten keine Prüfungen oder Stellungnahmen durch Beauftragte der Qualitätssicherung. Alle experimentellen Details (Reagenzien, analytische Verfahrensweise, Tierhaltung und -experimente) folgten denen der vorangegangenen Studie mit Wistar-Ratten (Certa et al. 1996) so nah wie möglich. Die rechtlichen Genehmigungen zur Durchführung der Tierversuche wurden bei den Bezirksregierungen Köln (Abteilung Tierschutz) und Arnsberg als verantwortliche Behörden eingeholt.

Bei den *i.v.*-Injektionen in die Schwanzvene der Ratten, die nachfolgend in den Kapiteln 2.5.1, 2.5.2 und 2.5.3 für die einzelnen Testsubstanzen beschrieben werden, kam es bei einigen Tieren offensichtlich zu fehlerhaften bzw. paravenösen Injektionen. Dies wurde sowohl durch Blutspiegel-Maxima *nach* dem ersten Probenahmezeitpunkt als auch durch generell zu niedrige Substanzspiegel bei einigen Tieren deutlich (s. Kap. 3.2.1.1 und Abb. 15a). Die Ursache liegt in der starken Pigmentierung der verwendeten DA/Han-Ratten, die eine exakte Lokalisation der Schwanzvene erschwert. Daher waren die Daten, die aus Fehlinjektionen resultierten, zu verwerfen, und es wurde notwendig, einige *i.v.*-Injektionen zu wiederholen. Hieraus ergaben sich unter anderem die unterschiedlichen Probenzahlen zu den jeweiligen Probennahmezeitpunkten (s. Tab. 8 - 10).

2.5.1 Toxikokinetik von *p-tert*-Octylphenol in weiblichen DA/Han-Ratten nach Einmalapplikation

Für diesen Teil der Studien wurden weibliche DA/Han-Ratten mit einem Gewicht von 132 - 164 g herangezogen, die wie unter Kap. 2.4 beschrieben gehalten und behandelt wurden.

Lösungen von *p-tert*-Octylphenol in 1,2-Propandiol wurden am Tag der Applikation jeweils frisch angesetzt. Für die Applikation wurden drei Konzentrationen benötigt: 5 mg/ml für *i.v.*-Gabe und 50 bzw. 200 mg/ml für die Verabreichung per Schlundsonde. Auf der Basis früherer Experimente (Certa et al. 1996) wurde das in Tabelle 8 dargestellte Applikations- und Probennahmeschema gewählt.

Tab. 8: Applikations- und Probennahmeschema zur Kinetik nach Einmalapplikation von *p-tert*-Octylphenol an weibliche DA/Han-Ratten

Gruppe	Dosis und Applikationspfad	Probennahmezeitpunkt nach Applikation	Probenanzahl
A	5 mg/kg KG *i.v.*	1 min	1
		5 min	3
		10 min	3
		20 min	4
		40 min	2
		1 h	5
		3 h	5
		6 h	5
		24 h	5
		48 h	5
B	50 mg/kg KG *p.o.*	10 min	3
		20 min	3
		30 min	3
		45 min	3
		60 min	3
		90 min	3
		2 h	3
		3 h	3
		4 h	3
		6 h	3
		8 h	3
		24 h	3
		32 h	3
		48 h	3
C	200 mg/kg KG *p.o.*	10 min	3
		20 min	3
		30 min	3
		45 min	3
		60 min	3
		90 min	3
		2 h	3
		3 h	3
		4 h	3
		6 h	2
		8 h	3
		24 h	3
		32 h	3
		48 h	2

Gruppen zu je sechs Tieren erhielten die Testsubstanz intravenös bzw. als *per os*-Applikation (Schlundsondierung). Zu den in Tabelle 8 aufgelisteten Zeiten wurden den Tieren durch Venenpunktion des Retroorbital-Plexus jeweils mindestens 100 µl Blut entnommen. Bei jeder Dosisgruppe wurden 2 Kontrolltiere mitgeführt, die lediglich das Applikationsmedium 1,2-Propandiol erhielten. Die heparinisierten Blutproben wurden bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.
Bei der letzten Probennahme wurden die Tiere getötet und zusätzlich zu den Blutproben folgende Organe entnommen: Leber, Niere, Uterus, Gehirn, Lunge, Skelettmuskel, Abdominalfett, Magen und Darm. Die Gewebe wurden bei -20 °C bzw. -80 °C bis zur Analyse gelagert.

2.5.2 Toxikokinetik von Bisphenol A in weiblichen DA/Han-Ratten nach Einmalapplikation

Für diesen Teil der Studien wurden weibliche DA/Han-Ratten mit einem Gewicht von 130 - 150 g herangezogen, die wie unter Kap. 2.4 beschrieben gehalten und behandelt wurden.
Lösungen von Bisphenol A in 1,2-Propandiol wurden am Tag der Applikation jeweils frisch angesetzt. Für die Applikation wurden drei Konzentrationen benötigt: 10 mg/ml für *i.v.*-Gabe und 10 bzw. 100 mg/ml für die Verabreichung per Schlundsonde. Analog zu den Studien mit *p-tert*-Octylphenol und auf der Basis früherer Experimente (Certa et al. 1996) wurde das in Tabelle 9 dargestellte Applikations- und Probennahmeschema gewählt.

Tab. 9: Applikations- und Probennahmeschema zur Kinetik nach Einmalapplikation von Bisphenol A an weibliche DA/Han-Ratten

Gruppe	Dosis und Applikationspfad	Probennahmezeitpunkt nach Applikation	Probenanzahl
A	10 mg/kg KG *i.v.*	1 min	3
		5 min	4
		10 min	3
		20 min	4
		40 min	4
		1 h	3
		2 h	3
		3 h	4
		4 h	3
		6 h	3
		8 h	3
		24 h	3
		32 h	4
		48 h	4
B	10 mg/kg KG *p.o.*	30 min	3
		90 min	3
		3 h	3
		6 h	3
		8 h	3
		48 h	3
C	100 mg/kg KG *p.o.*	10 min	3
		20 min	3
		30 min	3
		45 min	3
		90 min	3
		2 h	3
		3 h	3
		4 h	3
		6 h	3
		8 h	3
		24 h	3
		32 h	4
		48 h	5

Gruppen zu je sechs Tieren (bzw. drei Tieren bei 10 mg/kg KG *p.o.*) erhielten die Testsubstanz intravenös bzw. als *per os*-Applikation (Schlundsondierung). Zu den in Tabelle 9 aufgelisteten Zeiten wurden den Tieren durch Venenpunktion des Retro-orbital-Plexus jeweils mindestens 100 µl Blut entnommen. Bei jeder Dosisgruppe wurden 2 Kontrolltiere mitgeführt, die lediglich das Applikationsmedium 1,2-Propandiol erhielten. Aus den Blutproben wurde mittels Zentrifugation jeweils das Plasma abgetrennt und dies bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.
Bei der letzten Probennahme wurden die Tiere getötet und zusätzlich zu den Blutproben folgende Organe entnommen: Leber, Niere, Uterus, Gehirn, Lunge, Skelettmuskel und Abdominalfett. Die Gewebe wurden bei -20 °C bzw. -80 °C bis zur Analyse gelagert.

2.5.3 Toxikokinetik von Daidzein in weiblichen DA/Han-Ratten nach Einmalapplikation

Für diesen Teil der Studien wurden weibliche DA/Han-Ratten mit einem Gewicht von 123 - 152 g herangezogen, die wie unter Kap. 2.4 beschrieben gehalten und behandelt wurden.
Lösungen von Daidzein in DMSO wurden am Tag der Applikation jeweils frisch angesetzt. Für die Applikation wurden drei Konzentrationen benötigt: 10 mg/ml für *i.v.*-Gabe und 10 bzw. 100 mg/ml für die Verabreichung per Schlundsonde. In Analogie zu den Studien mit *p-tert*-Octylphenol und Bisphenol A wurde das in Tabelle 10 dargestellte Applikations- und Probennahmeschema gewählt.

Tab. 10: Applikations- und Probennahmeschema zur Kinetik nach Einmalapplikation von Daidzein an weibliche DA/Han-Ratten

Gruppe	Dosis und Applikationspfad	Probennahmezeitpunkt nach Applikation	Probenanzahl
A	10 mg/kg KG *i.v.*	1 min	2
		5 min	3
		10 min	3
		20 min	2
		40 min	3
		1 h	2
		2 h	2
		3 h	3
		4 h	3
		6 h	4
		8 h	4
		24 h	5
		32 h	1
		48 h	2
B	10 mg/kg KG *p.o.*	10 min	4
		20 min	4
		30 min	4
		45 min	4
		60 min	4
		90 min	4
		2 h	4
		3 h	3
		4 h	5
		6 h	5
		8 h	3
		24 h	3
		32 h	4
		48 h	5
C	100 mg/kg KG *p.o.*	10 min	3
		20 min	3
		30 min	4
		45 min	3
		60 min	4
		90 min	3
		2 h	5
		3 h	3
		4 h	5
		6 h	3
		8 h	3
		24 h	5
		32 h	4
		48 h	5

Gruppen zu je sechs Tieren erhielten die Testsubstanz intravenös bzw. als *per os*-Applikation (Schlundsondierung). Zu den in Tabelle 10 aufgelisteten Zeiten wurde den Tieren durch Venenpunktion des Retroorbital-Plexus jeweils mindestens 100 µl Blut entnommen. Bei jeder Dosisgruppe wurden 2 Kontrolltiere mitgeführt, die lediglich das Applikationsmedium DMSO erhielten. Aus den Blutproben wurde mittels Zentrifugation jeweils das Plasma abgetrennt und dies bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.

Bei der letzten Probennahme wurden die Tiere getötet und zusätzlich zu den Blutproben folgende Organe entnommen: bei allen Tieren Leber, Niere und Uterus, bei 2 Tieren je Gruppe zusätzlich Lunge, Gehirn und Skelettmuskel. Die Gewebe wurden bei -20 °C bzw. -80 °C bis zur Analyse gelagert.

2.5.4 Exkretion von *p-tert*-Octylphenol und Daidzein mit der Galle nach *i.p.*-Applikation

Zur Stützung der Annahme eines enterohepatischen Kreislaufs von Daidzein und *p-tert*-Octylphenol wurden Gallenproben von Tieren nach Substanzgabe analysiert. Hierzu wurden DA/Han-Ratten unter Narkose mit einer Ketamin-Xylazin-Mischung Gallenfisteln gelegt, die in DMSO gelösten Substanzen *i.p.* injiziert (10 mg/kg KG bei Daidzein, 5 mg/kg KG bei *p-tert*-Octylphenol) und Galle über einen Zeitraum von 2 Stunden in Viertelstunden-Aliquots und danach für weitere 6 - 7 Stunden in Halbstunden-Aliquots gesammelt. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

2.6 Aufarbeitungen aus biologischem Probenmaterial

Alle nachfolgend beschriebenen Methoden zur Probenaufarbeitung und instrumentellen Analytik sind das Ergebnis nach Optimierung der variablen Parameter.

2.6.1 Probenaufarbeitungen für die *p-tert*-Octylphenol-Analysen

i. freies p-tert-Octylphenol in Vollblut

Die analytische Methode entspricht der von Certa et al. (1996) beschriebenen Vorgehensweise (s. Abb. 3).

Nach Zusatz von *p-tert*-Butylphenol als internem Standard zur heparinisierten Vollblutprobe (mind. 100 µl) wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit 5 ml Methyl-*tert*-butylether durchgeführt. Die organische Phase wurde abpipettiert, unter Stickstoff bei Raumtemperatur auf ca. 100 µl eingeengt und anschließend direkt mittels GC-MS quantifiziert. Eine Derivatisierung der Analyte war nicht erforderlich. Es wurden folgende GC-MS-Parameter verwendet:

Säule DB 5 (Länge 30 m, ID 0,32 mm, Filmdicke 0,25 µm)

Temperatur-Programm:	1,5 min bei 100 °C, dann 25 °C/min bis 280 °C
Injektortemperatur:	220 °C
Detektortemperatur:	200 °C

Auswertung im SIM-Modus (single ion monitoring) auf den Masse zu Ladungsverhältnissen m/z 135 (größter Peak für *p-tert*-Butylphenol und *p-tert*-Octylphenol) bzw. m/z 150 (Molekülion von *p-tert*-Butylphenol).

Die Bestimmung der OP-Konzentration erfolgte anhand einer Kalibrierreihe, die täglich vor den jeweiligen Messungen auf Richtigkeit kontrolliert wurde (s. Tab 11 und Tab. 16).

Die Nachweisgrenze liegt bei 3 ng/ml Vollblut.

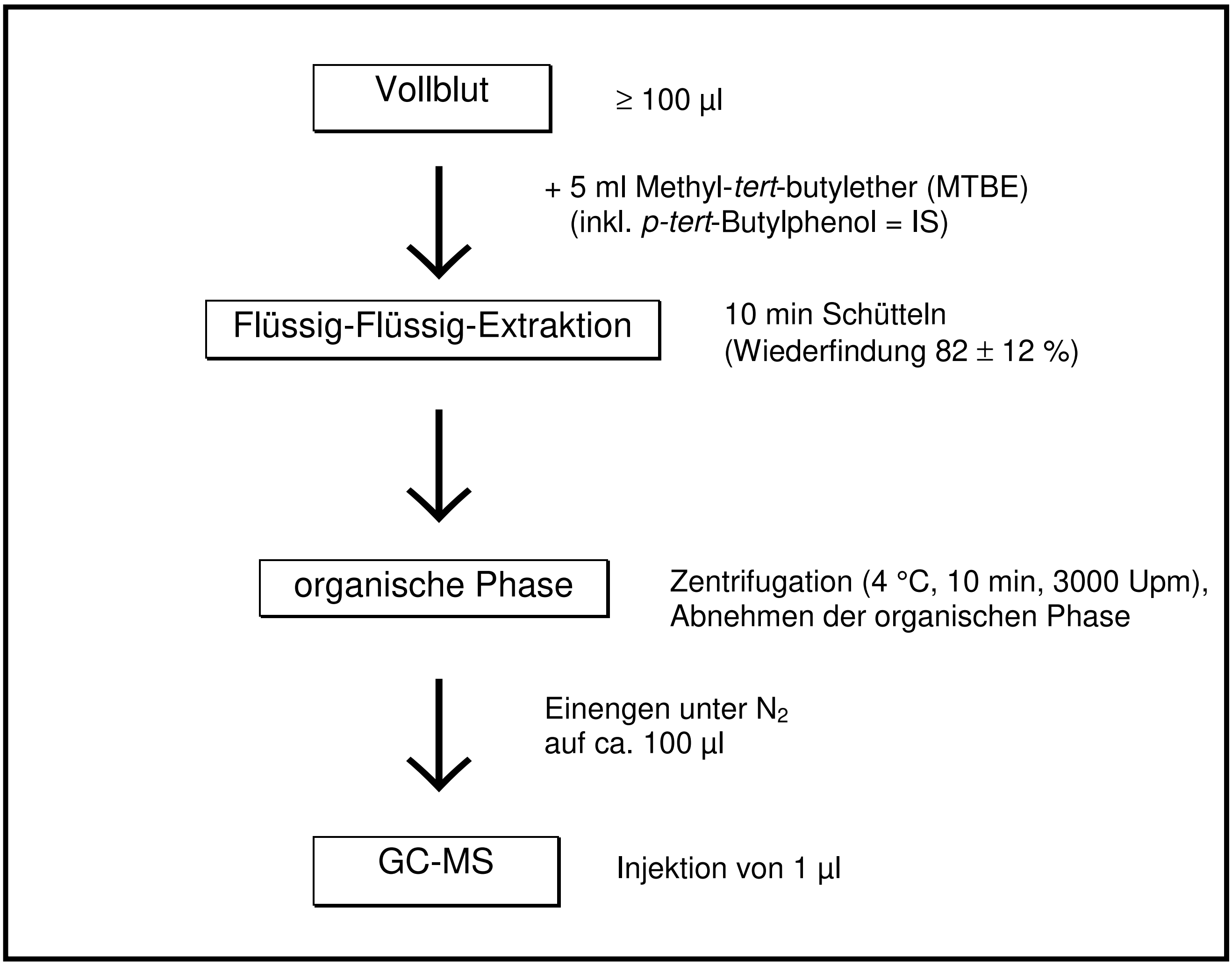


Abb. 3: Aufarbeitungsschema der Vollblutproben zur Bestimmung von *p-tert*-Octylphenol

ii. Gesamt-p-tert-Octylphenol in Vollblut

Zur Bestimmung der Gesamt-*p-tert*-Octylphenol-Spiegel (Summe aus Glucuroniden, Sulfaten und freiem *p-tert*-Octylphenol) wurde die Vollblutprobe (mind. 100 µl) zunächst enzymatisch hydrolysiert und dann wie oben unter Punkt *i* beschrieben extrahiert und analysiert. Für die Hydrolyse wurde eine definierte Menge Vollblut mit 10 µl Hydrolysepuffer I (Natriumacetat c = 1 mol/l pH 5,0, Ascorbinsäure 1 % (w/v), EDTA 0,1 % (w/v)) vermischt und mit internem Standard, 8 µl Glucuronidase- und 4 µl Sulfatase-Lösung versetzt. Die Hydrolyse wurde bei 37 °C über Nacht durchgeführt. Nach der Hydrolyse wurden die Gesamt-*p-tert*-Octylphenol-Gehalte entsprechend wie unter Punkt *i* (freie Gehalte in Vollblut; s. oben) beschrieben bestimmt.

iii. freies p-tert-Octylphenol in Gewebe

Gewebeproben wurden in kleine Stücke geschnitten und ohne Zusatz von Puffer mit einem Potter homogenisiert. Zu einer definierten Menge Gewebehomogenat (mind. 100 mg) wurden 500 µl Lysepuffer (NaCl c = 75 mmol/l, EDTA 25 mmol/l pH 8, 0,1 % SDS (w/v)) gegeben und die Proben für 1,5 - 2 h bei 4 °C lysiert. Anschließend wurden 10 µl *p-tert*-Butylphenol (c = 10 µg/ml in MTBE entprechend 100 ng/Ansatz) als interner Standard und 20 µl Proteinase K-Lösung zugegeben. Der Proteinabbau erfolgte 90 min bei 50 °C. Die weitere Aufarbeitung (Flüssig-Flüssig-Extraktion) und die GC-MS-Analyse erfolgte wie für Vollblutproben unter Punkt *i* (s. oben) beschrieben.

iv. Gesamt-p-tert-Octylphenol in Gewebe

Die Bestimmung der Gesamt-Octylphenol-Gehalte in Gewebe erfolgte nach enzymatischer Hydrolyse der Glucuronide und Sulfatate entsprechend der Bestimmung der freien Gehalte (s. Abb. 4).

Gewebeproben wurden in kleine Stücke geschnitten und ohne Zusatz von Puffer mit einem Potter homogenisiert. Zu jeweils 100 mg Gewebealiquots wurden 500 µl Lysepuffer (NaCl c = 75 mmol/l, EDTA 25 mmol/l pH 8,0, 1 % SDS (w/v)) gegeben und die Proben für 1,5 - 2 h bei 4 °C lysiert. Anschließend wurden 10 µl *p-tert*-Butylphenol (c = 10 µg/ml in MTBE entprechend 100 ng/Ansatz) als interner Standard und 20 µl Proteinase K-Lösung zugegeben. Der Proteinabbau erfolgte 90 min bei 50 °C. Nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurden 50 µl Hydrolysepuffer I (Natriumacetat c = 1 mol/l pH 5,0, Ascorbinsäure 1 % (w/v), EDTA 0,1 % (w/v)), 8 µl Glucuronidase- und 4 µl Sulfatase-Lösung zugegeben. Die Hydrolyse wurde über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Die Proben wurden dann mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion weiter aufgereinigt und die GC-MS-Analyse erfolgte wie für Vollblutproben unter Punkt *i* (s. oben) beschrieben.

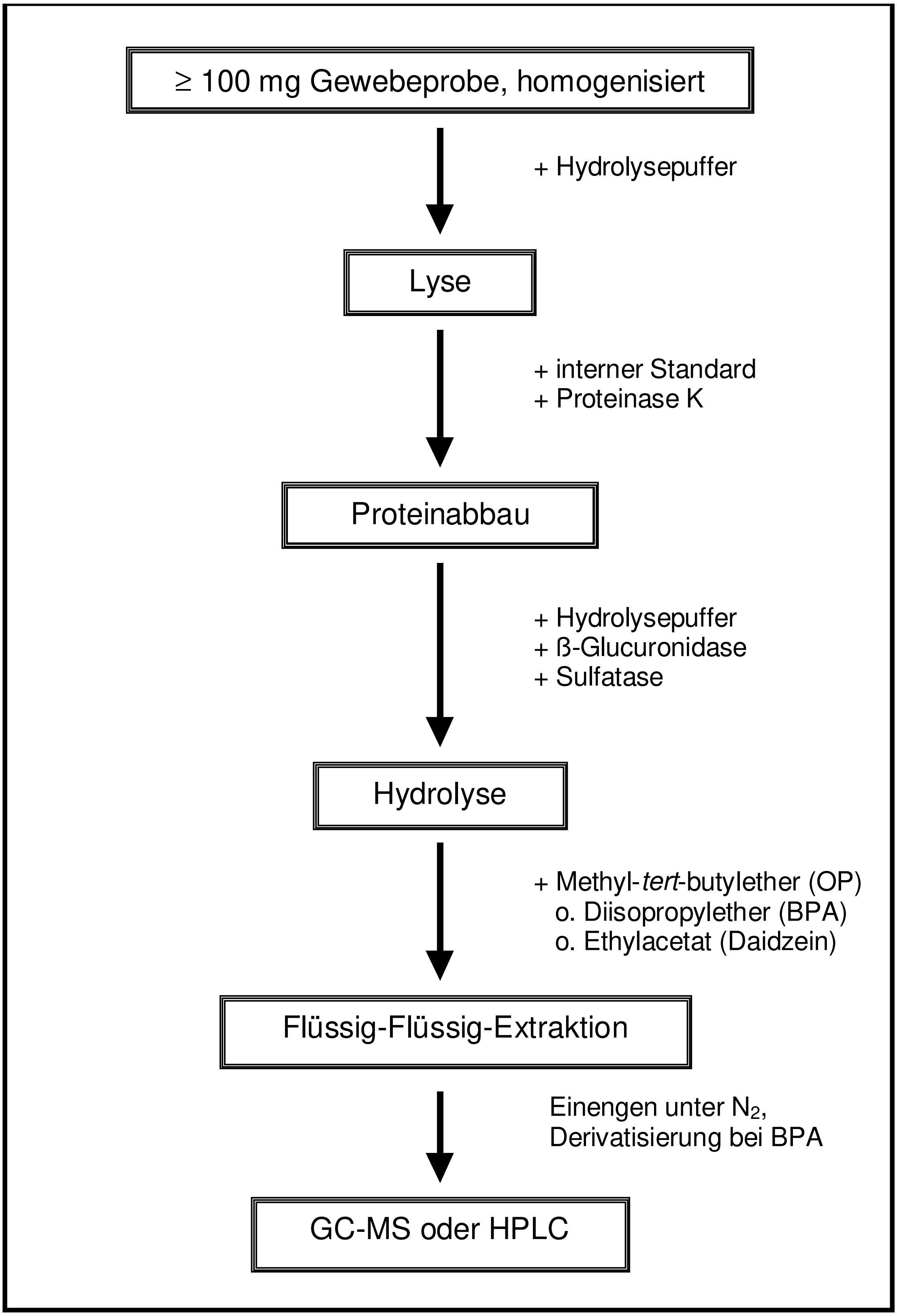


Abb. 4: allgemeines Aufarbeitungsschema der Gewebeproben

v. freies p-tert-Octylphenol in Galle

100 µl Galle werden mit 10 µl *p-tert*-Butylphenol (c = 10 µg/ml in MTBE entprechend 100 ng/Ansatz) als internem Standard versetzt. Die weitere Aufarbeitung (Flüssig-Flüssig-Extraktion) und die GC-MS-Analyse des *p-tert*-Octylphenol-Gehaltes in Galle erfolgte analog wie für Vollblutproben unter Punkt *i* (s. oben) beschrieben (s. Schema in Abb. 5).

vi. Gesamt-p-tert-Octylphenol in Galle

10 µl Galle werden mit 180 µl bidest. Wasser, 10 µl Hydrolysepuffer I (Natriumacetat c = 1 mol/l pH 5,0, Ascorbinsäure 1 % (w/v), EDTA 0,1 % (w/v)), 10 µl *p-tert*-Butylphenol (c = 10 µg/ml in MTBE entprechend 100 ng/Ansatz) als interner Standard, 8 µl Glucuronidase- und 4 µl Sulfatase-Lösung versetzt. Die Hydrolyse wurde über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Die Proben wurden dann mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion aufgereinigt und die GC-MS-Analyse erfolgte wie für Vollblutpro-ben unter Punkt *i* (s. oben) beschrieben.

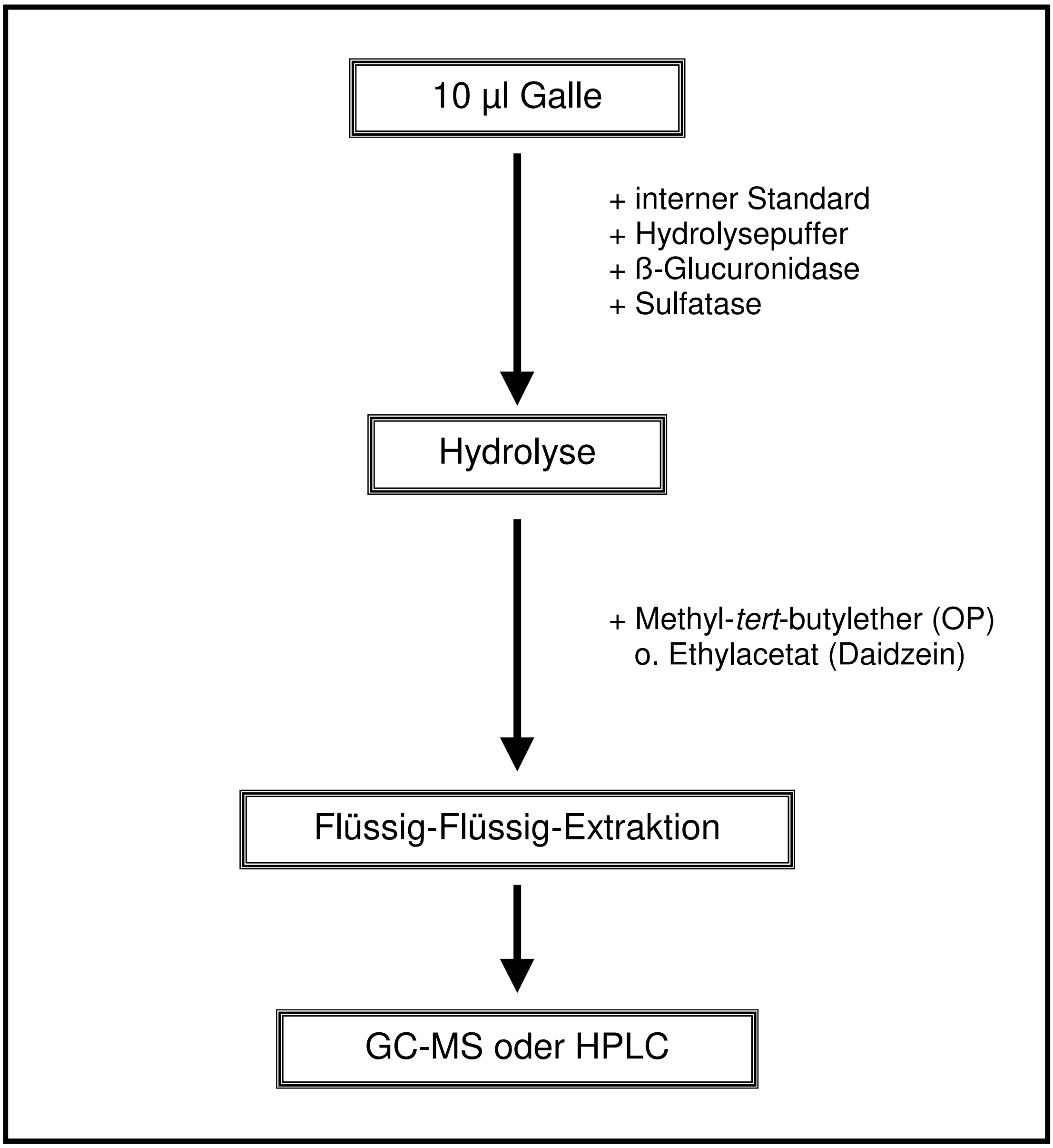


Abb. 5: allgemeines Aufarbeitungsschema der Galleproben

2.6.2 Probenaufarbeitungen für die Bisphenol A-Analysen

i. freies Bisphenol A in Plasma

Die Bestimmung der BPA-Konzentration erfolgte ebenfalls mittels Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS), nachdem die Plasmaproben einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diisopropylether nach Chahoud et al. (1999) unterzogen wurden (s. Abb. 6). Die testweise Verwendung von anderen Ethern (Diethylether, MTBE) führte zu geringeren Wiederfindungsraten und einer schlechteren Reproduzierbarkeit (s. Kap. 3.1.2). Bei der Quantifizierung diente *p-tert*-Butylphenol bzw. das entsprechende Trimethylsilyl-Derivat als interner Standard.

Für die Bestimmung der freien Bisphenol A-Spiegel wurde einer definierten Menge der Plasmaprobe (mind. 100 µl) zunächst 10 µl *p-tert*-Butylphenol (c = 10 µg/ml in Diisopropylether entprechend 100 ng/Ansatz) und 1 ml Diisopropylether als Extraktionsmedium zugesetzt. Anschließend wurde 20 min geschüttelt und nachfolgend zentrifugiert (10 min bei 4000 $Umin^{-1}$ und Raumtemperatur). Von der organischen Phase wurden 800 µl abgenommen, diese filtriert (Filter Spartan 3/30) und dann unter Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeengt. Zur Derivatisierung (Trimethylsilylierung) wurden 10 µl Acetonitril und 25 µl BSTFA (N,O-Bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamid) zugesetzt und 30 min geschüttelt (s. Abb. 7). Von dieser Lösung wurden 2 µl zur GC-MS-Analytik im EI-SIM-Modus (Elektronenstoß-Ionisation - „single ion monitoring“) eingesetzt. Es wurden folgende GC-MS-Parameter eingestellt:

Säule DB-5 (Länge 30 m, ID 0,25 / 0,32 mm, Filmdicke 0,25 µm)
Injektion splitless, purge on 1 min

Temperaturprogramm:	1 min 40 °C, dann 10 °C/min bis 16 min bei 300 °C
Injektortemperatur:	250 °C
Detektortemperatur:	200 °C

detektierte Ionen m/z = 357 (BPA-Derivat - 15); m/z = 207 (IS-Derivat - 15)

Die Bestimmung der BPA-Konzentration erfolgte anhand einer Kalibrierreihe, die täglich vor den jeweiligen Messungen auf Richtigkeit kontrolliert wurde (s. Tab. 17).
Die analytische Nachweisgrenze lag bei ≈ 12 ng/ml Plasma.

Plasma ≈ 110 - 800 µl

↓ + 1 ml Diisopropylether (inkl. *p-tert*-Butylphenol = IS)

Flüssig-Flüssig-Extraktion 20 min Schütteln (Wiederfindung 82 ± 8 %)

↓ Zentrifugation (10 min, 4000 Upm), Abnehmen der org. Phase (800 µl)

Filtrieren **organische Phase** unter N_2 zur Trockene einengen

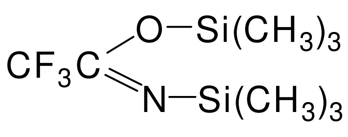
↓ + 10 µl Acetonitril + 25 µl BSTFA

Derivatisierung / Trimethylsilylierung 30 min Schütteln

↓

GC-MS Injektion von 2 µl

Abb. 6: Aufarbeitungsschema der Plasmaproben zur Bestimmung von Bisphenol A



BSTFA

$(CH_3)_3SiCl$

TMCS

Abb. 7: zur Derivatisierung von Bisphenol A verwendete Silylierungsreagenzien

ii. Gesamt-Bisphenol A in Plasma

Zur Bestimmung der Gesamt-Bisphenol A-Spiegel (Summe aus Glucuroniden, Sulfaten und freiem Bisphenol A) wurde die Plasmaprobe (mind. 100 µl) zunächst enzymatisch hydrolysiert und dann wie oben beschrieben extrahiert und analysiert (siehe Punkt *i* und Abb. 6). Für die Hydrolyse wurde eine definierte Menge Plasma mit 10 µl Hydrolysepuffer I (Natriumacetat c = 1 mol/l pH 5,0, Ascorbinsäure 1 % (w/v), EDTA 0,1 % (w/v)) vermischt und mit internem Standard, 8 µl Glucuronidase- und 4 µl Sulfatase-Lösung versetzt. Die Hydrolyse wurde bei 37 °C über Nacht durchgeführt.

iii. freies Bisphenol A in Gewebe

Gewebeproben wurden in kleine Stücke geschnitten und ohne Zusatz von Puffer mit einem Potter homogenisiert. Zu einer definierten Menge Gewebehomogenat (mind. 100 mg) wurden 500 µl Lysepuffer (NaCl c = 75 mmol/l, EDTA 25 mmol/l pH 8, 0,1 % SDS (w/v)) gegeben und die Proben für 1,5 - 2 h bei 4 °C lysiert. Anschließend wurden 10 µl *p-tert*-Butylphenol (c = 10 µg/ml in Diisopropylether entprechend 100 ng pro Ansatz) als interner Standard und 20 µl Proteinase K-Lösung zugegeben. Der Proteinabbau erfolgte 90 min bei 50 °C (s. Abb. 4). Die weitere Aufarbeitung (Flüssig-Flüssig-Extraktion, GC-MS-Analyse) erfolgte wie für Plasmaproben beschrieben. Bei den Gewebeaufarbeitungen ist das Filtrieren der Diisopropylether-Extrakte (Filter Spartan 3/30) besonders wichtig, um eventuelle restliche Zellbestandteile abzutrennen.

iv. Gesamt-Bisphenol A in Gewebe

Die Bestimmung der Gesamt-Bisphenol A-Gehalte in Gewebe erfolgte nach Lyse und Konjugatspaltung entsprechend der Bestimmung der freien Gehalte (s. oben). Zur enzymatischen Hydrolyse nach dem Proteinabbau und dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurden 50 µl Hydrolysepuffer I (Natriumacetat c = 1 mol/l pH 5,0, Ascorbinsäure 1 % (w/v), EDTA 0,1 % (w/v)), 8 µl Glucuronidase- und 4 µl Sulfatase-Lösung zugegeben. Die Hydrolyse wurde über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Die Proben wurden dann mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion weiter aufgereinigt und die GC-MS-Analyse erfolgte wie für Plasmaproben unter Punkt *i* (s. oben) beschrieben.

2.6.3 Probenaufarbeitungen für die Daidzein-Analysen

Es wurde eine analytische Methode etabliert, mit der das Isoflavon Daidzein nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 8). Für die Bestimmung des freien Isoflavons wurden zwei verschiedene chromatographische Bedingungen verwendet. Die Methode HPLC-I wurde ausschließlich für die Bestimmung von freiem Daidzein in Plasmaproben angewandt, die Methode HPLC-II konnte universell für alle weiteren Daidzein-Analysen eingesetzt werden (s. Details in Kap. 2.7.2).
Freies Daidzein wurde entsprechend der Methode von Coward et al. (1996) mit Hilfe einer Festphasenextraktion aufgereinigt. Die HPLC-Analyse basiert auf einer Methode von Franke et al. (1995, 1998), wurde aber für die Mikro-HPLC modifiziert.

i. freies Daidzein in Plasma

100 µl Plasma wurden mit 10 µl internem Standard (Biochanin A, c = 5 µg/ml in DMSO), 231,7 µl Wasser, 75 µl 1 M Ammoniumacetat-Puffer (pH 7,0) und 83,3 µl 3 M Triethylammoniumsulfat-Puffer (pH 7,0) versetzt. Bei Trennung der Proben mit der Methode HPLC-II wurden zusätzlich 10 µl Formononetin (c = 5 µg/ml in DMSO) als zweiter interner Standard zugegeben. Die Proben wurden für 10 min auf 60 °C erhitzt, um das Daidzein aus Bindungen an Plasmaproteine zu verdrängen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben über Lichrolut RP18-Kartuschen (0,5 g, Merck, Darmstadt), die zuvor mit Methanol, Wasser und 10 M Ammoniumacetat-Puffer (pH 5,0) konditioniert wurden, aufgereinigt. Dafür wurden die Kartuschen nach der Probenaufgabe mit Ammoniumacetat-Puffer und Wasser gewaschen. Das Daidzein wurde anschließend mit Methanol eluiert. Die Eluate wurden bei 45 °C unter Stickstoff zur Trockene eingedampft und dann in 100 µl einer Mischung aus 40 % Methanol in 1%iger Essigsäure aufgenommen und bis zur HPLC-Analyse bei -20 °C gelagert (s. auch Aufarbeitungsschema in Abb. 8).

ii. Gesamt-Daidzein in Plasma

Die Analyse der Gesamt-Daidzein-Spiegel wurde nach enzymatischer Hydrolyse der Glucuronide und Sulfate entsprechend durchgeführt (Methode HPLC-II, s. Kap. 2.7.2). Die Proben wurden in Anlehnung an die Methode von Gamache und Acworth (1998) hydrolysiert (s. Abb. 8). 100 µl Plasma wurden mit 100 µl Hydrolysepuffer II

(Natriumacetat c = 0,1 mol/l pH 5,0, Ascorbinsäure 0,1 % (w/v), EDTA 0,01 % (w/v)), internem Standard sowie 8 µl Glucuronidase- und 4 µl Sulfatase-Lösung gemischt. Die Hydrolyse wurde über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Die anschließende Plasmaaufarbeitung mittels Festphasenextraktion erfolgte analog wie unter Punkt *i* (s. oben) für freie Daidzein-Gehalte in Plasma beschrieben.

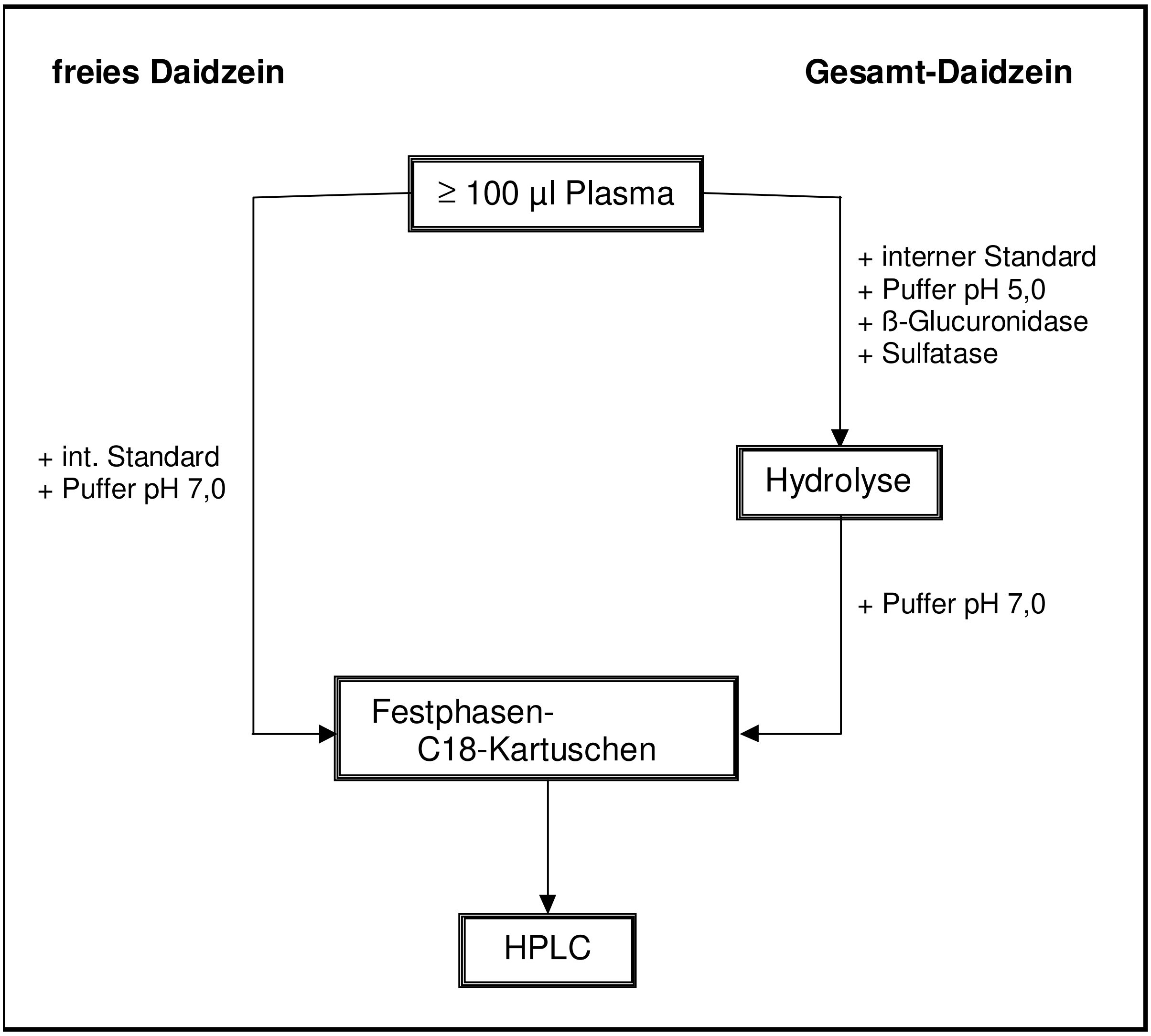


Abb. 8: Aufarbeitungsschema der Plasmaproben zur Bestimmung von freiem Daidzein und Gesamt-Daidzein

iii. Gesamt-Daidzein in Gewebe

Gewebeproben wurden in kleine Stücke geschnitten und ohne Zusatz von Puffer mit einem Potter homogenisiert. Zu jeweils 100 mg Gewebealiquots wurden 500 µl Lysepuffer (NaCl c = 75 mmol/l, EDTA 25 mmol/l pH 8,0, 1 % SDS (w/v)) gegeben und die Proben für 1,5 - 2 h bei 4 °C lysiert (s. Abb. 4). Anschließend wurden 10 µl Formononetin (c = 5 µg/ml in DMSO) als interner Standard und 20 µl Proteinase K zugegeben. Der Proteinabbau erfolgte 90 min bei 50 °C. Nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurden 50 µl Hydrolysepuffer I (Natriumacetat c = 1 mol/l pH 5,0, Ascorbinsäure 1 % (w/v), EDTA 0,1 % (w/v)), 8 µl Glucuronidase- und 4 µl Sulfatase-Lösung zugegeben. Die Hydrolyse wurde über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Die Proben wurden dann mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion weiter aufgereinigt, ensprechend der Methode von Franke et al. (1998). Dafür wurden die Proben dreimal mit je 500 µl Ethylacetat für je 20 s ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen unter Stickstoff bei 37 °C zur Trockene eingedampft. Die Rückstände wurden in jeweils 100 µl einer Mischung aus 40 % Methanol in 1%iger Essigsäure aufgenommen und bis zur HPLC-Analyse bei -20 °C gelagert (Methode HPLC-II).

iv. freies Daidzein in Galle

100 µl Galle werden mit je 16 µl Formononetin und Biochanin A (c = 25 µg/ml) als internem Standard versetzt und dreimal mit je 500 µl Ethylacetat für je 20 s ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden vereinigt und bei 37 °C unter Stickstoff zur Trockene eingedampft. Die Rückstände wurden in jeweils 100 µl einer Mischung aus 40 % Methanol in 1%iger Essigsäure aufgenommen und bis zur HPLC-Analyse bei -20 °C gelagert (Methode HPLC-II; Aufarbeitungsschema s. Abb. 5).

v. Gesamt-Daidzein in Galle

10 µl Galle werden mit 180 µl bidest. Wasser, 10 µl Hydrolysepuffer I (Natriumacetat c = 1 mol/l pH 5,0, Ascorbinsäure 1 % (w/v), EDTA 0,1 % (w/v)), je 16 µl Formononetin und Biochanin A (jeweils 250 µg/ml in DMSO), 8 µl Glucuronidase- und 4 µl Sulfatase-Lösung versetzt. Die Hydrolyse wurde über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Die Proben wurden dreimal mit je 500 µl Ethylacetat für je 20 s ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen unter Stickstoff bei 37 °C zur Trockene eingedampft. Die Rückstände wurden in jeweils 1 ml einer Mischung aus 40 % Methanol in 1%iger Essigsäure aufgenommen und bis zur HPLC-Analyse bei -20 °C gelagert (Methode HPLC-II).

Alle beschriebenen Methoden zur Daidzeinbestimmung in den jeweiligen biologischen Materialien (sowohl Probenaufarbeitung als auch Quantifizierung mittels HPLC) wurden in enger Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ulrike Schuhmacher und Frau Dr. Petra Janning entwickelt, optimiert und angewandt.

2.7 Chromatographische Trennverfahren (Latscha und Klein 1984)

Bei den chromatographischen Trennverfahren werden zur Stofftrennung zwei Phasen, eine mobile und eine stationäre, verwendet. Ein Gemisch verschiedener Analyte wird dabei mit der mobilen über die stationäre Phase bewegt. Aufgrund unterschiedlich starker Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der stationären Phase werden die Komponenten eines Gemisches im Verlauf der Trennstrecke getrennt und mit Hilfe eines Detektors erfasst (Meyer 1996). Die für die Trennung verantwortlichen physikalischen Vorgänge teilen die Chromatographie in die Adsorptions-Chromatographie (Verteilung erfolgt durch Adsorption an einem Feststoff) und Verteilungs-Chromatographie (Stofftrennung durch Lösevorgänge in zwei miteinander nicht mischbaren Phasen). Eine weitere Einteilung ermöglicht die Kombination der Phasenzustände fest, flüssig und gasförmig für die mobile und stationäre Phase. Das Detektorsignal wird als Funktion der Intensität über die Zeit als sog. Peak in einem Chromatogramm aufgezeichnet. Die Fläche des Peaks ist der Menge des Stoffes proportional. Als Retentionszeit wird die Zeit bezeichnet, die vom Einbringen der Probe in das Trennsystem bis zum Erscheinen des Stoffes am Detektor vergeht.
In dieser Arbeit wurde die Hochleistungsflüssig-Chromatographie in Verbindung mit einem UV/VIS-Detektor (HPLC-UV/VIS) und die Kapillar-Gaschromatographie gekoppelt mit einem Massenspektrometer (GC-MS) verwendet.

2.7.1 Trennung und Detektion mittels GC-MS (Hübschmann 1996)

Die GC-MS ist eine moderne leistungsfähige Methode zur Bestimmung einzelner Substanzen in komplexen Gemischen. Die Massenspektrometrie als Detektionsmethode liefert hierbei Daten hoher Aussagekraft aus dem direkten Nachweis der Substanzmolekülionen oder ihrer Fragmente. Die Dosierung der Probelösung wird in einem konstant beheizten Injektor vorgenommen. Abhängig vom teilweise oder vollständigen Transfer der Lösemittel- und Proben-Anteile in das Trennsystem werden die Betriebsweisen Split-Injektion und Totalaufgabe (splitless) unterschieden. Das Trägergas Helium transportiert das Substanzgemisch über die Kapillarsäule (DB-5-MS mit 95 %-Dimethyl-5 %-diphenyl-polysiloxan als unpolare stationäre Phase) zum Detektor. Der Detektor, eine Ionenfalle, ist eingerichtet für die Elektronenstoß-Ionisierung (EI) und die chemische Ionisierung (CI). Bei der EI werden in der Probe durch Beschuss mit hochenergetischen Elektronen zunächst Molekülionen erzeugt, die anschließend weiter fragmentieren. Häufig ist das Molekülion nur in geringer Intensität vorhanden. Die CI ist eine Ionisierungstechnik, bei der mit Hilfe eines Reaktandgases und dessen Reaktand-Ionen meist einfach protonierte Molekülionen erzeugt werden.

2.7.2 Analysen mittels HPLC

Bei der HPLC wird mit Hilfe von Pumpen die flüssige mobile Phase durch die Trennsäule gepumpt. In dieser Arbeit wurde die reversed-phase-Technik eingesetzt, d. h. die stationäre Phase (eine Umkehrphase mit C_{18}-Kohlenstoffketten) ist weniger polar als die mobile Phase (Gemische aus Acetonitril, Dichlormethan, Methanol, Essigsäure und Wasser). Als Detektor wurde ein UV/VIS-Spektralphotometer für die folgenden chromatographischen Anwendungen verwendet.

<u>HPLC-I</u>

Diese HPLC-Methode basiert auf einer Methode von Franke et al. (1995, 1998), wurde aber für die Mikro-HPLC modifiziert. Durch Einsatz der Mikro-HPLC konnte die Nachweisgrenze deutlich verbessert werden (statt ca. 25 ng absolut in der „Normal"-HPLC nun ca. 250 pg absolut bei der Mikro-HPLC).
Die Trennung und Quantifizierung von Daidzein erfolgte unter folgenden Bedingungen auf einer analytischen Säule:

Hauptsäule:	Luna 3 µm C18(2) 150 x 1 mm (Phenomenex)
Vorsäule:	Luna 3 µm C18(2) 30 x 1 mm (Phenomenex)
Laufmittel A:	10 % Acetonitril und 1 % Essigsäure in Wasser
Laufmittel B:	Acetonitril
Gradient:	0 - 5 min, 25 % B in A
	5 - 20 min 25 - 70 % B in A
	20 - 40 min 70 % B in A
	40 - 50 min 25 % B in A
Flußrate:	ca. 40 µl/min (nach Splitter; vor Splitter ca. 260 µl/min) (der pumpenseitige Fluß von 260 µl/min wurde mit Hilfe eines Splitters reduziert).
UV-Detektion:	250 nm

Die Nachweisgrenze lag bei ca. 25 ng Daidzein pro Milliliter Plasma.
Mit diesem System ist die Konzentrationsbestimmung von Daidzein gut möglich, nicht aber die von Genistein. Genistein kochromatographiert mit Equol (einem Metaboliten von Daidzein) und bei einigen Proben auch mit Matrixbestandteilen. Deshalb wurde die chromatographische Trennung weiter optimiert (s. HPLC-II).

HPLC-II

Auch diese Methode beruht auf einem von Franke et al. (1998) beschriebenen Verfahren. Chromatographische Säulen und Flußrate entsprechen den unter HPLC-I angegebenen.

Laufmittel A:	10 %ige Essigsäure vorgemischt mit 10 % Laufmittel B
Laufmittel B:	Mischung aus Methanol / Acetonitril / Dichlormethan (10 / 5 / 1, v/v/v)
Gradient:	0 - 5 min, 25 % B in A
	5 - 25 min, 25 - 50 % B in A
	25 - 40 min, 50 - 100 % B in A
	40 - 41 min, 100 - 25 % B in A
	41 - 50 min, 25 % B
UV-Detektion:	250 nm und 281 nm

Mit dieser Methode ist es möglich, Daidzein und Genistein parallel zu quantifizieren. Die Quantifizierung erfolgte bei 250 nm bezogen auf Formononetin als internem Standard. Die Nachweisgrenze für beide Substanzen lag bei ca. 25 ng/ml Plasma. Bei 281 nm war es im Prinzip möglich, auch Equol zu analysieren, wobei Biochanin A hier der geeignetere interne Standard ist. Allerdings ist aufgrund der geringen UV-Extinktion von Equol die Nachweisgrenze nicht ausreichend, um die in den meisten Proben vorliegende niedrige Equol-Konzentration sicher zu quantifizieren.
Die parallele Detektion bei 250 und 281 nm bietet den Vorteil, daß über Kontrolle des Peakflächenverhältnisses 250 / 280 nm bei einzelnen Proben mit Daidzein bzw. Genistein koeluierende Substanzen leichter erkannt werden können. Die Peakflächenverhältnisse betragen bei adäquater Trennung für Daidzein ca. 2,5 und für Genistein ca. 2,2.

Peakidentität

HPLC-Peaks wurden durch Vergleich der Retentionszeiten von Standard-Lösungen mit denen von Proben identifiziert. Zu einigen Proben wurde Standardsubstanz addiert, um zu überprüfen, ob sich die Retentionszeiten durch Matrixeffekte verschieben. Bei keiner der getesteten Matrices wurden Verschiebungen beobachtet.
Zusätzlich wurden einige Proben einer jeden Matrix halbquantitativ mit Hilfe einer HPLC-Elektrospray-MS-Kopplung überprüft. Die Ergebnisse der HPLC-Analysen mit

UV-Detektion wurden für Daidzein und Genistein in allen Fällen bestätigt. Die Durchführung dieser Überprüfungen mittels HPLC-Elektrospray-MS erfolgte durch Frau Dr. Petra Janning und Herrn Dr. W. Nigge am Institut für Spektrochemie und angewandte Spektroskopie an der Universität Dortmund (ISAS). An dieser Stelle sei beiden nochmals herzlich hierfür gedankt.

Genistein läßt sich auf diese Weise genauso empfindlich wie Daidzein nachweisen und gut quantifizieren. Da Genistein aber für die von mir durchgeführten Projektteile nicht relevant war, wird in dieser Dissertation auf eine Auswertung der teilweise parallel bestimmten Genisteingehalte verzichtet.

2.8 Statistische Größen und Begriffe der Analytik (Doerffel 1987)

Kalibrierfunktion

Die meisten instrumentellen Analysenmethoden sind Relativverfahren und müssen kalibriert werden, d. h. es muß der Zusammenhang zwischen einem detektierbaren Meßsignal y und der Analytkonzentration c anhand bekannter Proben ermittelt werden [Otto 1995]. Die Abhängigkeit der Signalgröße von der Analytkonzentration wird durch die Kalibrierfunktion beschrieben. Besteht, wie oft der Fall, ein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Größen, so kann dieser dargestellt werden durch:

$$y = m \cdot c + a \qquad \text{(Gl. 1)}$$

Die Steigung m der Bezugsfunktion

$$m = \partial y / \partial c \qquad \text{(Gl.2)}$$

wird als *Empfindlichkeit* des Analysenverfahrens bezeichnet.

Hierbei ist y der (einheitenlose) Meßwert und
c die Konzentration des meßwertliefernden Teilchens

Die Größe a in Gleichung 1 entspricht dem Blindwertbeitrag, also dem Analysensignal, das sich bei der Durchführung des Verfahrens mit einer Analytkonzentration c = 0 ergibt. Unbekannte Konzentrationen einer analysierten Probe können, wenn m und a bekannt sind, mit Gleichung 1 ermittelt werden [Fifield 1990, Doerffel 1994].

Eine *Blindprobe* enthält die bei der Erstellung der Probenlösung verwendeten Chemikalien in der gleichen Konzentration wie die Meßlösung, jedoch ohne die zu analysierende Probe.

Eine *Leerprobe* (oder *Leerwertlösung*) enthält sowohl die bei der Erstellung der Probenlösung verwendeten Chemikalien als auch die Bestandteile der Probe, welche die Messung beeinflussen (z. B. biologisches Probenmaterial aus Kontrolltieren), in gleicher oder ähnlicher Konzentration wie die zu analysierende Probe. Hierbei ist jedoch nicht die zu bestimmende Substanz zugefügt.

Die *Richtigkeit* ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen der wahren Konzentration für ein Element in einer Probe und dem ermittelten Mittelwert bei einer häufig wiederholten Bestimmung nach einem Analysenverfahren.

Die *Präzision* ist ein Maß für die Streuung der Ergebnisse, wenn das Analysenverfahren unter gleichen Bedingungen wiederholt wird. Sie wird bei einer Normalverteilung der Meßwerte durch die *absolute Standardabweichung* σ_{abs} dargestellt. Sie ist gegeben durch

$$\sigma_{abs} = \sqrt{\frac{\Sigma(\bar{x} - x_i)^2}{(n-1)}} \qquad \text{(Gl. 3)}$$

wobei $\bar{x}$ der Mittelwert aller Meßwerte, x_i die einzelnen Meßwerte und n die Anzahl der Meßwerte sind.

Aus der absoluten Standardabweichung σ_{abs} errechnet sich die *relative Standardabweichung* σ_{rel}, auch Variationskoeffizient VK genannt, nach:

$$\sigma_{rel} = \mathrm{VK} = \frac{\sigma_{abs}}{\bar{x}} \cdot 100\% \qquad \text{(Gl. 4)}$$

Die *Nachweisgrenze* c_L eines Bestimmungsverfahrens gibt an, welche Konzentration c (oder Masse m) noch mit einer vorgegebenen statistischen Sicherheit nachgewiesen werden kann. Die Nachweisgrenze wird durch das kleinste von der Blindprobe noch signifikant unterscheidbare Analysensignal bestimmt.

Sie ist durch folgende Gleichung definiert :

$$c_L = (\, \partial c/\partial A \,) \cdot 3 \cdot \sigma_{abs} \cdot \sqrt{2} \qquad \text{(Gl. 5)}$$

Hierbei ist $(\partial c/\partial A)$ die reziproke Empfindlichkeit des Verfahrens und σ_{abs} die absolute Standardabweichung der Meßgröße A, die aus Messungen mit Nullwertlösungen (reines Lösungsmittel, z. B. bidestilliertes Wasser oder andere undotierte Matrix) ermittelt wird. Die Nachweisgrenze hängt von der Empfindlichkeit ab, da diese die für eine bestimmte Konzentration oder Masse erreichbare Signalhöhe angibt. Als zweite Variable beinhaltet die Nachweisgrenze zusätzlich die Fluktuation des Untergrundes, auch „Rauschen" genannt. Der Faktor $\sqrt{2}$ resultiert aus der quadratischen Addition der Rauschbeiträge des Signals und des maßgeblichen Untergrundes. In der Praxis wird das Nachweisvermögen aber durch die Schwankungen der Blind- bzw. Leerproben bestimmt. Der Faktor 3 dient der genügenden statistischen Sicherheit von 99,86 %.

2.9 Berechnung der toxikokinetischen Parameter

Die orale Bioverfügbarkeit

Die orale Bioverfügbarkeit wird durch den Anteil einer gegebenen Dosis beschrieben, der nach Applikation *per* os im Darm resorbiert wird und dann nach Passage der Leber unverändert im systemischen Kreislauf erscheint.

Die orale Bioverfügbarkeit wurde aus den verabreichten Dosen und den Flächen unter den Kurven nach oraler bzw. intravenöser Applikation berechnet. Dafür wurden die Kurven der Mittelwerte aller Tiere berücksichtigt.

$$F = \frac{AUC_{oral} * Dosis_{iv}}{Dosis_{oral} * AUC_{iv}}$$

(Gl. 6)

Das Dreikompartimenten-Modell

Der zeitliche Verlauf eines Fremdstoffes in Blut, Plasma, Urin oder anderen Exkreta läßt sich unter vereinfachenden Annahmen mit Hilfe von sogenannten Kompartiment-Modellen analysieren. Dabei werden der komplizierte Aufbau und die vielfältigen Funktionen des Organismus vereinfacht: man teilt den Organismus in verschiedene hypothetische Verteilungsräume (Kompartimente) ein, die physiologisch aus verschiedenen Flüssigkeitsräumen bzw. Geweberäumen bestehen können. Die Kompartimente müssen aber nicht physiologisch abgrenzbar sein und stellen oft nur hypothetische Hilfsmittel für kinetische Ableitungen dar. Ein Kompartiment ist defi-

niert als Verteilungsraum, in dem eine gleichmäßige Verteilung des betrachteten Wirkstoffes angenommen wird. Man spricht in diesem Fall von einem „Einkompartiment-Modell“. Oft ist diese Annahme nicht ausreichend und es müssen zumindest zwei oder auch mehr Verteilungsräume angenommen werden. Doch selbst diese Modelle sind meist erhebliche Vereinfachungen der tatsächlich ablaufenden Verteilungs- und Ausscheidungsprozesse. Meist besitzen die kinetischen Kompartimente kein physiologisches Korrelat, sondern sind streng genommen mathematische Größen, die es erlauben, den Konzentrationsverlauf eines Fremstoffes im Plasma, Urin oder Blut zu modellieren. Die einzelnen Kompartimente repräsentieren hierbei unterschiedlich gut erreichbare Verteilungsräume bzw. Körperflüssigkeiten, Gewebe etc.
Unter Verwendung des Dreikompartimenten-Modells lassen sich hier Ausgleichskurven an die jeweiligen Graphen der Blut-/Plasmakonzentrationen nach *i.v.*-Applikation gegen die Zeit mathematisch annähern. Nach diesem Modell resultiert eine Gleichung (Derendorf und Garett, 1987) für die Blut-/Plasmaspiegel C_p mit drei Exponentialtermen:

$$C_p = A * e^{-\alpha t} + B * e^{-\beta t} + C * e^{-\gamma t} \qquad \text{(Gl. 7)}$$

Die terminale Halbwertszeit

Die Halbwertszeit ist generell der Zeitraum, in dem eine im Organismus befindliche Stoffmenge durch Stoffwechselleistung, Ausscheidung etc. auf die Hälfte absinkt. In dieser Arbeit ist jeweils konkret die *terminale* Halbwertszeit gemeint, die sich auf die Eliminationsleistung bezieht, und deshalb auch als Eliminationshalbwertszeit bezeichnet wird.

Die terminalen Eliminationshalbwertszeiten wurden nach Anpassung der Daten aus dem γ-Term (Eliminationsphase) wie folgt berechnet:

$$t_{½} \text{ (in h)} = \frac{\ln 2}{\gamma \cdot 60} \qquad \text{(Gl. 8)}$$

3 Ergebnisse

3.1 Analytik

3.1.1 Qualität der Analysen von *p-tert*-Octylphenol

Es wurde sowohl die Reproduzierbarkeit der gesamten analytischen Methode (inklusive Probenaufarbeitung/Extraktion) als auch die Reproduzierbarkeit der Bestimmung mittels GC-MS als Endpunkt kontrolliert und wie folgt bestimmt.
3-fache GC-MS-Detektion von Vollblutextrakten ergab bei nominal 20 ng OP/100 µl 20,11 ± 0,967 ng/100 µl, bei nominal 100 ng OP/100 µl 98,34 ± 1,455 ng/100 µl und bei nominal 500 ng OP/100 µl 489,3 ± 10,45 ng/100 µl (jeweils Mittelwerte ± Standardabweichung; s. Tab. 14). Für die Reproduzierbarkeit der gesamten analytischen Methode inklusive der Extraktion ergaben sich nach 5-facher Bestimmung folgende Daten: bei nominal 20 ng OP/100 µl 21,12 ± 1,131 ng/100 µl, bei nominal 100 ng OP/100 µl 101,4 ± 3,532 ng/100 µl und bei nominal 500 ng OP/100 µl 493,5 ± 29,39 ng/100 µl (jeweils Mittelwerte ± Standardabweichung; s. Tab. 13).
Zur Qualitätssicherung wurde an jedem Tag, an dem OP-Bestimmungen mittels GC-MS durchgeführt wurden, ein Punkt der Kalibration wiederholt. Die Abweichung dieser tagesaktuellen OP-Konzentration der jeweiligen Kalibrierlösung von der Zielkonzentration variierte von 0,3 % bis 13,3 % (Mittelwert bei 19 Proben 4,8 %; s. Tab. 16).
Zudem wurde täglich vor den OP-Bestimmungen 1 µl einer CDNB-Lösung (3 ng/ml in n-Hexan) zur Überprüfung der Sensitivität des GC-MS-Systems injiziert.
Für die Mittelwerte der Wiederfindungsraten nach 3-fach-Bestimmung ergaben sich 97,77 % bei 20 ng OP/100 µl Vollblut, 73,02 % bei 100 ng OP/100 µl Vollblut und 73,98 % bei 500 ng OP/100 µl Vollblut. Die Gesamtwiederfindungsrate (je 9 Bestimmungen bei 20, 100 und 500 ng OP/100 µl Vollblut) war 81,59 ± 11,89 % (Mittelwert ± Standardabweichung; s. Tab. 15).

Nachfolgend sind beispielhaft Kalibrierungen zur Quantifizierung von *p-tert*-Octylphenol in Blut und Galle dargestellt.
Zur Kalibrierung wurden OP-freien Vollblutproben von Kontrolltieren jeweils definierte Mengen an OP zugesetzt (s. Tab. 11 und Abb. 9). Ebenso wurden OP-freien Galle-

proben von Kontrolltieren jeweils definierte Mengen an OP zugesetzt (s. Tab. 12 und Abb. 10). Bei der Bestimmung von OP in Gewebeproben wurde analog verfahren.

Tab. 11: Beispiel einer Kalibrierreihe zur Quantifizierung von OP in Vollblut

Kalibrier-lösungen	BUT c [ng/Ansatz]	BUT Fläche	OP c [ng/Ansatz]	OP Fläche	OP/BUT c/c	OP/BUT Fläche/Fläche
1	100	733364	0	1	0	1,363E-06
2	100	1002905	5	79779	0,05	0,079
3	100	776695	10	108418	0,1	0,139
4	100	952802	50	628856	0,5	0,660
5	100	1040367	100	1486391	1	1,429
6	100	972694	500	7573595	5	7,786
7	100	1195691	1000	18580846	10	15,53

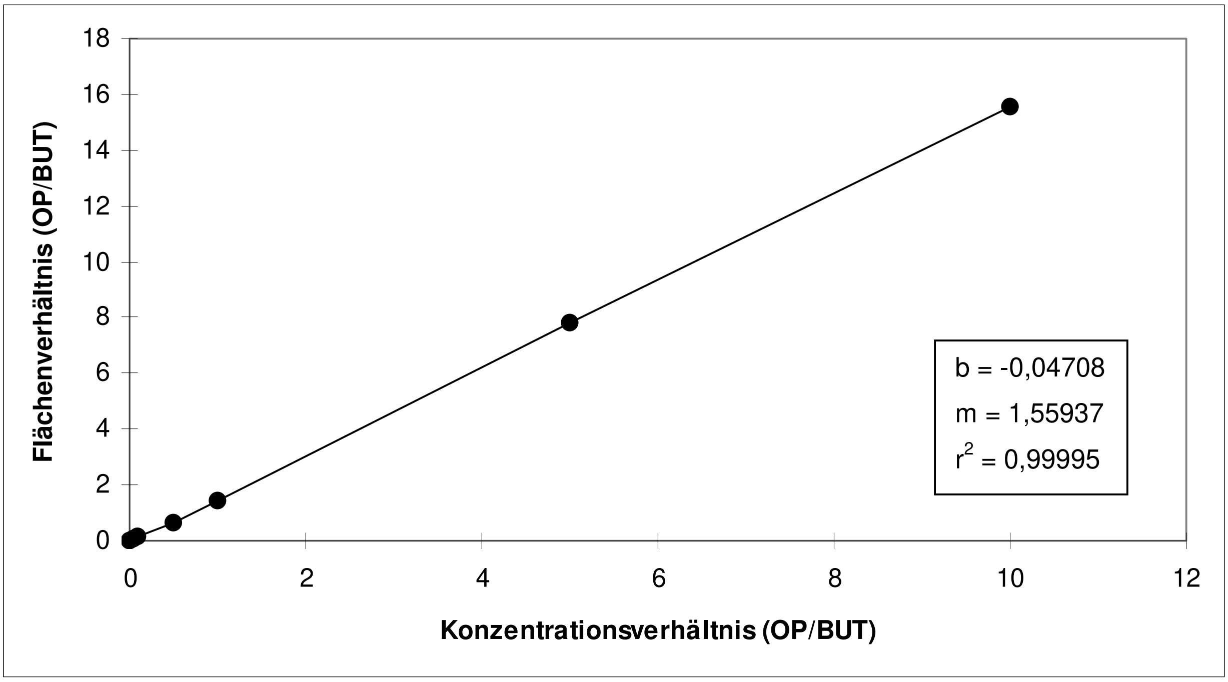


Abb. 9: Beispiel einer Kalibriergeraden zur Quantifizierung von OP in Vollblut (Meßdaten in Tab. 11)

Tab. 12: Beispiel einer Kalibrierreihe zur Quantifizierung von OP in Galle

Kalibrier-lösungen	BUT c [ng/Ansatz]	BUT Fläche	OP c [ng/Ansatz]	OP Fläche	OP/BUT c/c	OP/BUT Fläche/Fläche
1	100	1684234	0	1	0	5,937E-07
2	100	697299	5	48271	0,05	0,069
3	100	544175	10	99839	0,1	0,183
4	100	848411	50	477145	0,5	0,562
5	100	1164483	100	1516108	1	1,301
6	100	2395909	500	15189006	5	6,339
7	100	3538263	2000	89694394	20	25,35

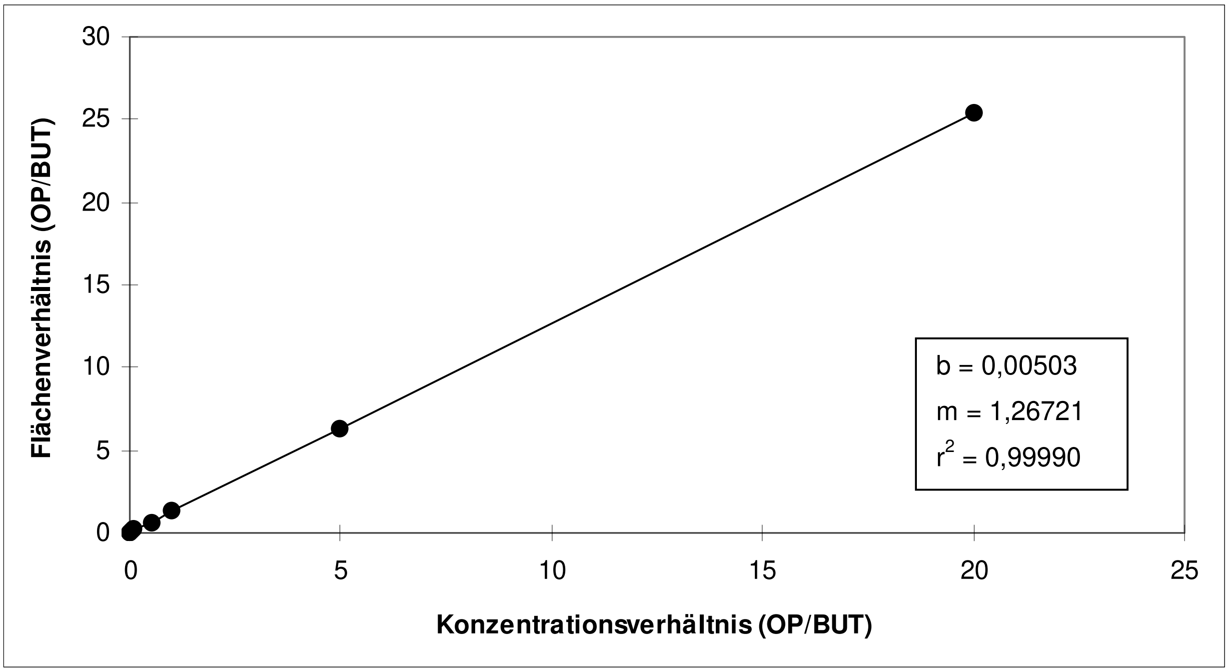


Abb. 10: Beispiel einer Kalibriergeraden zur Quantifizierung von OP in Galle (Meßdaten in Tab. 12)

Tab. 13: Reproduzierbarkeit der Methode zur Bestimmung von OP in Vollblut (inklusive Probenaufarbeitung; 5-fach-Bestimmung);
kursive Werte = Proben für GC-MS-Reproduzierbarkeit gemäß Tab. 14

	20 ng OP/100 µl VB	100 ng OP/100 µl VB	500 ng OP/100 µl VB
1. Bestimmung	20,84	102,0	481,8
2. Bestimmung	21,51	102,8	*488,9*
3. Bestimmung	22,09	95,91	517,2
4. Bestimmung	22,39	*99,70*	447,5
5. Bestimmung	*19,21*	106,6	532,0
Mittelwerte	**21,21**	**101,4**	**493,5**
Standard-abw. [abs.]	1,131	3,532	29,39
Standard-abw. [%]	5,6	3,5	5,9

Tab. 14: Reproduzierbarkeit des GC-MS-Systems bei der Bestimmung von OP (3-fach-Bestimmung derselben aufgearbeiteten Probe)

	20 ng OP/100 µl VB	100 ng OP/100 µl VB	500 ng OP/100 µl VB
1. Bestimmung	20,89	97,28	491,1
2. Bestimmung	18,75	100,4	501,1
3. Bestimmung	20,70	97,35	475,7
Mittelwerte	**20,11**	**98,34**	**489,3**
Standard-abw. [abs.]	0,967	1,455	10,45
Standard-abw. [%]	4,8	1,5	2,1

Tab. 15: Wiederfindungsraten von OP bei der Aufarbeitung von Vollblutproben (3-fach-Bestimmung)

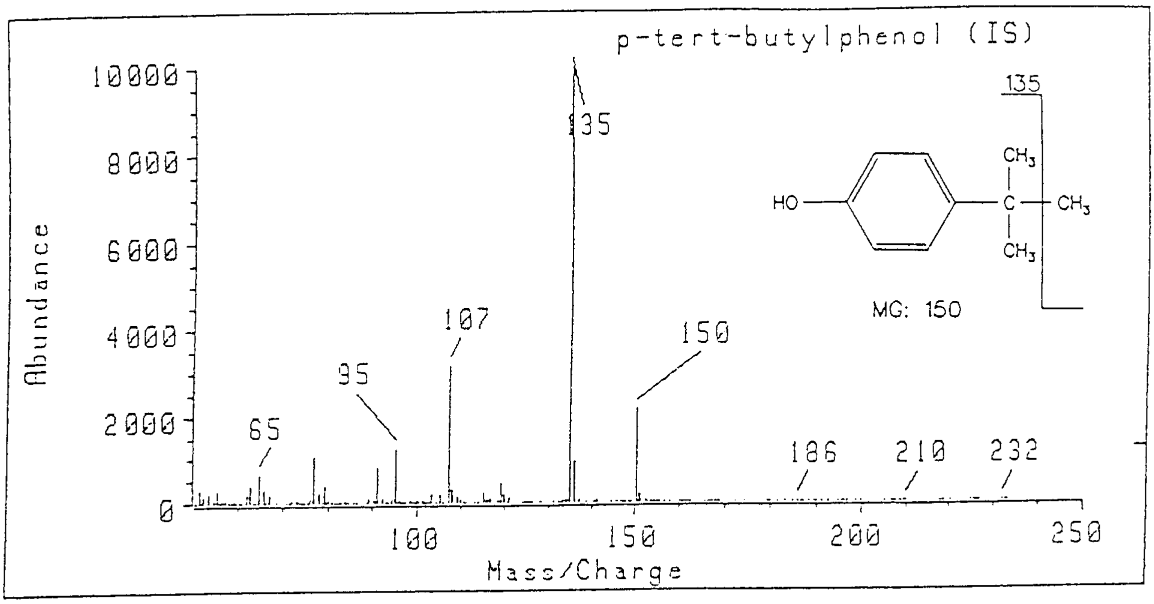
OP-Konzentration [ng/100 µl VB]	bestimmte OP-Konzentration [ng/100 µl VB]	Wiederfindungsrate [%]	Mittelwert je Konz. [%]
20	19,30	96,50	
20	20,53	102,7	97,77
20	18,83	94,15	
100	70,50	70,50	
100	74,63	74,63	73,02
100	73,94	73,94	
500	362,2	72,44	
500	351,2	70,24	73,98
500	396,3	79,26	
durchschnittliche Wiederfindungsrate [%]		**81,59**	
Standardabweichung [%]		11,89	

Tab. 16: Kalibrierpunktwiederholungen vor jeder Meßreihe bei der OP-Bestimmung in Vollblut
(Qualitätssicherung durch Vergleich von Soll- und Ist-Konzentration)

Zielkonzentration [ng OP/Vial]	bestimmte Konzentration [ng OP/Vial]	Abweichung von Zielkonzentration [%]	Datum der Messung
100	111,0	11,0	13.11.97
500	482,0	3,6	14.11.97
50	50,41	0,8	20.11.97
10	11,25	12,5	21.11.97
50	49,76	0,5	26.11.97
10	10,17	1,7	27.11.97
50	49,09	1,8	28.11.97
50	46,09	7,8	03.12.97
10	11,33	13,3	16.12.97
100	99,69	0,3	17.12.97
10	10,47	4,7	15.01.98
100	99,14	0,9	16.01.98
50	47,89	4,2	20.01.98
100	100,3	0,3	21.01.98
100	97,04	3,0	21.04.98
500	511,4	2,3	22.04.98
5	4,686	6,3	23.04.98
10	10,51	5,1	24.04.98
10	11,06	10,6	28.04.98
	Mittelwert:	**4,8**	

Die analytische Nachweisgrenze betrug im Mittel bei Bestimmungen von *p-tert*-Octylphenol im Vollblut ca. 3 ng/ml bzw. 0,3 ng/100 µl Vollblutprobe. Sie variierte jedoch je nach verwendetem GC-MS-Gerät und Probenmaterial im Bereich 1 - 8 ng/ml. Bei Gallenproben ließen sich generell Werte unter dem Mittelwert erreichen, währenddessen die Nachweisstärke bei Gewebeextrakten aufgrund von matrixbedingten Untergrundstörungen im Chromatogramm generell nachließ.

Abbildung 11 zeigt die Massenspektren von *p-tert*-Octylphenol und dem internen Standard *p-tert*-Butylphenol mit den jeweiligen Molekülfragmenten, die zur Quantifizierung herangezogen wurden. In Abbildung 12 werden die GC-MS-Chromatogramme unterschiedlich hoch dotierter Blutproben exemplarisch dargestellt.



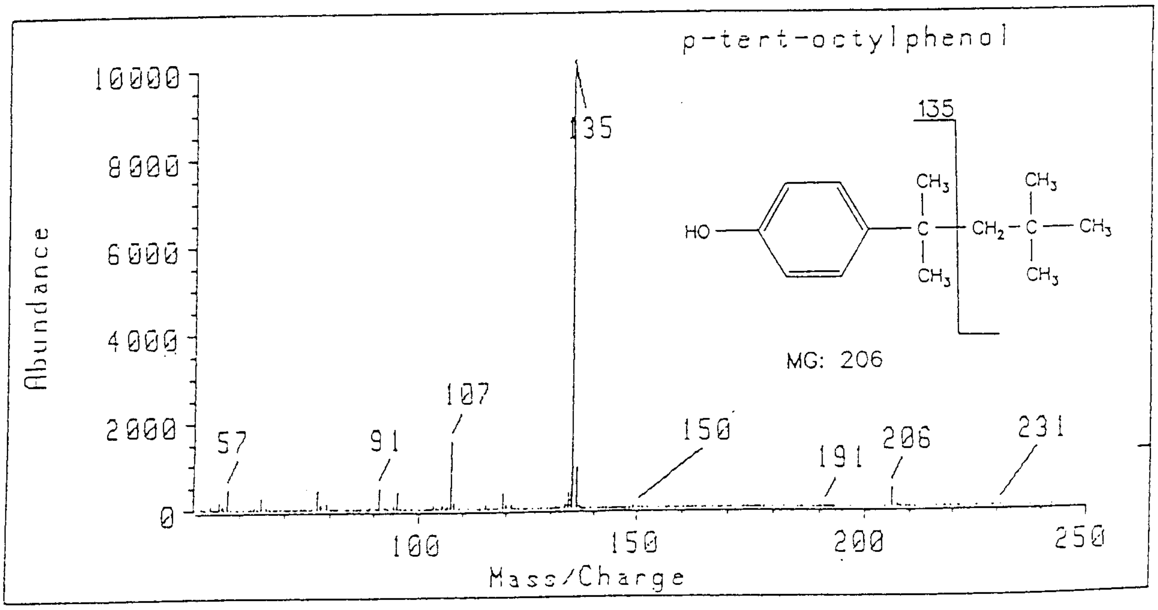


Abb. 11: Massenspektren von *p-tert*-Octylphenol und *p-tert*-Butylphenol (IS)

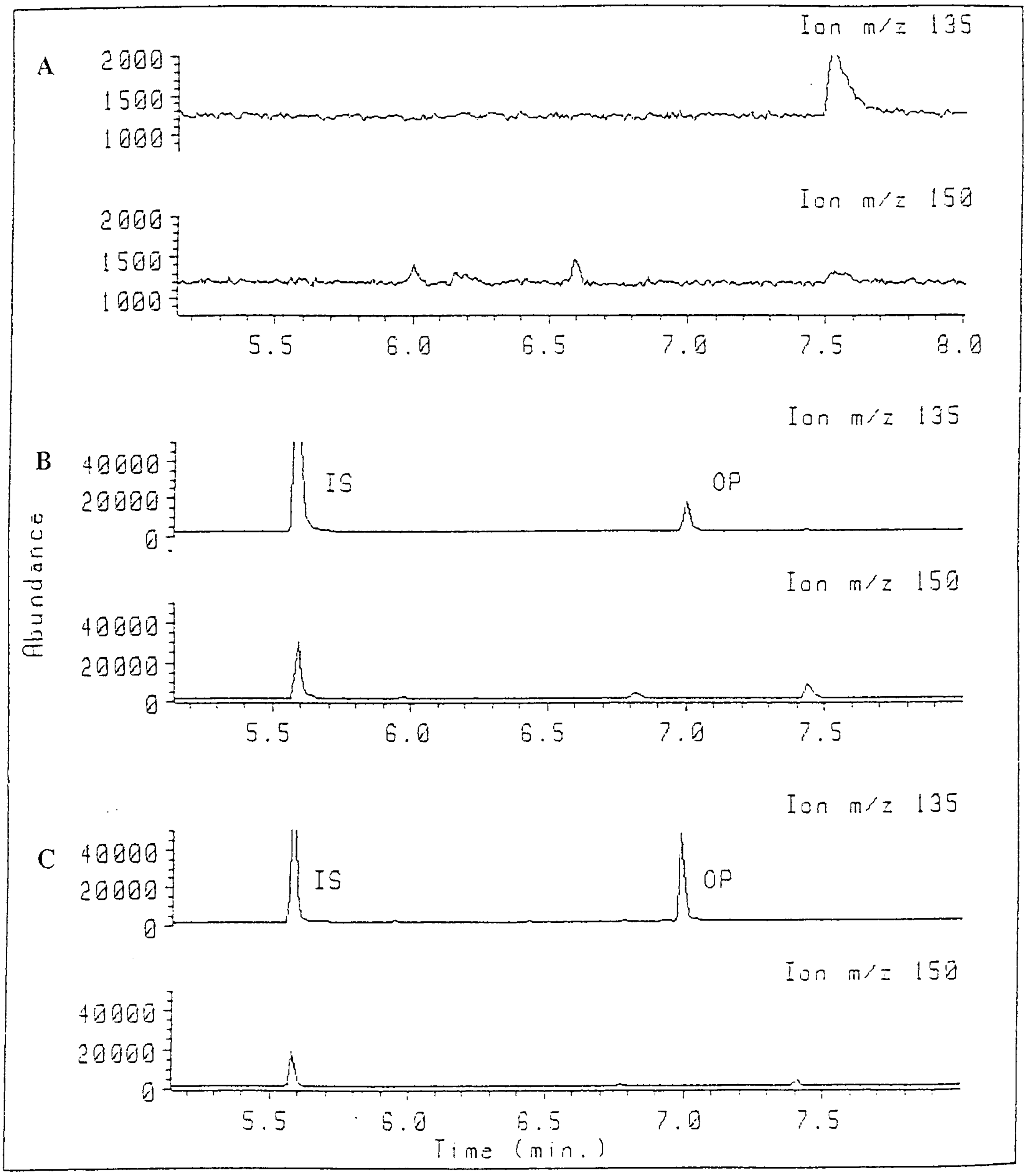


Abb. 12: GC-MS-Chromatogramme verschiedener Blutproben

A: Blutprobe eines Kontrolltieres

B: Blutprobe eines Kontrolltieres, dotiert mit 4 ng OP und 100 ng IS/100 µl

C: Blutprobe eines Tieres aus der Dosisgruppe 200 mg/kg KG *p.o.*

3.1.2 Qualität der Analysen von Bisphenol A

Es wurde analog zum *p-tert*-Octylphenol sowohl die Reproduzierbarkeit der gesamten analytischen Methode (inklusive Probenaufarbeitung/Extraktion und Derivatisierung) als auch die Reproduzierbarkeit der Bestimmung mittels GC-MS als Endpunkt kontrolliert und wie folgt bestimmt.

3-fache GC-MS-Detektion von Plasmaextrakten ergab bei nominal 20 ng BPA/100 µl 19,87 ± 0,852 ng/100 µl, bei nominal 100 ng BPA/100 µl 98,41 ± 2,044 ng/100 µl und bei nominal 500 ng BPA/100 µl 482,1 ± 12,68 ng/100 µl (jeweils Mittelwerte ± Standardabweichung). Für die Reproduzierbarkeit der gesamten analytischen Methode inklusive der Extraktion und Derivatisierung ergaben sich nach 5-facher Bestimmung folgende Daten: bei nominal 20 ng BPA/100 µl 19,32 ± 1,431 ng/100 µl, bei nominal 100 ng BPA/100 µl 97,57 ± 5,854 ng/100 µl und bei nominal 500 ng BPA/100 µl 479,5 ± 37,15 ng/100 µl (jeweils Mittelwerte ± Standardabweichung).

Zur Qualitätssicherung wurde an jedem Tag, an dem BPA-Bestimmungen mittels GC-MS durchgeführt wurden, ein Punkt der Kalibration wiederholt. Die Abweichung dieser tagesaktuellen BPA-Konzentration der jeweiligen Kalibrierlösung von der Zielkonzentration variierte von 0,5 % bis 14,1 % (Mittelwert bei 12 Proben 7,0 %).

Zudem wurde täglich vor den BPA-Bestimmungen 1 µl einer CDNB-Lösung (3 ng/ml in n-Hexan) zur Überprüfung der Sensitivität des GC-MS-Systems injiziert.

Für die Mittelwerte der Wiederfindungsraten nach 3-fach-Bestimmung ergaben sich 73,07 % bei 20 ng BPA/100 µl Plasma, 83,89 % bei 100 ng BPA/100 µl Plasma und 89,44 % bei 500 ng BPA/100 µl Plasma. Die Gesamtwiederfindungsrate (je 9 Bestimmungen bei 20, 100 und 500 ng BPA/100 µl Plasma) war 82,13 ± 8,33 % (Mittelwert ± Standardabweichung). Alle oben genannten Daten resultieren aus der Aufarbeitungsweise, wie sie im Kapitel 2.6.2 beschrieben ist, d. h. unter Verwendung von Diisopropylether bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion. Bei testweiser Verwendung von Diethylether und MTBE lagen die Gesamtwiederfindungsraten (je 9 Bestimmungen bei 20, 100 und 500 ng BPA/100 µl Plasma) bei 65,44 ± 15,03 % (Mittelwert ± Standardabweichung) für Diethylether bzw. bei 71,87 ± 8,61 % (Mittelwert ± Standardabweichung) für MTBE. Daher wurde für nachfolgende Untersuchungen aufgrund der besseren Werte für die Wiederfindungsrate und Reproduzierbarkeit Diisopropylether als Extraktionsmittel verwendet.

Zur Kalibrierung wurden BPA-freien Plasmaproben von Kontrolltieren jeweils definierte Mengen an BPA zugesetzt (s. Tab 17).

Tab. 17: Beispiel einer Kalibrierreihe zur Quantifizierung von BPA in Plasma

Kalibrier-lösungen	BUT c [ng/Ansatz]	BUT Fläche*	BPA c [ng/Ansatz]	BPA Fläche*	BPA/BUT c/c	BPA/BUT Fläche/Fläche*
1	100	2101893	0	6139	0	2,92E-03
2	100	1676096	5	378588	0,05	0,225
3	100	1263253	10	696945	0,1	0,552
4	100	1778545	50	4804746	0,5	2,702
5	100	2303588	100	10417653	1	4,522
6	100	2062140	500	37539136	5	18,20
7	100	2273942	1000	77305342	10	33,99

* alle Flächenwerte beziehen sich jeweils auf das Derivat von BPA und BUT
Resultierende Regressionsparameter: b = 0,05387, m = 0,03389, r^2 = 0,99904

Die analytische Nachweisgrenze betrug im Mittel bei Bestimmungen von BPA im Plasma ca. 12 ng/ml bzw. 1,2 ng/100 µl Plasmaprobe. Sie variierte jedoch je nach verwendetem GC-MS-Gerät und Probenmaterial im Bereich 5 - 18 ng/ml. Bei BPA-reichen Geweben (insbesondere Leber, aber auch Niere und Fett) ließen sich teilweise Werte unter dem Mittelwert erreichen, währenddessen die Nachweisstärke bei Extrakten der anderen Gewebe aufgrund von matrixbedingten Untergrundstörungen im Chromatogramm generell nachließ.
Abbildung 13 zeigt exemplarisch ein Chromatogramm einer BPA-Bestimmung in Plasma mittels GC-MS.

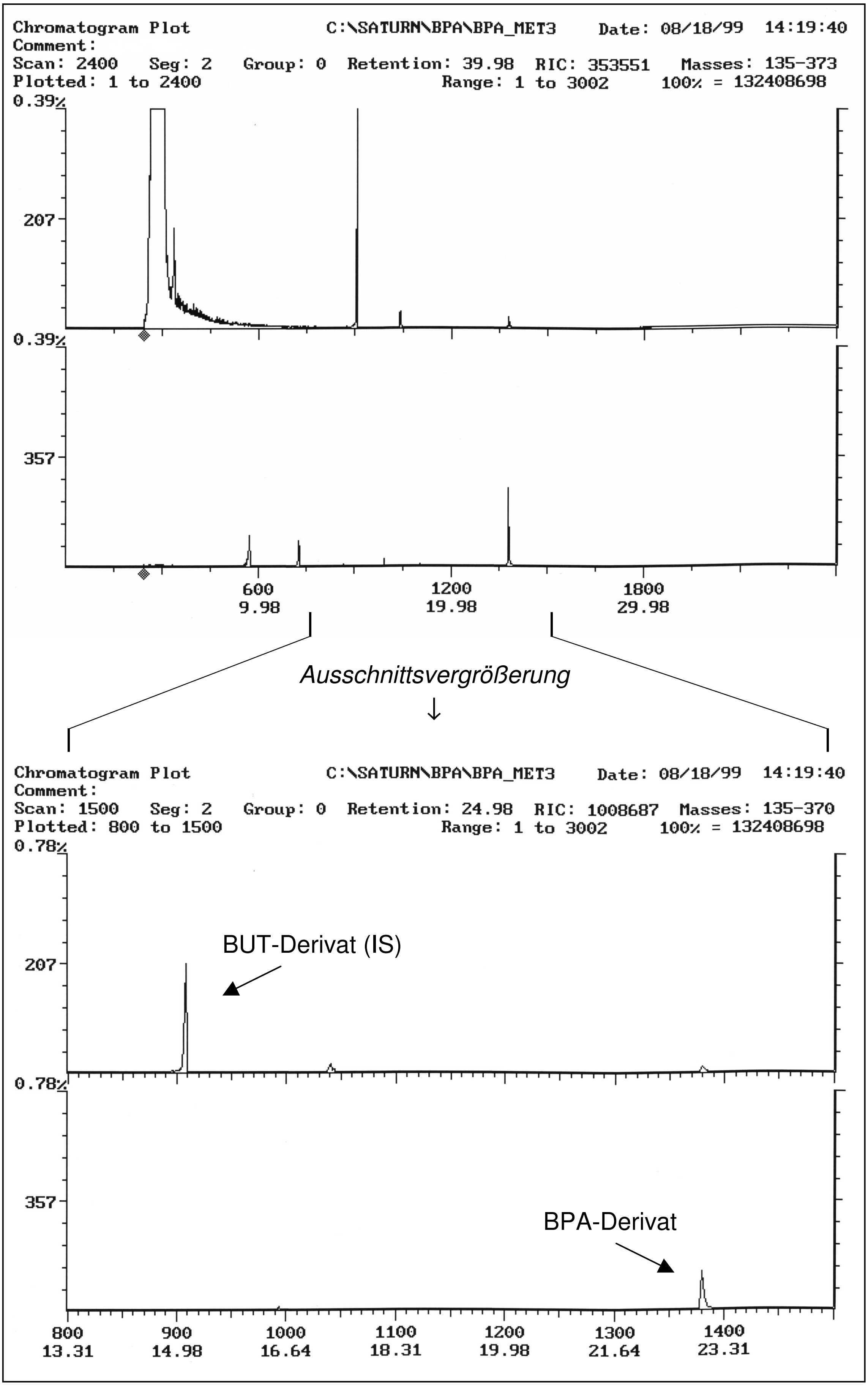
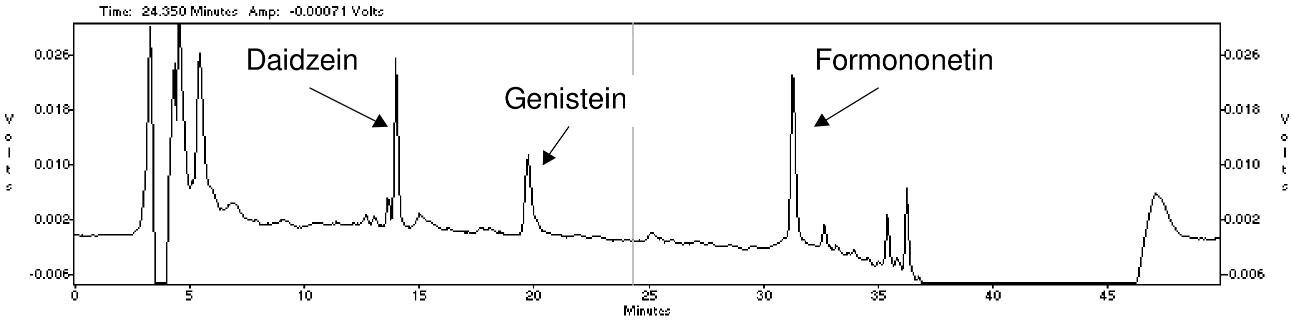


Abb. 13: Chromatogramm-Beispiel einer Bisphenol A-Bestimmung in Plasma

3.1.3 Qualität der Analysen von Daidzein

Es wurde sowohl die Reproduzierbarkeit der gesamten analytischen Methode (inklusive Probenaufarbeitung/Extraktion) als auch die Reproduzierbarkeit der Bestimmung mittels HPLC als Endpunkt kontrolliert und wie folgt bestimmt.
5-fache HPLC-UV-Detektion von Plasmaextrakten ergab für die Reproduzierbarkeit in der Serie eine Variation von 1,0 %. Für Gewebeproben lag diese bei 9,7 %.
Für die Reproduzierbarkeit der gesamten analytischen Methode inklusive der Extraktion ergaben sich nach 5-facher Bestimmung Variationen von ca. 5 - 10 %. Zur Qualitätssicherung wurde an jedem Tag, an dem Daidzein-Bestimmungen mittels HPLC durchgeführt wurden, ein Punkt der Kalibration wiederholt. Die Abweichung dieser tagesaktuellen Daidzein-Konzentration der jeweiligen Kalibrierlösung von der Zielkonzentration variierte von 1,5 % bis 15,4 % (Mittelwert bei 8 Proben 6,7 %).
Für die Mittelwerte der Wiederfindungsraten nach 3-fach-Bestimmung ergaben sich 98 % bei Plasma- und 88 % bei Gewebeproben.
Zur Kalibrierung wurden Plasmaproben von Kontrolltieren jeweils definierte Mengen an Daidzein zugesetzt. Das Quadrat des Korrelationskoeffizienten war für alle Kalibrierungen größer 0,99.
Die analytische Nachweisgrenze betrug im Mittel bei Bestimmungen von Daidzein im Plasma ca. 20 ng/ml bzw. 2,0 ng/100 µl Plasmaprobe. Sie variierte jedoch je nach verwendetem Probenmaterial im Bereich 15 - 25 ng/ml (besonders bei Gewebeproben). Abbildung 14 zeigt exemplarisch die Chromatogramme einer Daidzein-Bestimmung in Plasma mittels HPLC bei Detektion mit unterschiedlichen Wellenlängen.

250 nm



281 nm

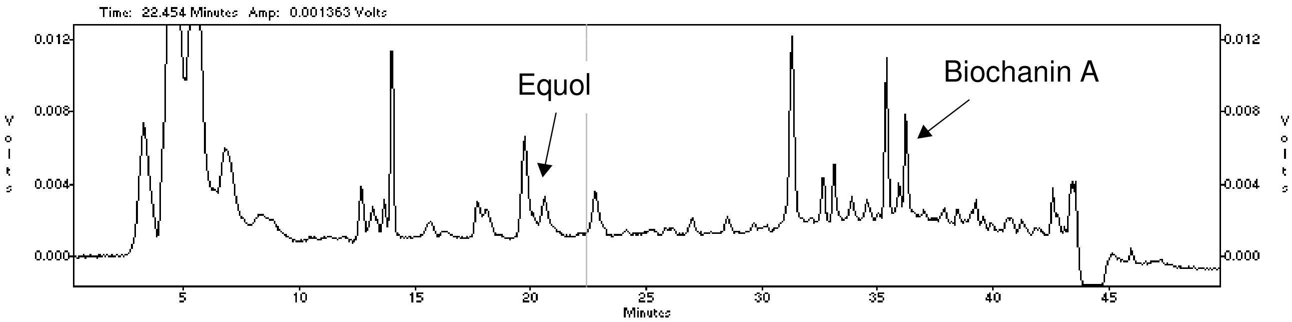


Abb. 14: Chromatogramm-Beispiel einer Daidzein-Bestimmung in Plasma mittels HPLC (nach Methode HPLC-I, s. Kap. 2.7.2)

3.2 Untersuchungen zur Toxikokinetik von *p-tert*-Octylphenol in weiblichen DA/Han-Ratten nach Einmalapplikation

Die Untersuchungen zur Toxikokinetik von *p-tert*-Octylphenol wurden an weiblichen DA/Han-Ratten durchgeführt. *p-tert*-Octylphenol wurde hierbei als Modellsubstanz für Alkylphenole bzw. Nonylphenol gewählt, da dieses im Gegensatz zum Nonylphenol als reines Isomer vorliegt (s. Kap. 1.4 und Kap. 1.5).
Die Substanz wurde den Tieren *per os* bzw. intravenös verabreicht. Aus der Konzentrations-Zeit-Kurve nach *i.v.*-Applikation wurde die terminale Halbwertzeit berechnet, aus dem Verhältnis der Flächen unter den Kurven nach *p.o.*- und *i.v.*-Applikation die orale Bioverfügbarkeit.

3.2.1 Konzentrations-Zeit-Verläufe im Blut nach Einmalapplikation von *p-tert*-Octylphenol

3.2.1.1 Konzentrations-Zeit-Verläufe im Blut nach *i.v.*-Applikation von *p-tert*-Octylphenol

Die Abbildungen 15a und 15b zeigen die Konzentrations-Zeit-Kurven von freiem *p-tert*-Octylphenol in Vollblut nach einmaliger Applikation von 5 mg *p-tert*-Octylphenol pro Kilogramm Körpergewicht. Direkt nach der Injektion liegen die Blutspiegel in der Größenordnung von 1600 ng/ml; sie fallen innerhalb der ersten Stunde schnell auf ca. 100 ng/ml ab. Nach 48 h Stunden liegen die Spiegel im Bereich der analytischen Nachweisgrenze. Die terminale Eliminationshalbwertzeit, die sich nach der Anpassung der Daten entsprechend dem Dreikompartimenten-Modell ergibt (s. Insert in Abb. 15a), beträgt ca. 36 h.
Bei der Darstellung der Einzeltierdaten in Abbildung 15a ist deutlich erkennbar, daß die *i.v.*-Injektionen in die Schwanzvene der Ratten nicht immer erfolgreich waren. Sowohl OP-Spiegel-Maxima *nach* dem ersten Probenahmezeitpunkt als auch zu niedrige OP-Spiegel bei einigen Tieren deuten auf paravenöse Injektionen. Die Ursache liegt darin, daß die exakte Lage der Schwanzvene aufgrund der starken Pigmentierung der verwendeten DA/Han-Ratten nur schwer bzw. kaum erkennbar ist. In den nachfolgenden Auswertungen wurden nur Daten verwendet, die aus erfolgreichen Injektionen resultieren (s. auch Kap. 2.5).

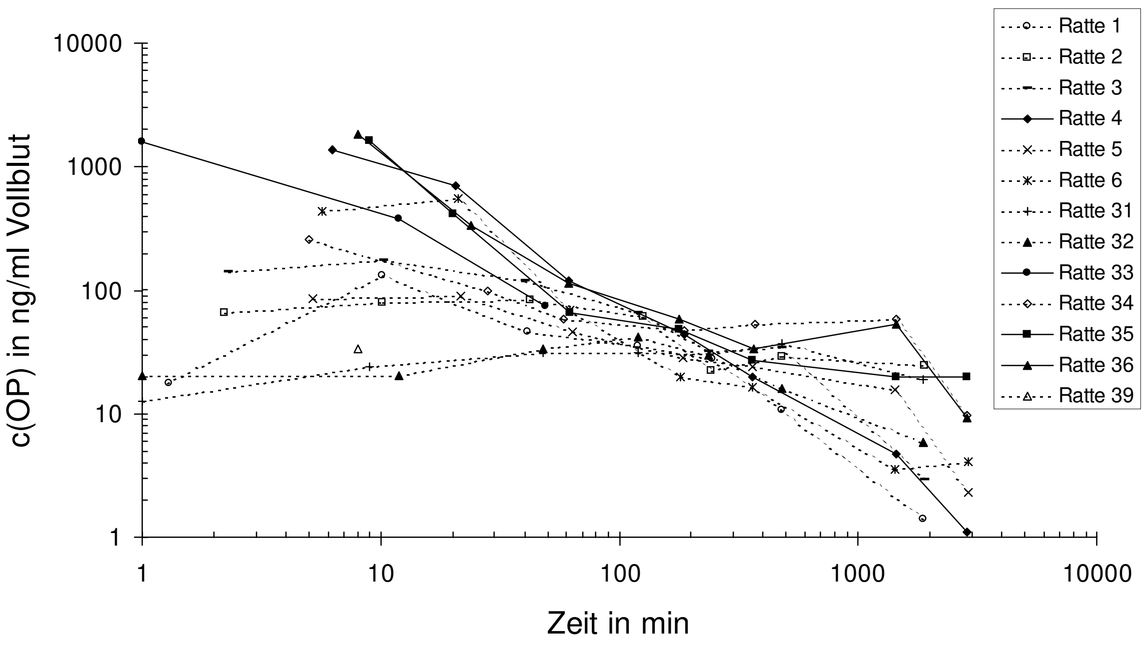


Abb. 15a:
Gesamtdatensatz der OP-Blutspiegel in Abhängigkeit von der Zeit nach *i.v.*-Injektion von 5 mg OP/kg KG in weiblichen DA/Han-Ratten. Die OP-Konzentrations-Zeitverläufe zeigen deutlich erfolgreiche intravenöse Injektionen von OP in die Schwanzvene bei 4 Tieren (—) und paravenöse Injektionen bei den anderen Tieren (···); weitere Erläuterungen im Text

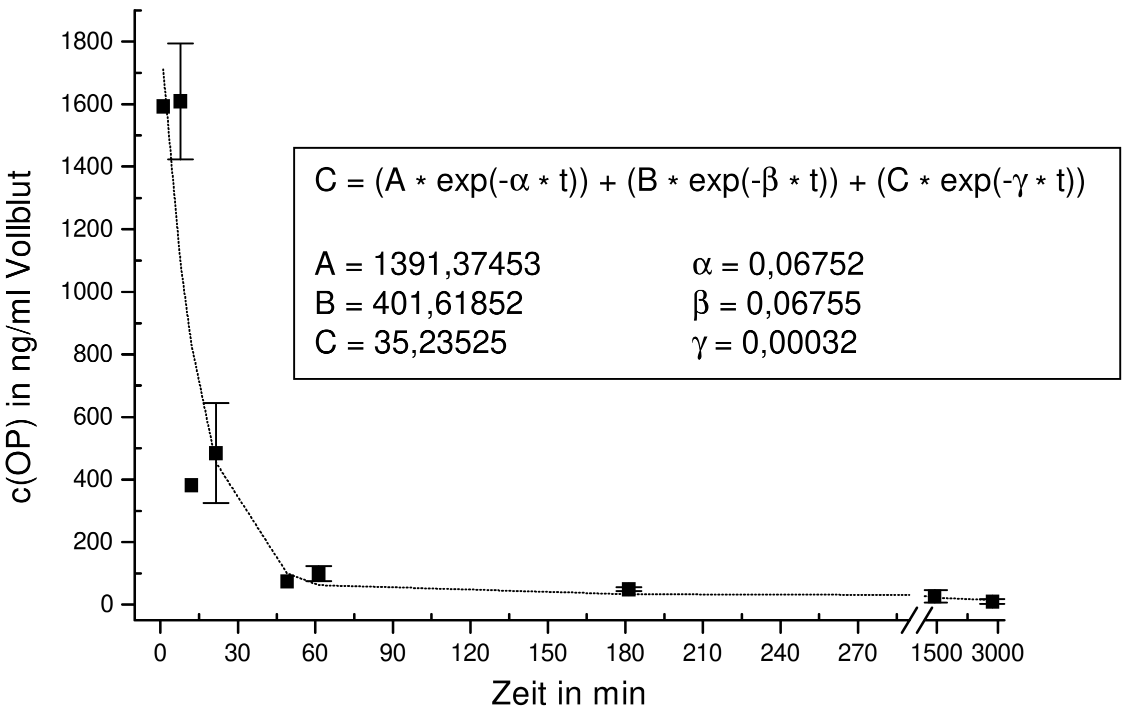


Abb. 15b: OP-Blutspiegel in Abhängigkeit von der Zeit nach *i.v.*-Inj. von 5 mg OP/kg KG in weiblichen DA/Han-Ratten; berechnete Ausgleichskurve nach Dreikompartimenten-Model. Datensatz ausgewählter Tiere (n = 4) aus Abbildung 15a

3.2.1.2 Konzentrations-Zeit-Verläufe im Blut nach *p.o.*-Applikationen von *p-tert*-Octylphenol

Die mittleren Blutspiegel nach Applikation von 50 mg *p-tert*-Octylphenol *p.o.* sind in Abb. 16a dargestellt. Da *p-tert*-Octylphenol schon 10 min nach Gabe nachgewiesen werden konnte, spricht dies (zumindest für Teile der Dosis) für eine rasche Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt. Allerdings treten mehrere Konzentrationsgipfel und große Streuungen auf. Diese Streuungen sind auf interindividuelle Unterschiede zwischen den Tieren zurückzuführen und auf zeitliche Verschiebungen in den Verläufen (Gipfeln) der einzelnen Tiere (s. Abb. 16b). Die Fluktuationen dürften v. a. auf eine enterohepatische Rezirkulation des *p-tert*-Octylphenols zurückzuführen sein. Ähnliche Konzentrations-Zeit-Verläufe mit mehreren Gipfeln und großen interindividuellen Streuungen wurden in der Folge auch für Bisphenol A (s. Kap. 3.3.1.2) und Daidzein (s. Kap. 3.4.1.2) beobachtet.

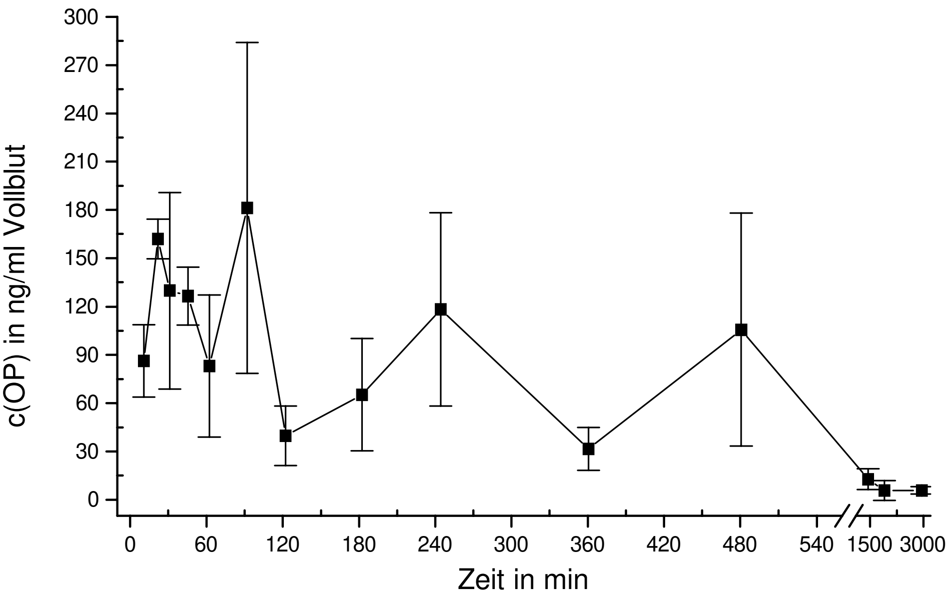


Abb. 16a:
Zeitverlauf der OP-Blutspiegel in weiblichen DA/Han-Ratten nach oraler Applikation von 50 mg OP/kg KG (Gruppenmittelwerte ± Standardabweichungen; n = 6)

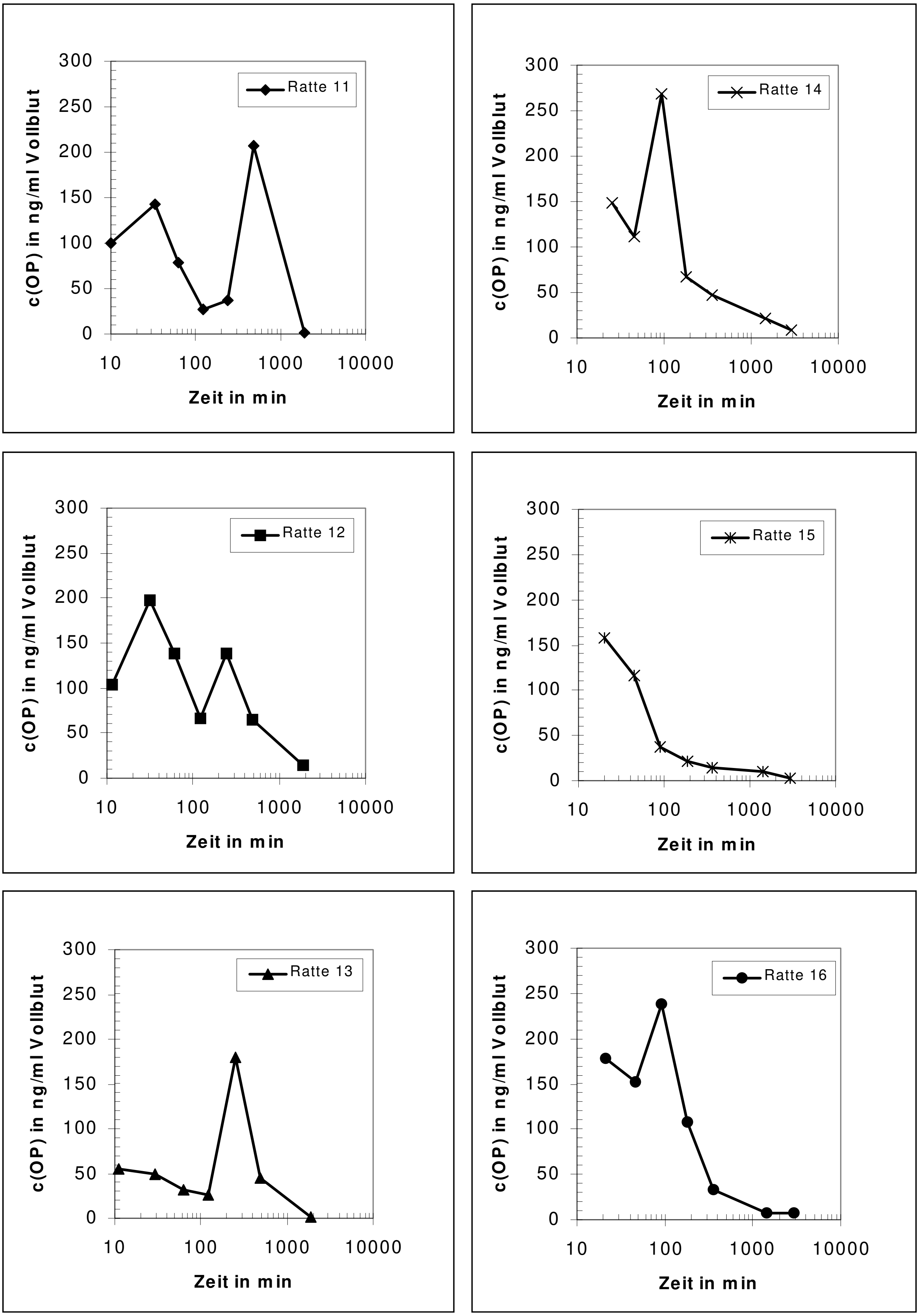


Abb. 16b:
Zeitverlauf der OP-Blutspiegel in Einzeltieren nach oraler Applikation von 50 mg OP/kg KG (jeweils identische Probennahmezeitpunkte bei übereinander angeordneten Tieren)

Entsprechend zeigen die Abbildungen 17a und 17b die Mittelwerte bzw. die Verläufe für die Einzeltiere nach einmaliger *p.o.*-Gabe von 200 mg/kg KG *p-tert*-Octylphenol. Auch hier sind v. a. in den Kurven der Einzeltiere mehrere späte Gipfel erkennbar, die zum einen auf enterohepatische Rezirkulation der Substanz und zum anderen auf Nachresorption zurückgeführt werden.

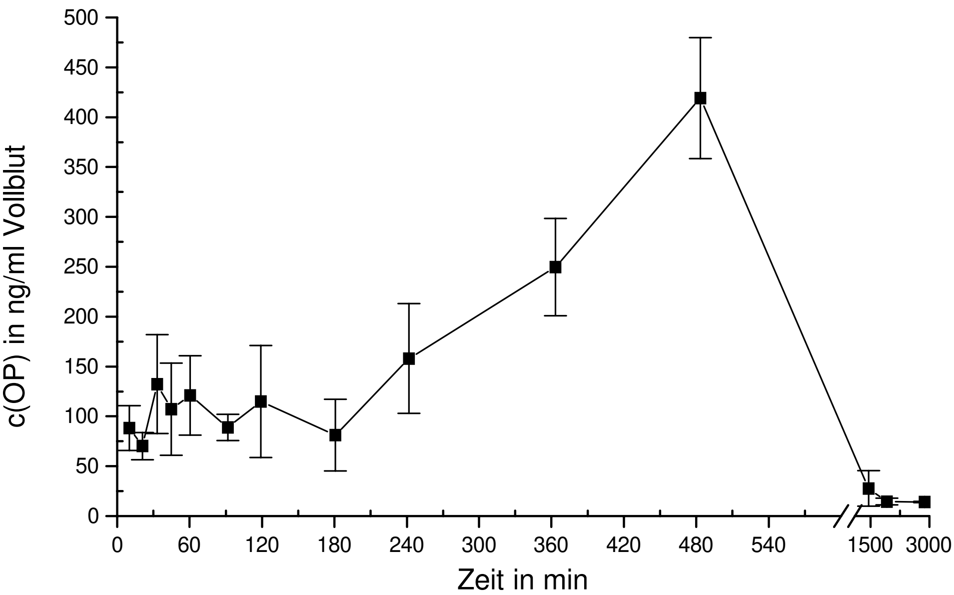


Abb. 17a:
Zeitverlauf der OP-Blutspiegel in weiblichen DA/Han-Ratten nach oraler Applikation von 200 mg OP/kg KG (Gruppenmittelwerte ± Standardabweichungen; n = 6)

Basierend auf der Berechnung der Flächen unter den Kurven ergeben sich für *p-tert*-Octylphenol folgende orale Bioverfügbarkeiten: nach Gabe von 50 mg/kg KG 12,3 % und nach Gabe von 200 mg/kg KG 8,4 % der Dosis.

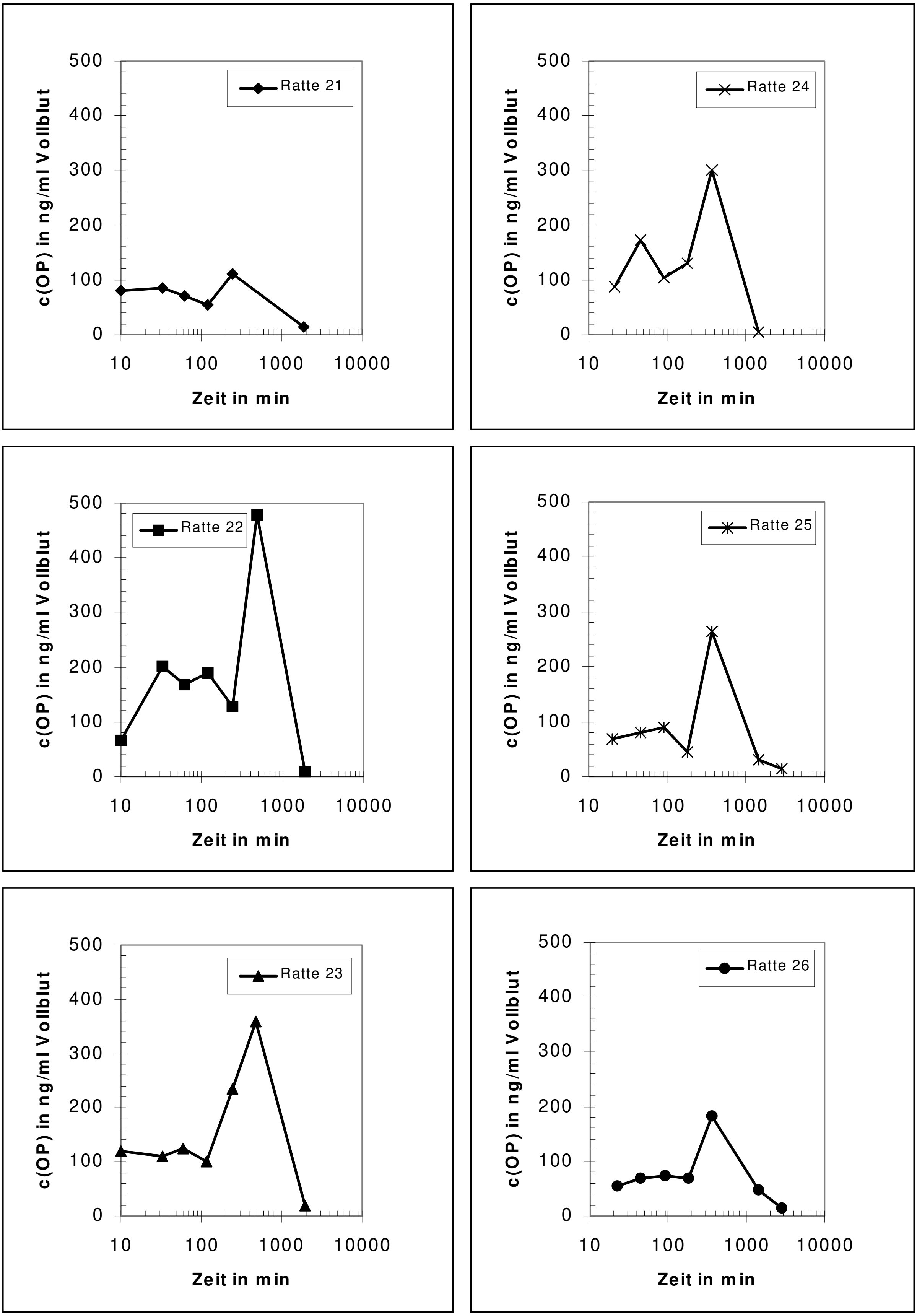


Abb. 17b:

Zeitverlauf der OP-Blutspiegel in Einzeltieren nach oraler Applikation von 200 mg OP/kg KG (jeweils identische Probennahmezeitpunkte bei übereinander angeordneten Tieren)

3.2.2 *p-tert*-Octylphenol-Gehalte in Gewebeproben nach Einmalapplikation

Zum Zeitpunkt der Tötung (32 h bzw. 48 h nach Applikation; s. Tab. 8) wurde den Tieren Leber, Niere, Uterus, Gehirn, Lunge, Muskel, Fett, Magen und Darm entnommen. Pro Dosisgruppe und Gewebe wurden je 2 - 4 Proben auf ihren *p-tert*-Octylphenol-Gehalt hin analysiert. Dabei wurden sowohl „freie Gehalte“ als auch „Gesamtgehalte“ bestimmt. Unter den freien Gehalten ist der Anteil an nicht-metabolisierter Ausgangsverbindung zu verstehen. Die Gesamtgehalte umfassen die Summe aus freien Gehalten und den Phase-II-Metaboliten bzw. Konjugaten (s. Kap. 1.3). Die Abbildungen 18a - 18h zeigen die Einzelwerte der freien Gehalte und Gesamtgehalte in den jeweiligen Geweben, Abbildung 19 zeigt die Mittelwerte der Gesamtgehalte in der Übersicht. Beim Vergleich der Gewebespiegel in den jeweiligen Einzeldarstellungen ist die z. T. sehr unterschiedliche Skalierung der y-Achse zu beachten.

Die freien Gehalte sind sowohl nach *i.v.*- als auch nach *p.o.*-Applikation in allen Geweben außer im Fett deutlich niedriger als die Gesamtgehalte (in erster Näherung um den Faktor 10). Im Fett liegt *p-tert*-Octylphenol praktisch ausschließlich in freier Form vor (s. Abb. 18g). Da die Konjugate hydrophiler als die Ausgangssubstanz sind, ist dieser Befund nicht überraschend, denn die lipophilere Verbindung wird im Fett angereichert.

Insgesamt reichert sich *p-tert*-Octylphenol in der Leber am stärksten an, aber auch in Niere und Fett können zum Zeitpunkt der Tötung noch erhebliche Mengen nachgewiesen werden, wenn eine hohe Dosis verabreicht wurde (s. Abb. 19).

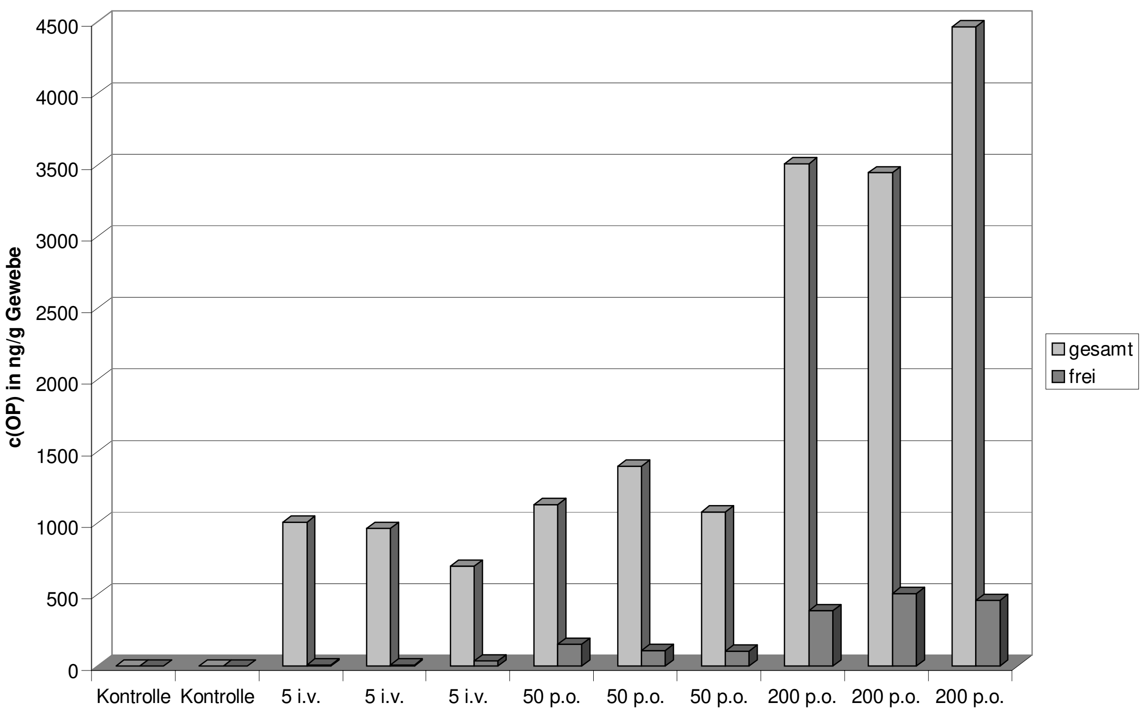


Abb. 18a: *p-tert*-Octylphenol in **Leber**gewebe (32 h bzw. 48 h nach Applikation; Werte für Einzeltiere aus den verschiedenen Dosisgruppen)

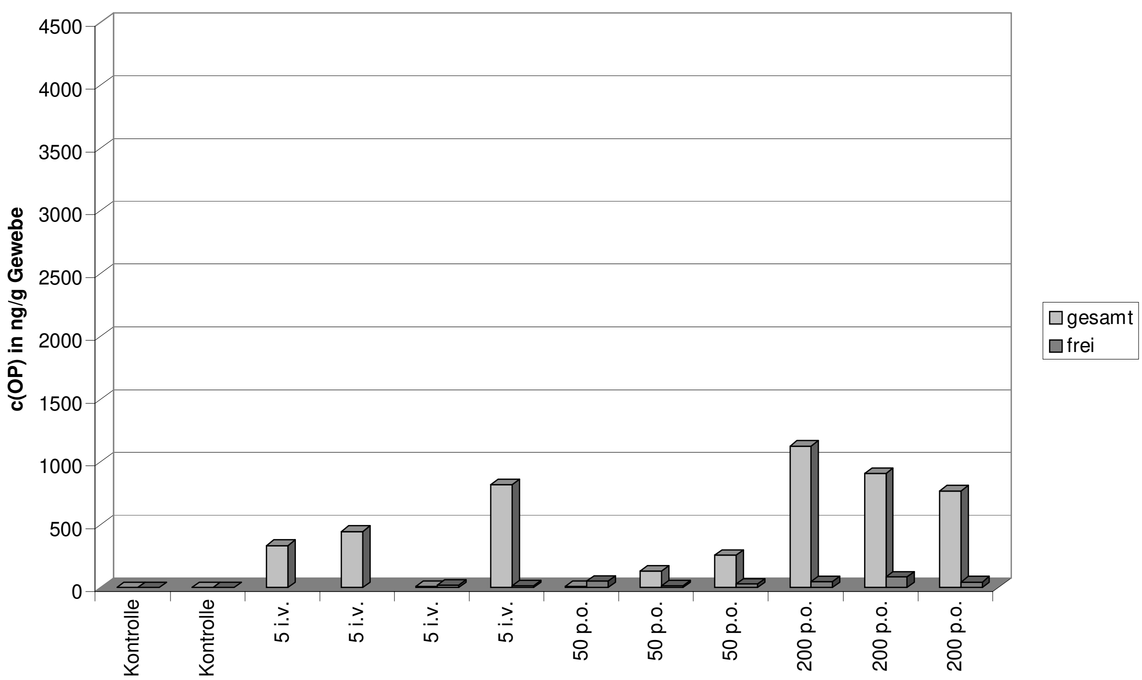


Abb. 18b: *p-tert*-Octylphenol in **Nieren**gewebe (32 h bzw. 48 h nach Applikation; Werte für Einzeltiere aus den verschiedenen Dosisgruppen)

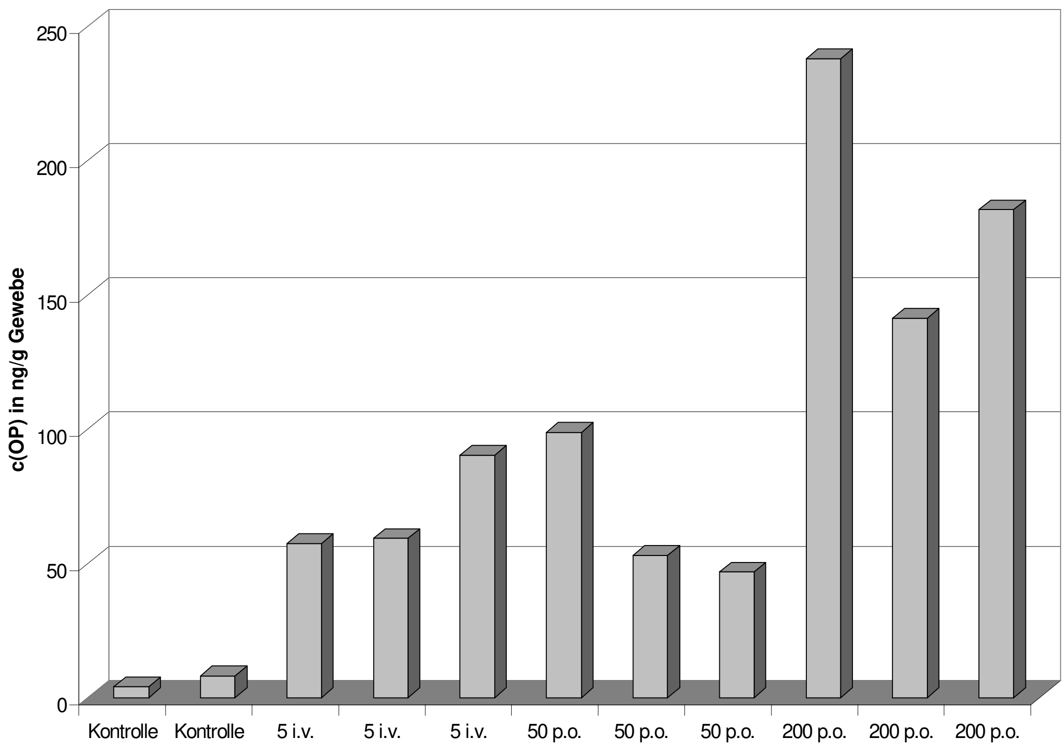


Abb. 18c: *p-tert*-Octylphenol in **Uterus**gewebe (32 h bzw. 48 h nach Applikation; nur Gesamtgehalte, da zu wenig Probenmaterial; Einzeltiere)

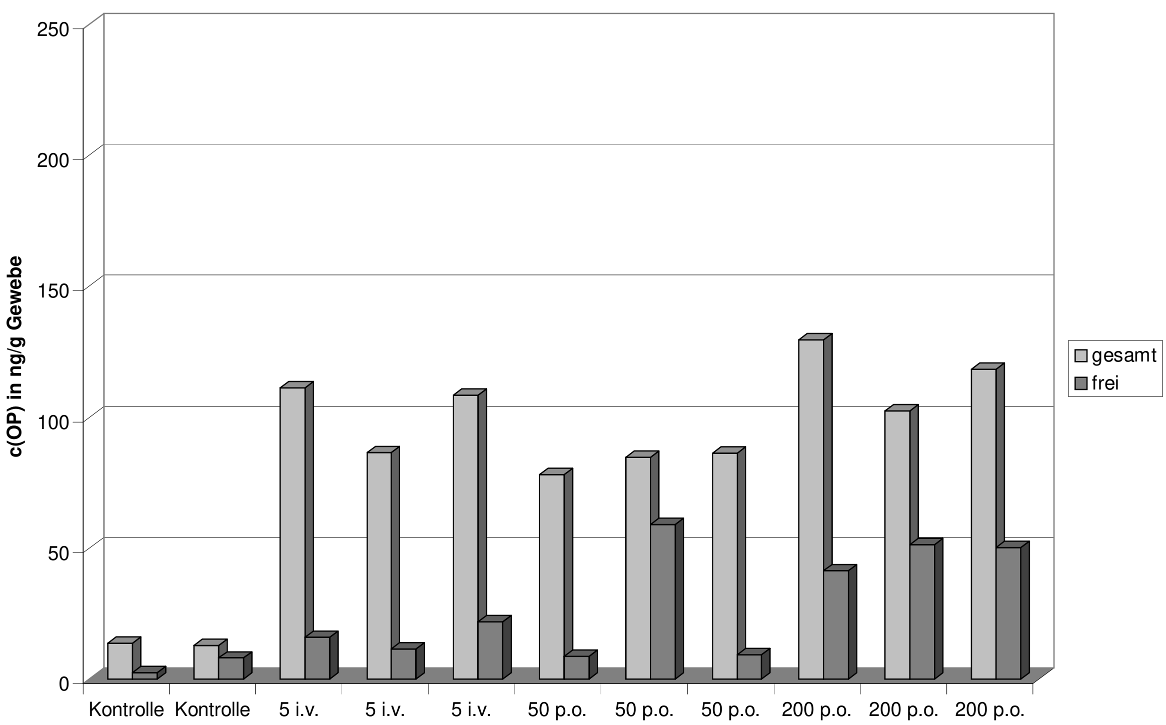


Abb. 18d: *p-tert*-Octylphenol in **Gehirn** (32 h bzw. 48 h nach Applikation; Werte für Einzeltiere aus den verschiedenen Dosisgruppen)

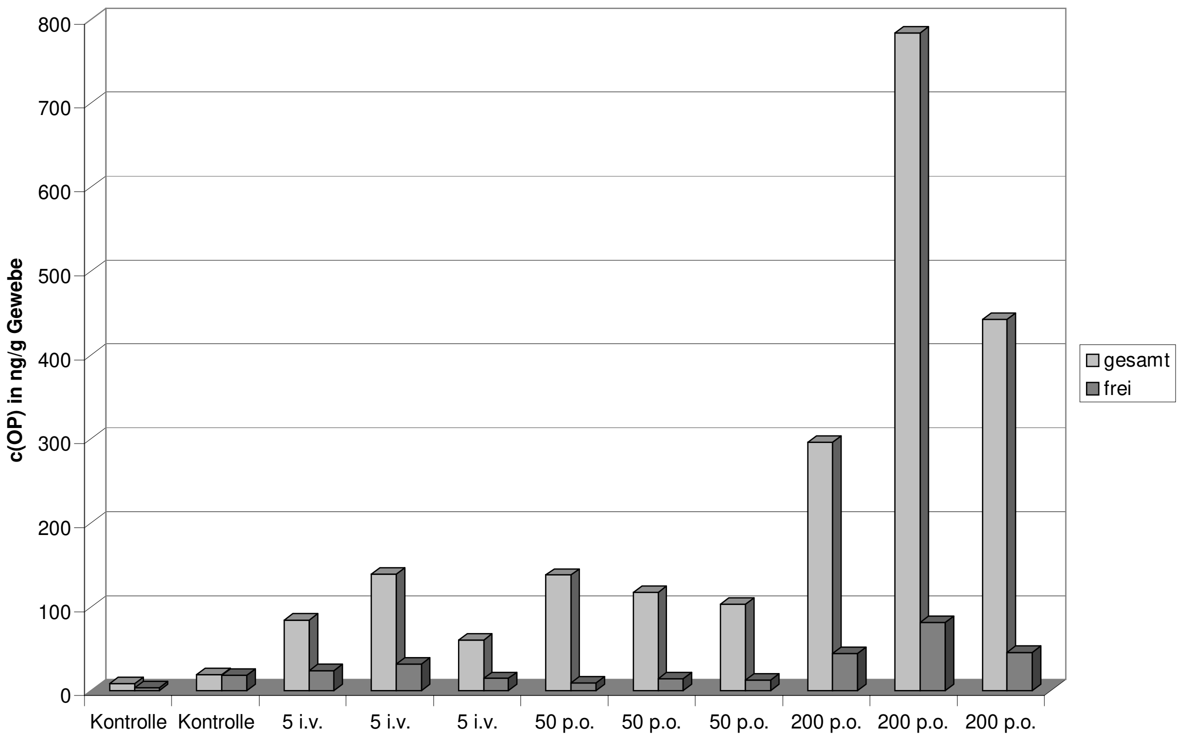


Abb. 18e: *p-tert*-Octylphenol in **Lungen**gewebe (32 h bzw. 48 h nach Applikation; Werte für Einzeltiere aus den verschiedenen Dosisgruppen)

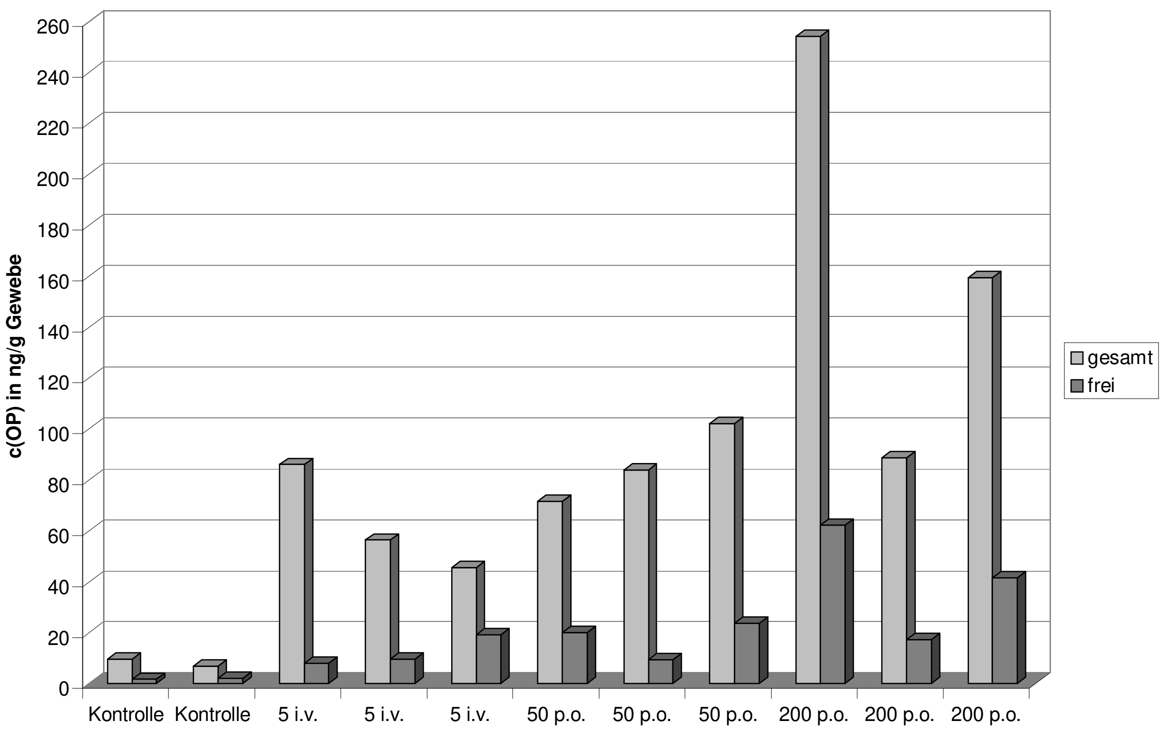


Abb. 18f: *p-tert*-Octylphenol in **Muskel**gewebe (32 h bzw. 48 h nach Applikation; Werte für Einzeltiere aus den verschiedenen Dosisgruppen)

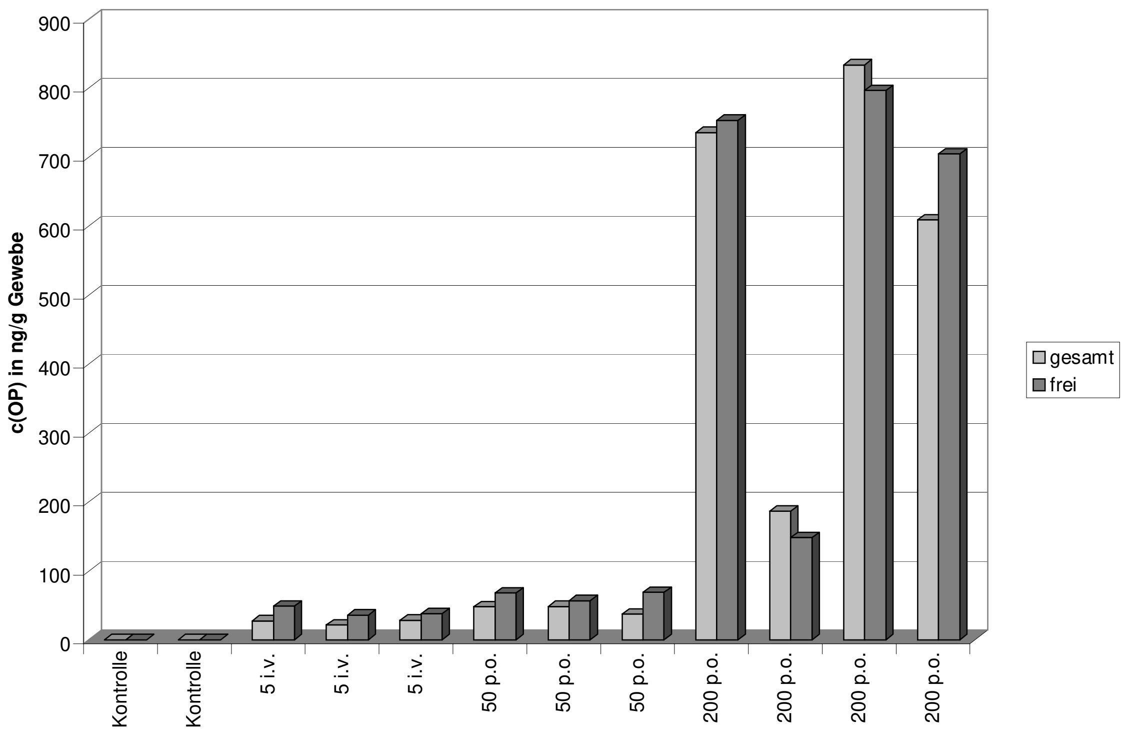


Abb. 18g: *p-tert*-Octylphenol in **Fett**gewebe (32 h bzw. 48 h nach Applikation; Werte für Einzeltiere aus den verschiedenen Dosisgruppen)

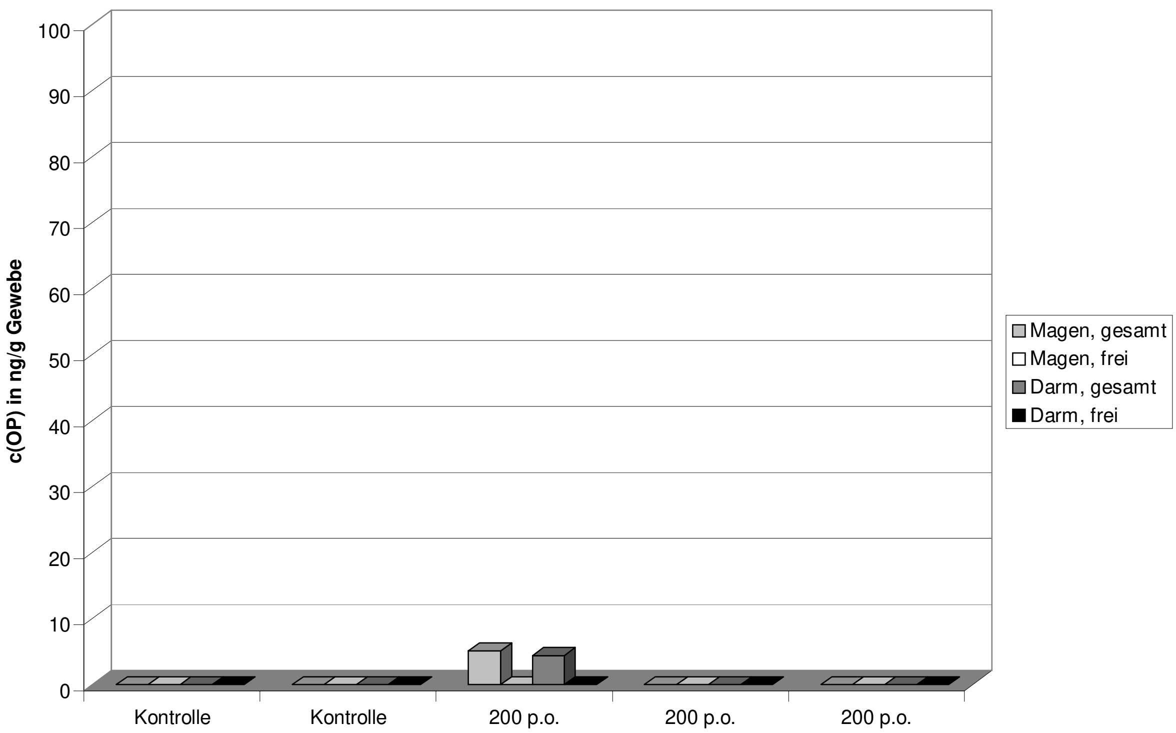


Abb. 18h: OP in **Magen**- u. **Darm**gewebe (ohne Nahrungsinhalte; 32 h bzw. 48 h nach Applikation; Werte für Einzeltiere aus den vers. Dosisgruppen)

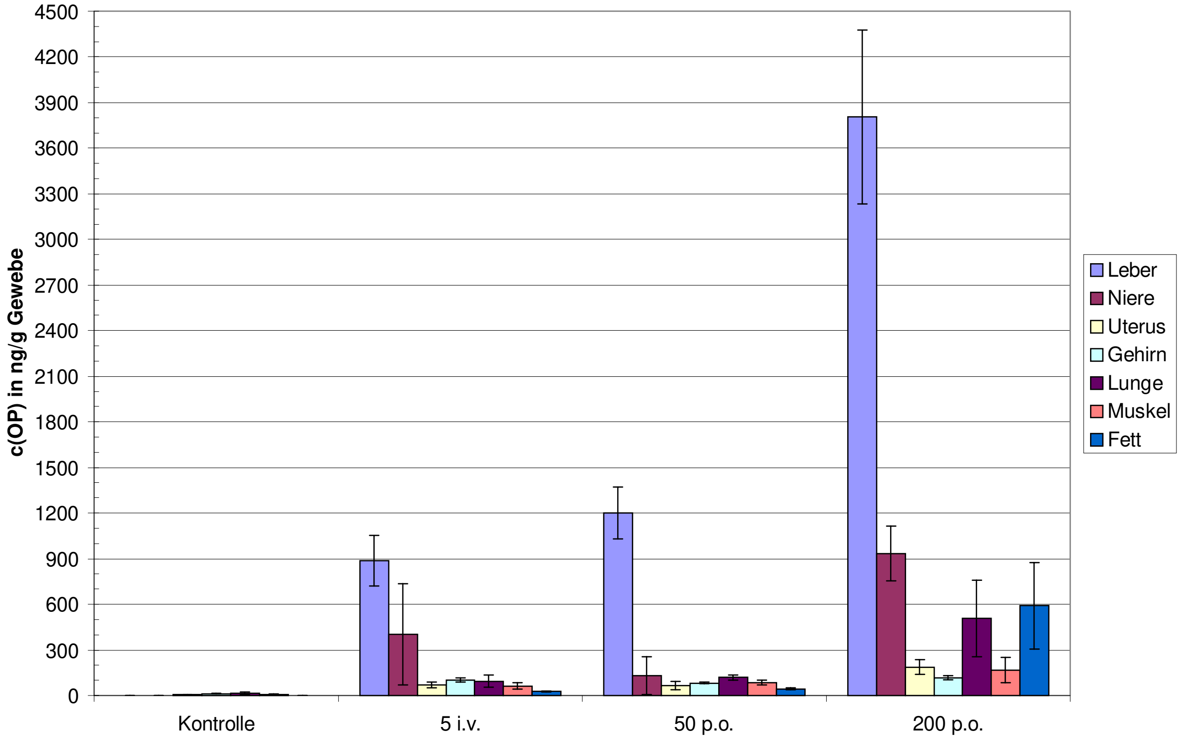


Abb. 19: Gesamtgehalte von OP in Geweben 32 h bzw. 48 h nach Applikation (Mittelwerte für n = 3 - 4 Einzelproben von Tieren aus vers. Dosisgruppen)

3.2.3 *p-tert*-Octylphenol-Gehalte in der Galle nach *i.p.*-Applikation

In einem separaten Experiment wurde die *p-tert*-Octylphenol-Ausscheidung mit der Galle untersucht: Die Tiere erhielten OP in einer Dosierung von 5 mg/kg KG *i.p.* verabreicht. Das Octylphenol wurde effizient mit der Galle ausgeschieden (s. Abb. 20a und 20b). Anders als bei Daidzein (s. Abb. 31) lag aber ein großer Teil des *p-tert*-Octylphenols in freier Form in der Galle vor. Die maximale Konzentration wird etwa nach 30 - 45 min erreicht und 8 h nach Gabe finden sich immer noch deutlich nachweisbare Spiegel. Im Zeitraum bis 8 h nach Substanzgabe wurden ca. 8 % des verabreichten *p-tert*-Octylphenols biliär ausgeschieden.

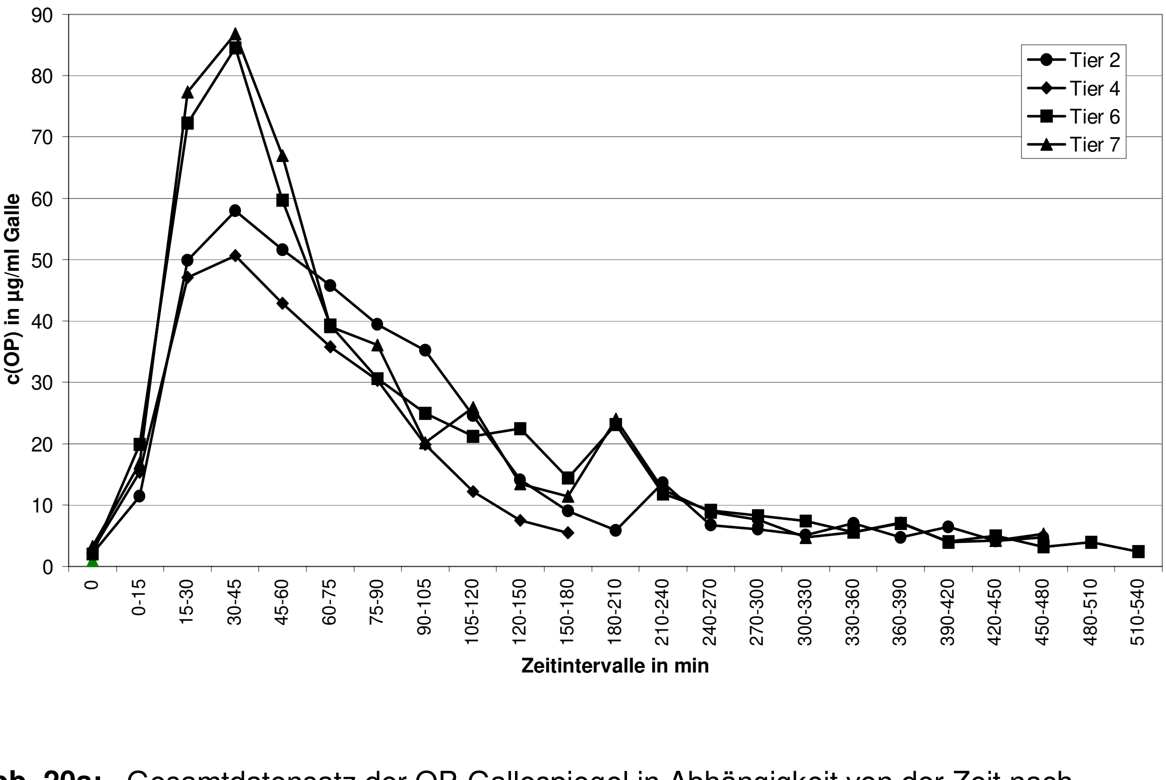


Abb. 20a: Gesamtdatensatz der OP-Gallespiegel in Abhängigkeit von der Zeit nach *i.p.*-Applikation von 5 mg OP/kg KG in weiblichen DA/Han-Ratten

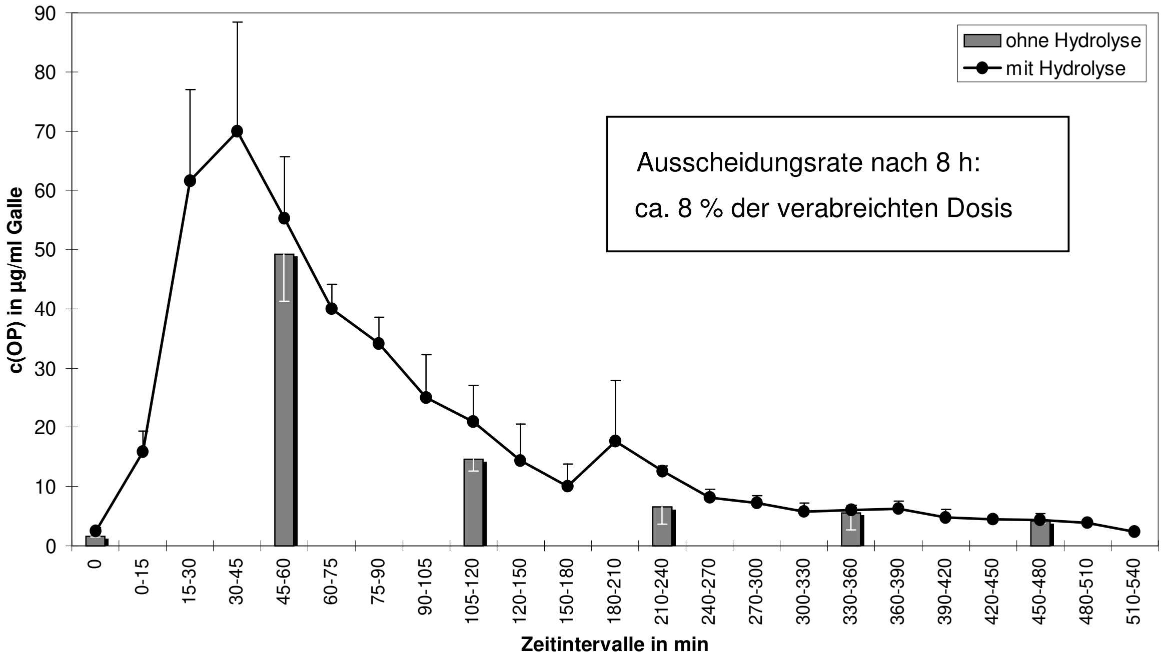


Abb. 20b: Zeitverlauf der OP-Gallespiegel in weiblichen DA/Han-Ratten nach *i.p.*-Applikation von 5 mg OP/kg KG;
Vergleich der freien Gehalte (ohne Hydrolyse) und Gesamtgehalte (mit Hydr.)
(Gruppenmittelwerte ± Standardabweichungen; n = 4)

3.3 Untersuchungen zur Toxikokinetik von Bisphenol A in weiblichen DA/Han-Ratten nach Einmalapplikation

Die Untersuchungen zur Toxikokinetik von Bisphenol A wurden an weiblichen DA/Han-Ratten durchgeführt. Die Substanz wurde den Tieren *per os* bzw. intravenös verabreicht. Aus der Konzentrations-Zeit-Kurve nach *i.v.*-Applikation wurde die terminale Halbwertzeit berechnet, aus dem Verhältnis der Flächen unter den Kurven nach *p.o.*- und *i.v.*-Applikation die orale Bioverfügbarkeit. Zur Problematik bei den *i.v.*-Injektionen s. Kap. 2.5 und Kap. 3.2.1.1.

3.3.1 Konzentrations-Zeit-Verläufe im Plasma nach Einmalapplikation von Bisphenol A

3.3.1.1 Konzentrations-Zeit-Verläufe im Plasma nach *i.v.*-Applikation von Bisphenol A

Entsprechend der Studien zur Kinetik von freiem *p-tert*-Octylphenol nach Einmalapplikation wurde auch die Kinetik von Bisphenol A untersucht. Abbildung 21 zeigt die Konzentrations-Zeit-Kurve von Bisphenol A nach einmaliger *i.v.*-Applikation von 10 mg/kg Körpergewicht. Direkt nach der Injektion wurden Konzentrationen im Bereich von 15 µg/ml Plasma erreicht. Innerhalb von 30 min fielen die Plasmaspiegel schnell ab. Nach einer Stunde lagen die Konzentrationen im Bereich von 700 ng/ml, nach zwei Stunden bei 100 ng/ml und nach 24 h waren die Spiegel in den Bereich der analytischen Nachweisgrenze gefallen. Das Insert in Abbildung 21 zeigt die mathematische Anpassung der Daten nach dem Dreikompartimenten-Modell; aus dem γ-Term ergibt sich eine terminale Eliminationshalbwertzeit von ca. 39 h.

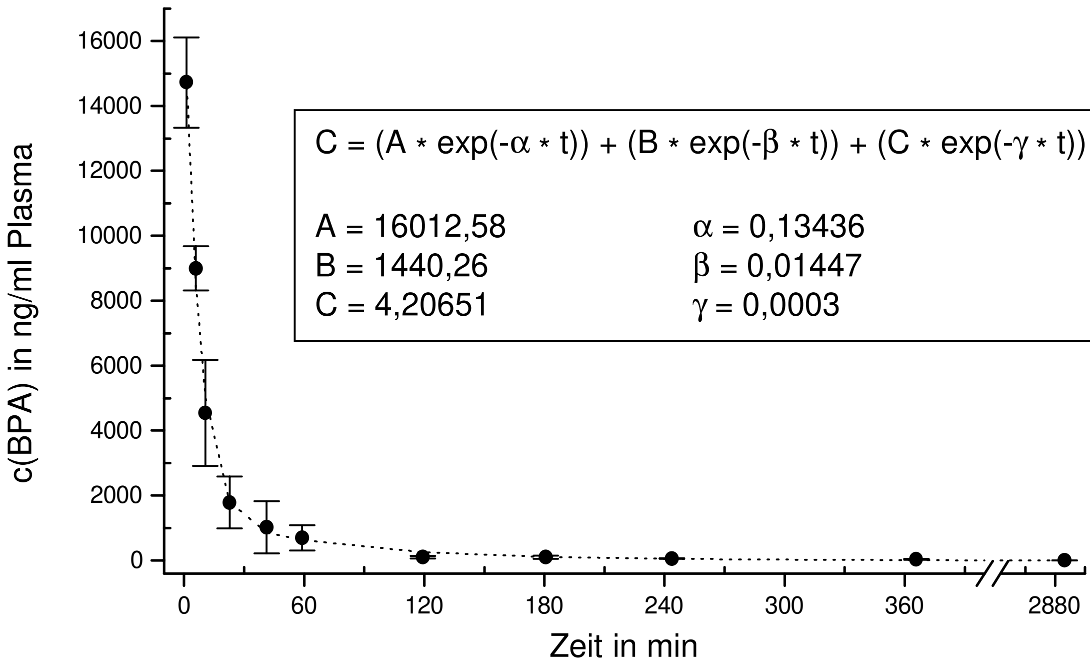


Abb. 21:

BPA-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Zeit nach *i.v.*-Injektion von 10 mg BPA/kg KG in weiblichen DA/Han-Ratten; berechnete Ausgleichskurve nach Dreikompartimenten-Model (n = 3 - 6)

3.3.1.2 Konzentrations-Zeit-Verläufe im Plasma nach *p.o.*-Applikationen von Bisphenol A

In Abbildung 22a sind die mittleren Plasmaspiegel (± Standardabweichung) nach einmaliger, oraler Gabe von 10 mg/kg KG Bisphenol A dargestellt. Die Absorption ist initial sehr variabel, ein erstes Maximum wird nach 1,5 h, ein weiteres nach ca. 6 h erreicht. Die Streuungen in den Mittelwerten sind durch die großen interindividuellen Unterschiede im Konzentrations-Zeit-Verlauf der einzelnen Tiere zu erklären (s. Abb. 22b). Die Fluktuation des Plasmaspiegels (z. B. der erneute Anstieg nach ca. 6 h) ist v. a. auf die enterohepatische Rezirkulation von Bisphenol A zurückzuführen (Löffler und Bolt 1980).

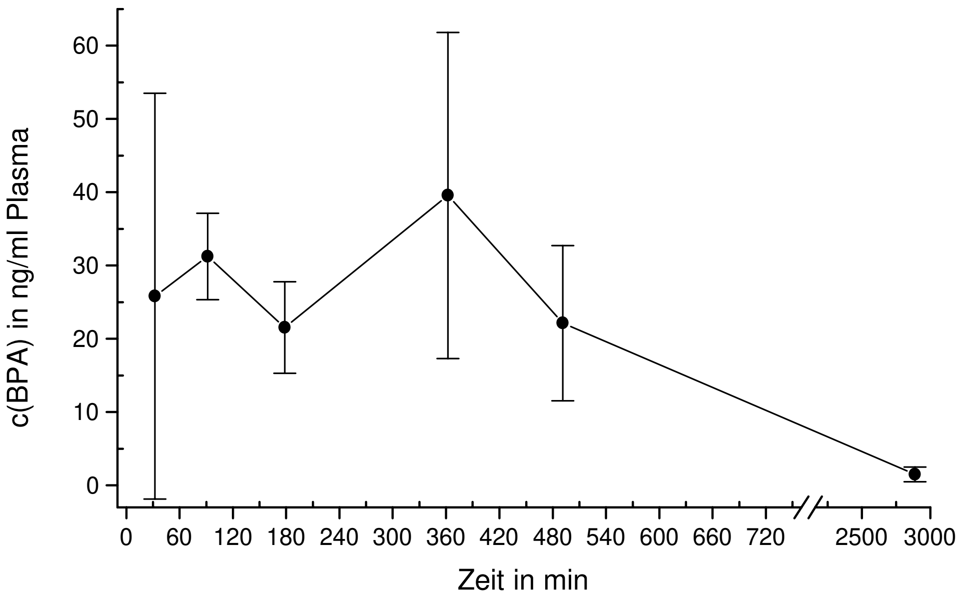


Abb. 22a:
Zeitverlauf der BPA-Plasmaspiegel in weiblichen DA/Han-Ratten nach oraler Applikation von 10 mg BPA/kg KG (Gruppenmittelwerte ± Standardabweichungen; n = 3)

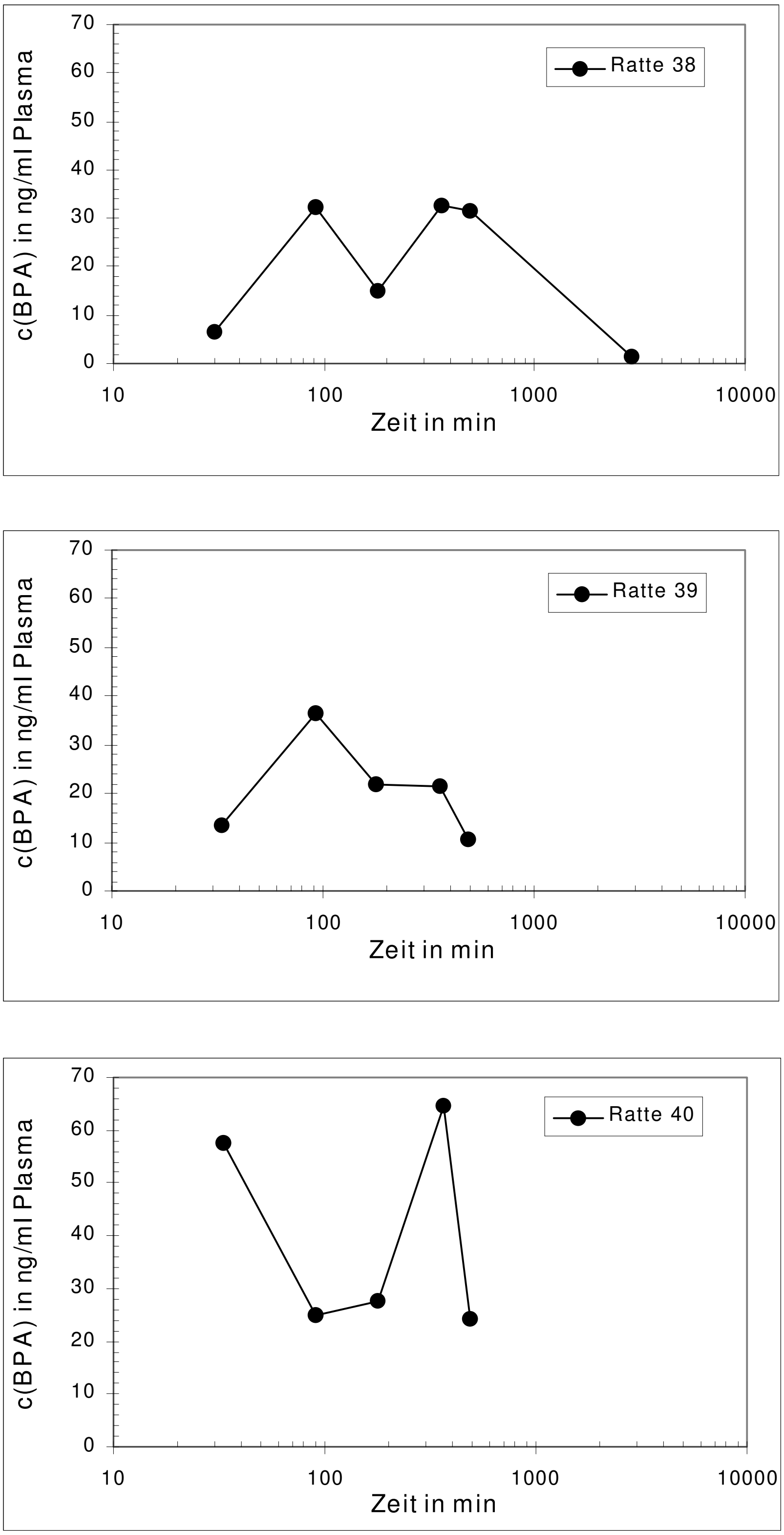


Abb. 22b:
Zeitverlauf der BPA-Plasmaspiegel in Einzeltieren nach oraler Appl. von 10 mg BPA/kg KG (jeweils identische Probennahmezeitpunkte)

Entsprechend zeigen die Abbildungen 23a und 23b die Konzentrations-Zeit-Verläufe (Mittelwerte bzw. Verläufe bei einzelnen Tieren) nach *p.o.*-Gabe von 100 mg/kg Körpergewicht. Wieder geben die Kurven für die Einzeltiere Hinweise auf eine ausgeprägte enterohepatische Rezirkulation bzw. auf eine Nachresorption der Substanz. Die mittleren Plasmaspiegel liegen nach *p.o.*-Gabe von 100 mg/kg KG (Abb. 23a und Abb. 23b) nicht viel höher als nach Gabe der 10fach niedrigeren Dosis (Abb. 22a und Abb. 22b). Dies spricht für eine geringe orale Bioverfügbarkeit der freien Substanz in den Tieren.

Basierend auf den Flächen unter den Kurven beträgt die orale Bioverfügbarkeit von Bisphenol A 16,4 % nach Gabe von 10 mg/kg KG und 5,6 % nach Gabe von 100 mg/kg KG.

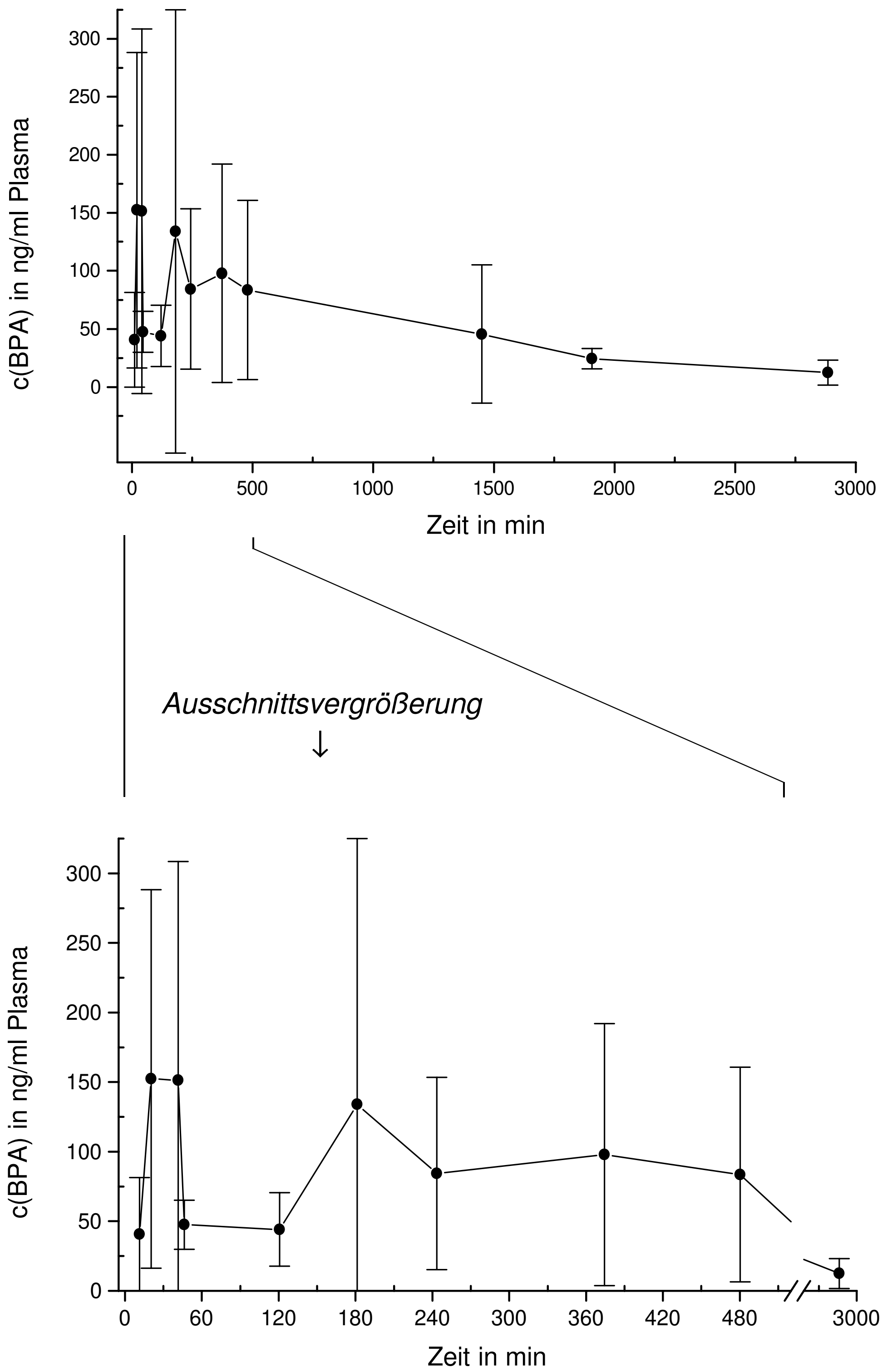


Abb. 23a:

Zeitverlauf der BPA-Plasmaspiegel in weiblichen DA/Han-Ratten nach oraler Applikation von 100 mg BPA/kg KG (Gruppenmittelwerte ± Standardabweichungen; n = 3 - 6)

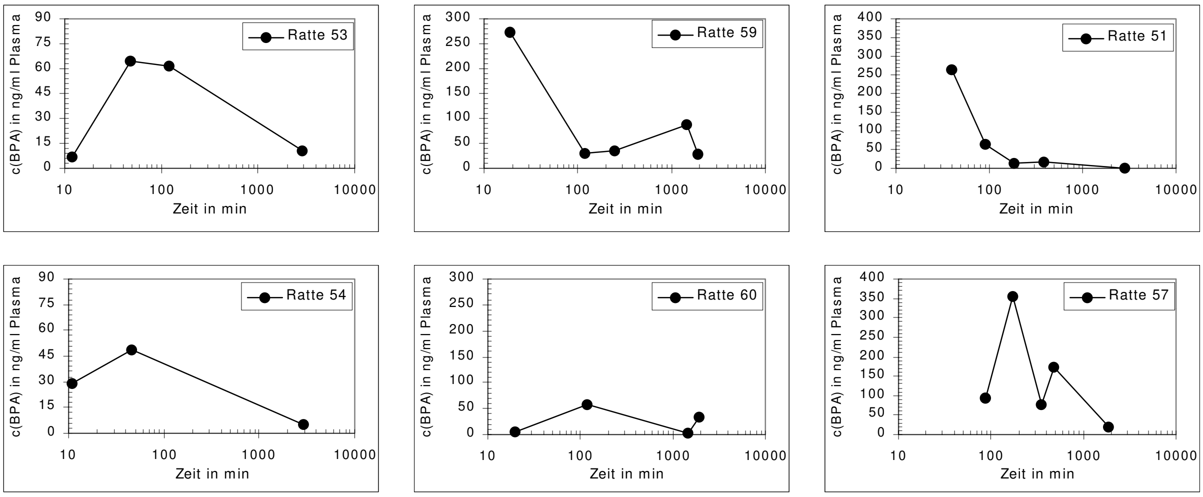


Abb. 23b:
Zeitverlauf der BPA-Plasmaspiegel in Einzeltieren nach oraler Appl. von 100 mg BPA/kg KG (jeweils identische Probennahmezeitpunkte bei übereinander angeordneten Tieren)

3.3.2 Bisphenol A-Gehalte in Gewebeproben nach Einmalapplikation

Zum Zeitpunkt der Tötung (32 h bzw. 48 h nach Applikation; s. Tab. 9) wurde den Tieren Leber, Niere, Uterus, Gehirn, Lunge, Muskel und Fett entnommen. Pro Dosisgruppe und Gewebe wurden Proben von je 3 - 4 Tieren auf ihren Bisphenol A-Gehalt hin analysiert (s. Abb. 24a - 24g). Dabei wurden sowohl freie als auch Gesamtgehalte bestimmt. Abbildung 25 zeigt die Mittelwerte der Gesamtgehalte in der Übersicht. Beim Vergleich der Gewebespiegel in den jeweiligen Einzeldarstellungen ist die z. T. sehr unterschiedliche Skalierung der y-Achse zu beachten.
Deutlich erhöhte Gehalte finden sich bei der höchsten Dosisgruppe (100 mg/kg KG *p.o.*) und dort vor allem im Lebergewebe (s. Abb. 24a). Die starken Streuungen sind wiederum auf große interindividuelle Unterschiede zurückzuführen. Die Konzentration an freiem Bisphenol A liegt für den überwiegenden Teil der Proben unterhalb der analytischen Nachweisgrenze (s. Abb. 25). Nur im Lebergewebe von Tieren der höchsten Dosisgruppe und im Fettgewebe kann freies Bisphenol A nachgewiesen werden (s. Abb. 24a u. 24g). Im Lebergewebe beträgt die Konzentration von freiem Bisphenol A im Mittel etwa 1/20 des Gesamtgehaltes, wobei wieder große interindividuelle Unterschiede zwischen den Tieren zu beobachten sind. Im Fettgewebe unterscheiden sich die Konzentrationen an freiem und gesamten Bisphenol A praktisch

nicht (s. Abb. 24g). Dies läßt sich wie beim *p-tert*-Octylphenol mit der größeren Lipophilie dieser Substanz im Vergleich zum Konjugat erklären.

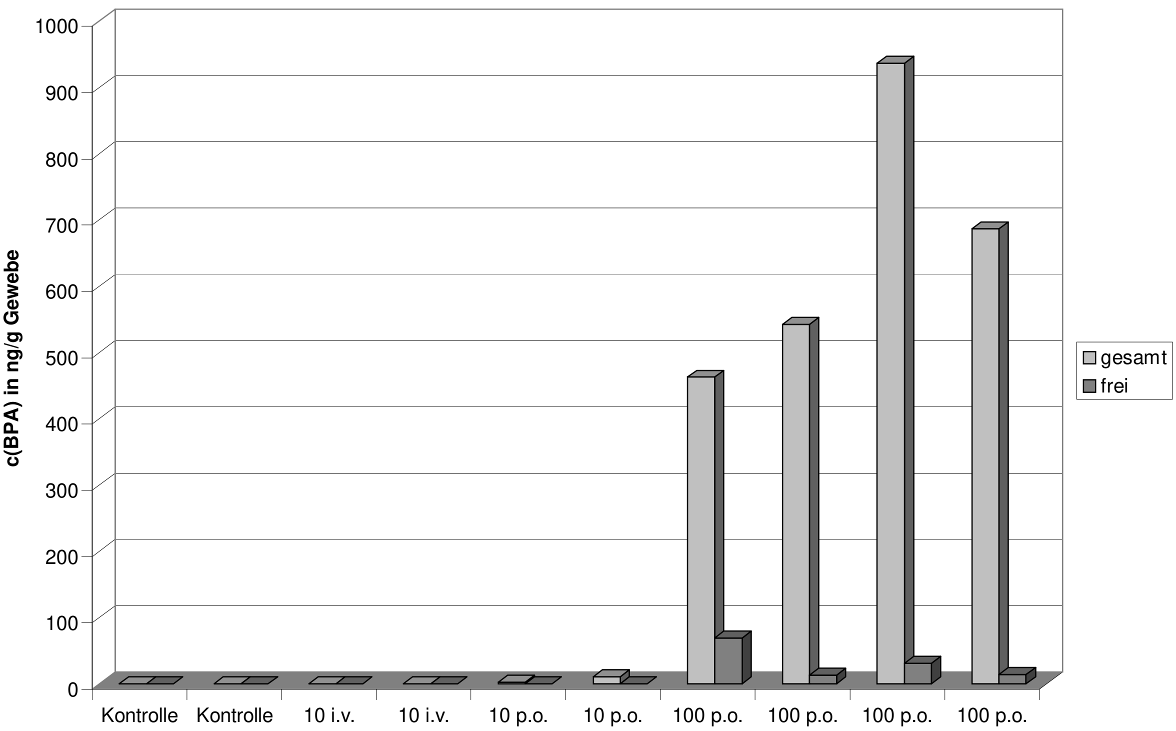


Abb. 24a: Bisphenol A in **Leber**gewebe (32 h bzw. 48 h nach Applikation; Werte für Einzeltiere aus den verschiedenen Dosisgruppen)

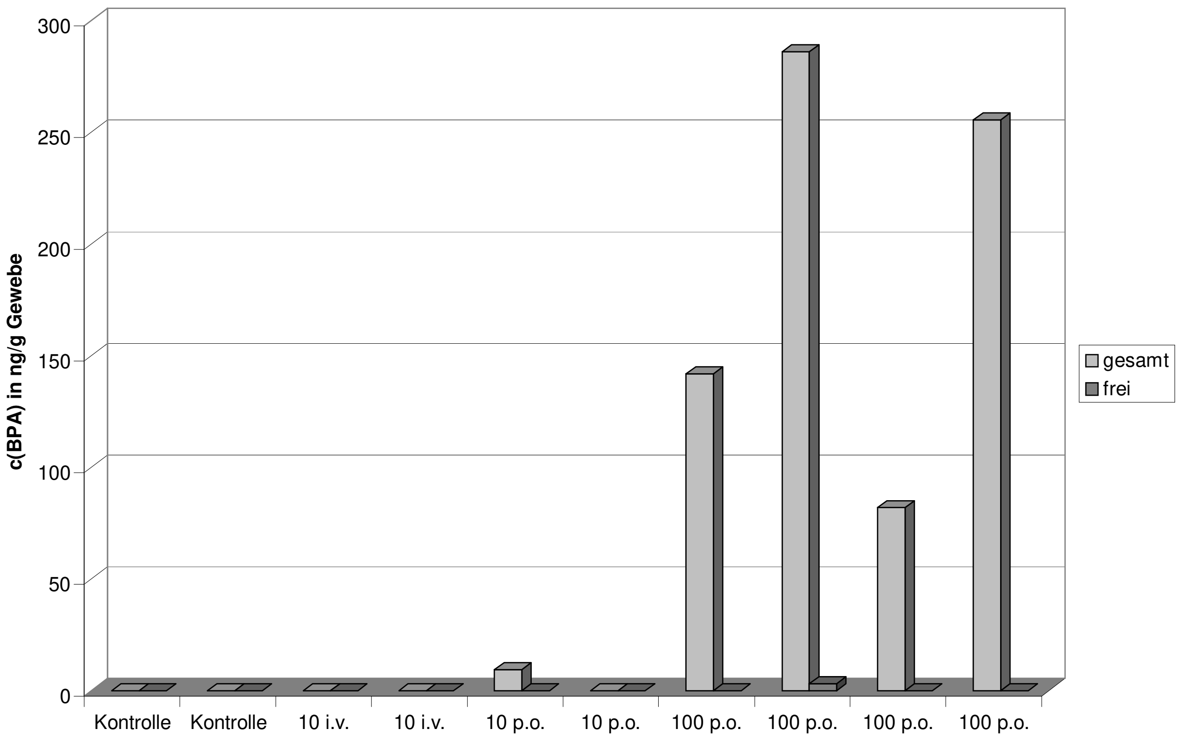


Abb. 24b: Bisphenol A in **Nieren**gewebe (32 h bzw. 48 h nach Applikation; Werte für Einzeltiere aus den verschiedenen Dosisgruppen)

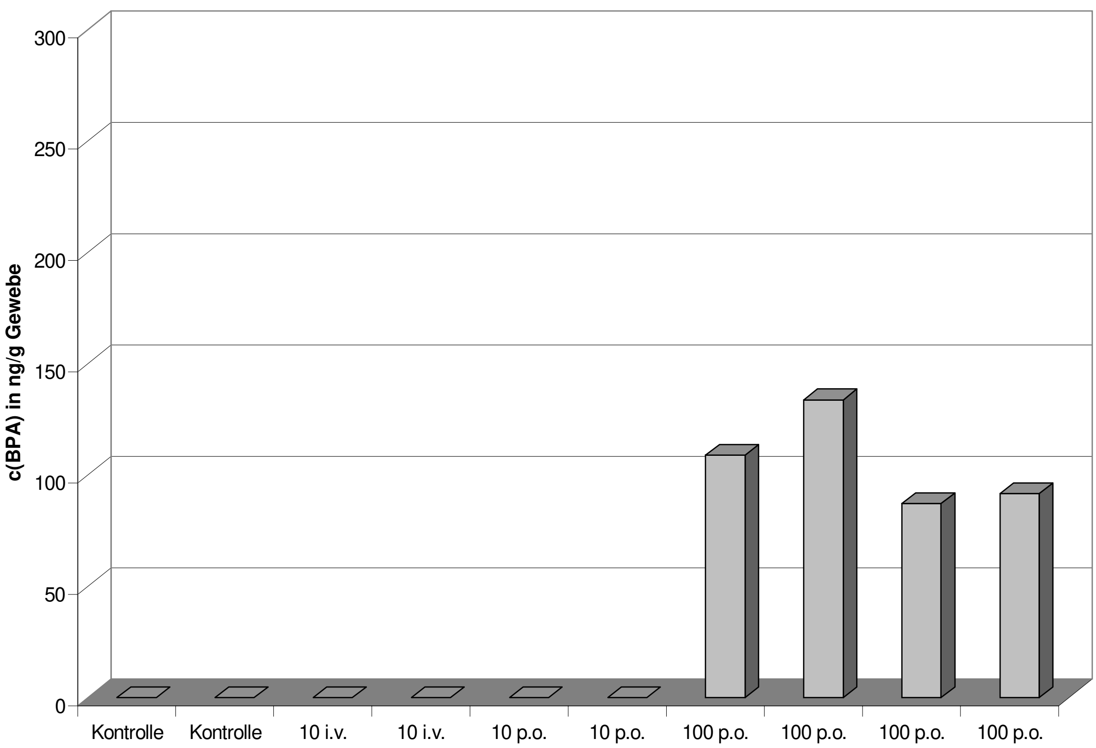


Abb. 24c: Bisphenol A in **Uterus**gewebe (32 h bzw. 48 h nach Applikation; nur Gesamtgehalte, da zu wenig Probenmaterial; Einzeltiere)

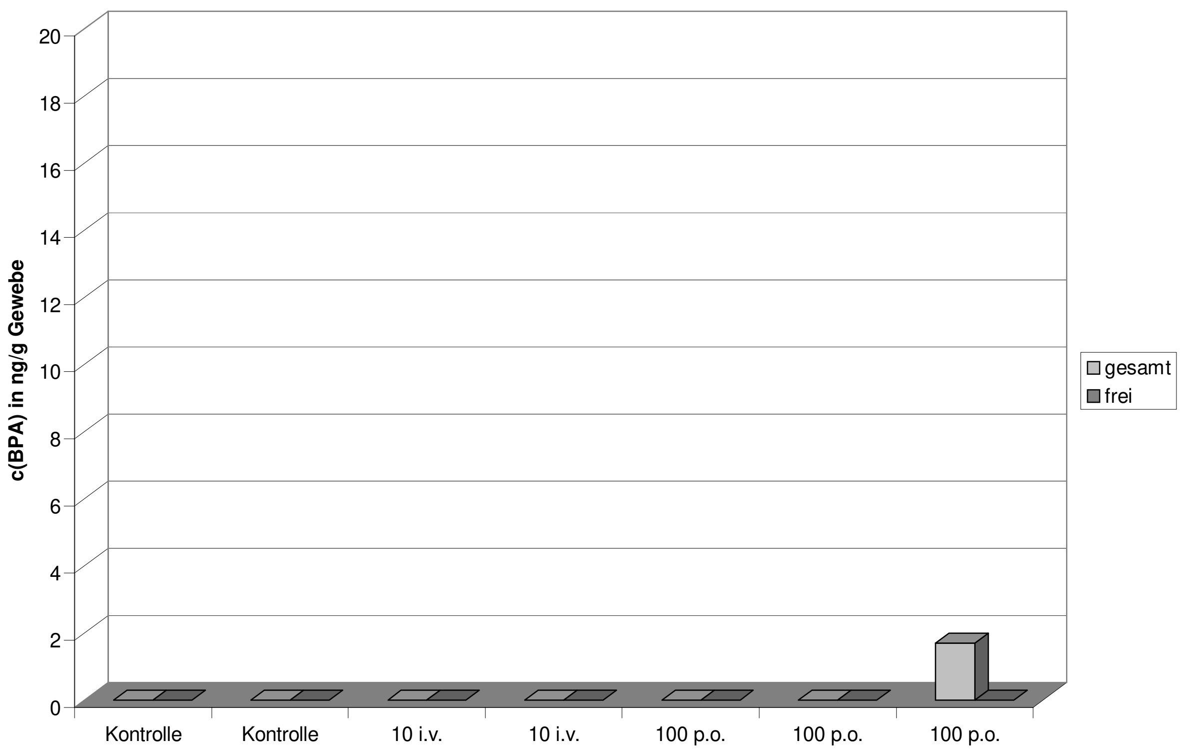


Abb. 24d: Bisphenol A in **Gehirn** (32 h bzw. 48 h nach Applikation; Werte für Einzeltiere aus den verschiedenen Dosisgruppen)

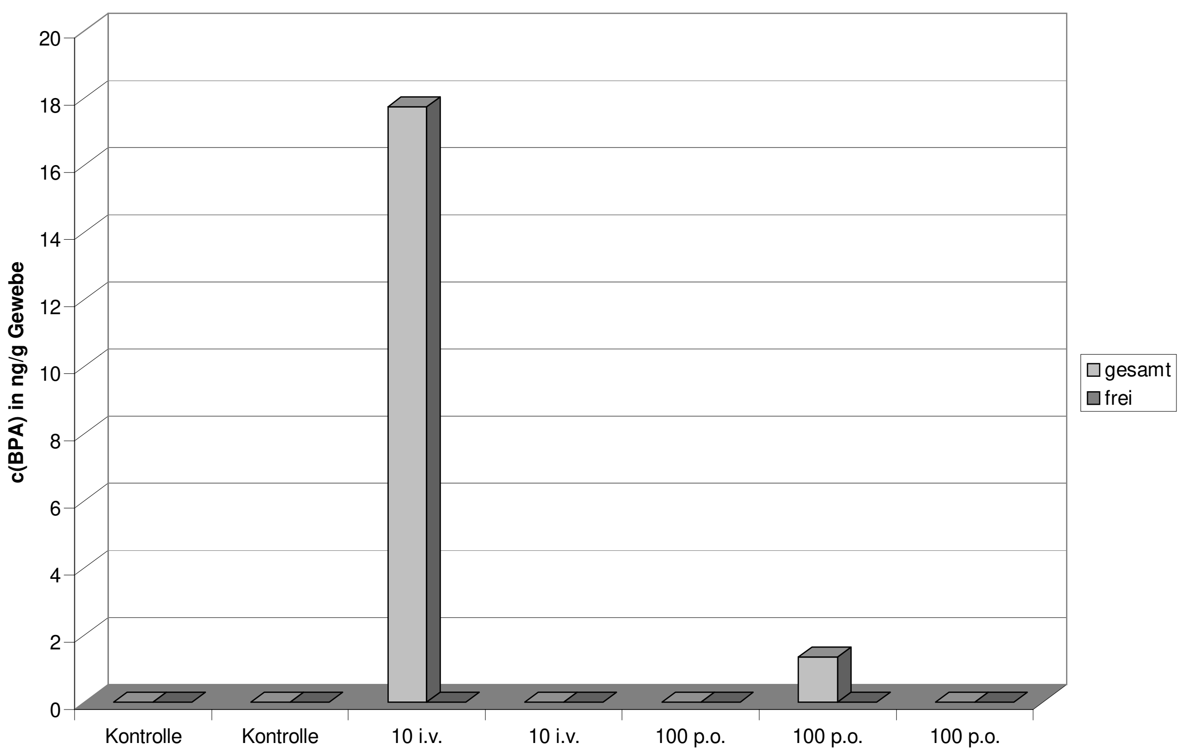


Abb. 24e: Bisphenol A in **Lungen**gewebe (32 h bzw. 48 h nach Applikation; Werte für Einzeltiere aus den verschiedenen Dosisgruppen)

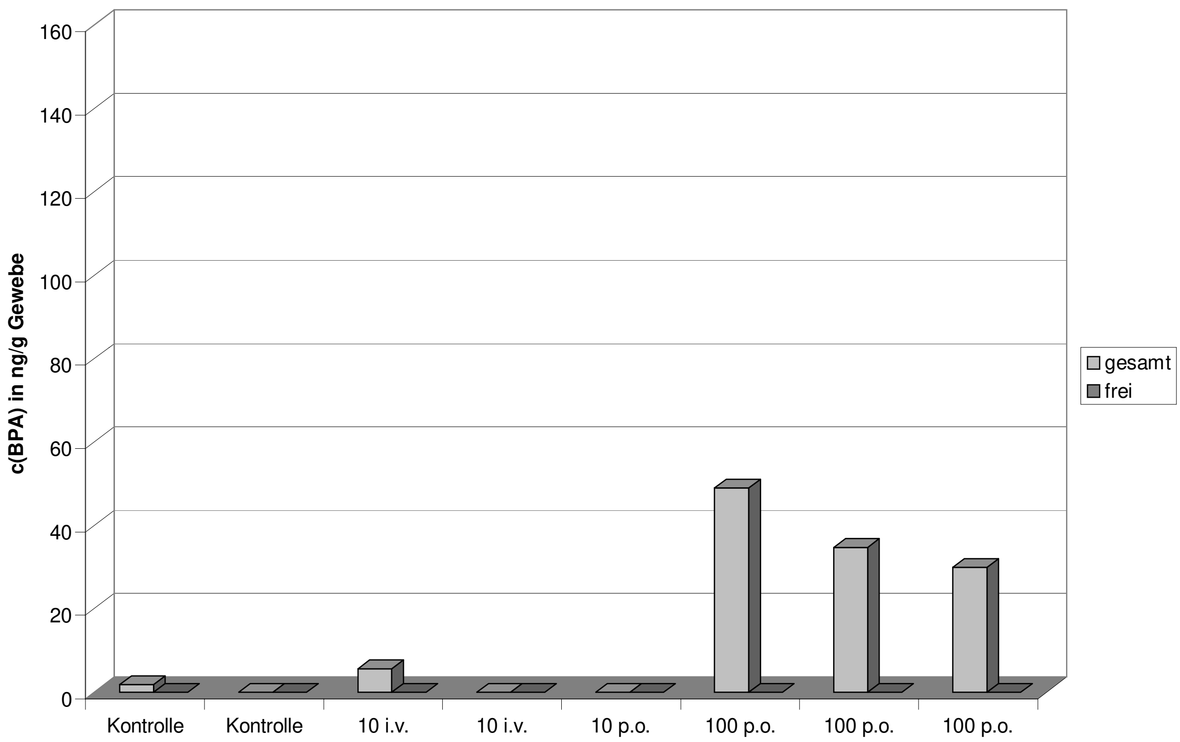


Abb. 24f: Bisphenol A in **Muskel**gewebe (32 h bzw. 48 h nach Applikation; Werte für Einzeltiere aus den verschiedenen Dosisgruppen)

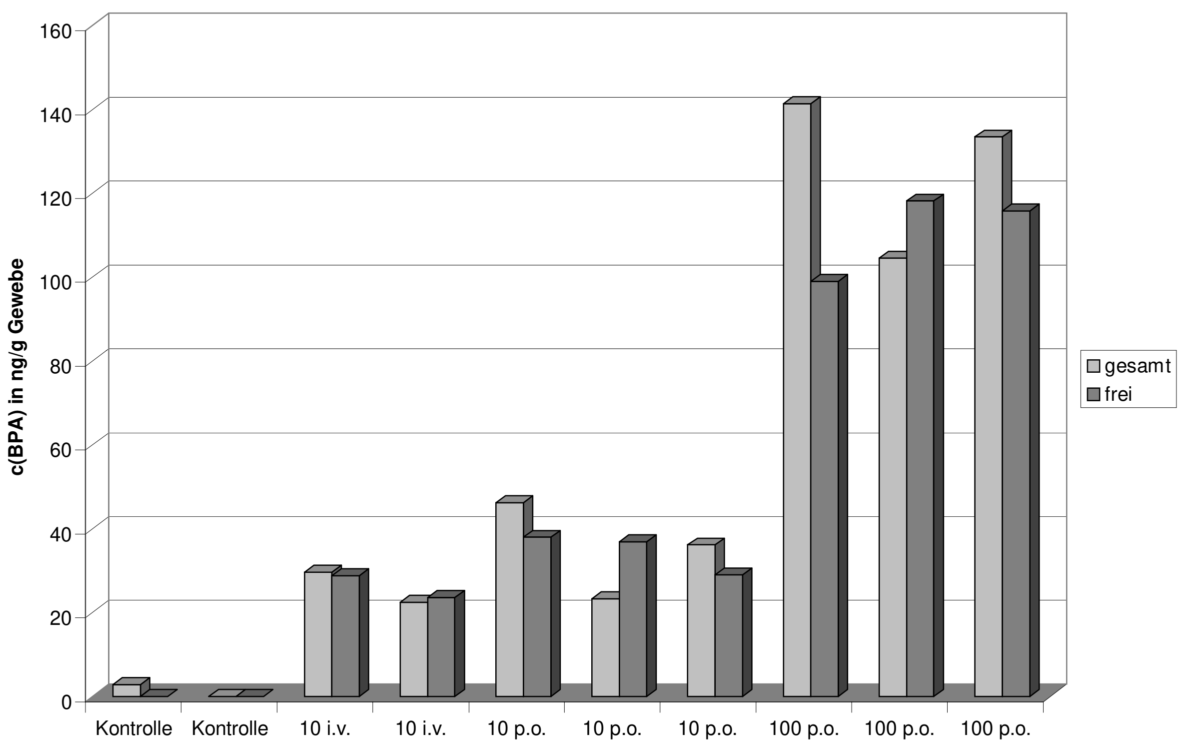


Abb. 24g: Bisphenol A in **Fett**gewebe (32 h bzw. 48 h nach Applikation; Werte für Einzeltiere aus den verschiedenen Dosisgruppen)

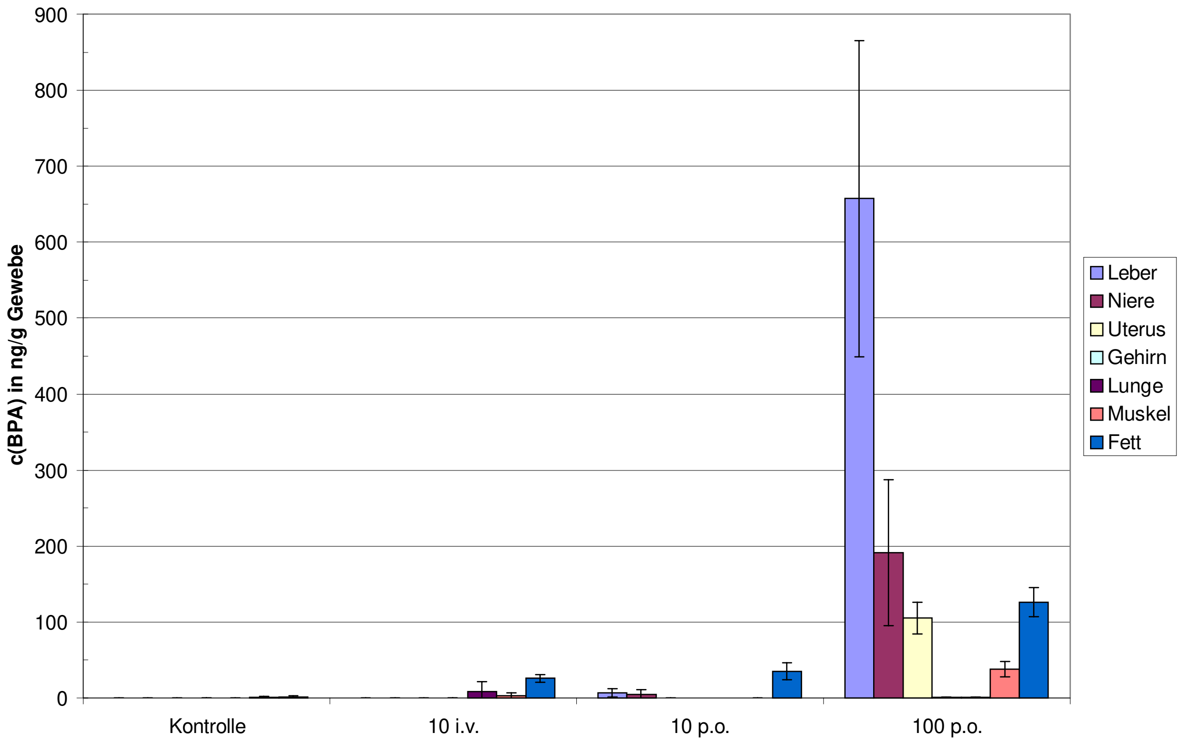


Abb. 25: Gesamtgehalte von Bisphenol A in Geweben 32 h bzw. 48 h nach Applikation (Mittelwerte für n = 3 - 4 Einzelproben von Tieren aus vers. Dosisgruppen)

3.4 Untersuchungen zur Toxikokinetik von Daidzein in weiblichen DA/Han-Ratten nach Einmalapplikation

Die Untersuchungen zur Toxikokinetik von Phytoöstrogenen wurden an weiblichen DA/Han-Ratten durchgeführt. Als Vertreter der Phytoöstrogene wurde Daidzein gewählt. Die Substanz wurde den Tieren *per os* bzw. intravenös verabreicht. Aus der Konzentrations-Zeit-Kurve nach *i.v.*-Applikation wurde die terminale Halbwertzeit berechnet, aus dem Verhältnis der Flächen unter den Kurven nach *p.o.*- und *i.v.*-Applikation die orale Bioverfügbarkeit.

3.4.1 Konzentrations-Zeit-Verläufe im Plasma nach Einmalapplikation von Daidzein

3.4.1.1 Konzentrations-Zeit-Verläufe im Plasma nach *i.v.*-Applikation von Daidzein

Abbildung 26 zeigt den Konzentrations-Zeit-Verlauf von freiem Daidzein in Plasma nach *i.v.*-Injektion von 10 mg Daidzein pro Kilogramm Körpergewicht. Direkt nach der Injektion liegen die Daidzein-Konzentrationen bei ca. 30 µg/ml und fallen innerhalb der ersten Stunde schnell ab. Nach 6 h liegen sie unterhalb von 50 ng/ml. Die berechnete Ausgleichskurve in Abbildung 26 zeigt die mathematische Anpassung der Daten nach dem Dreikompartimenten-Modell; aus dem γ-Term ergibt sich eine terminale Eliminationshalbwertzeit von ca. 4 h.
Zur Problematik bei den *i.v.*-Injektionen s. Kap. 2.5 und Kap. 3.2.1.1.

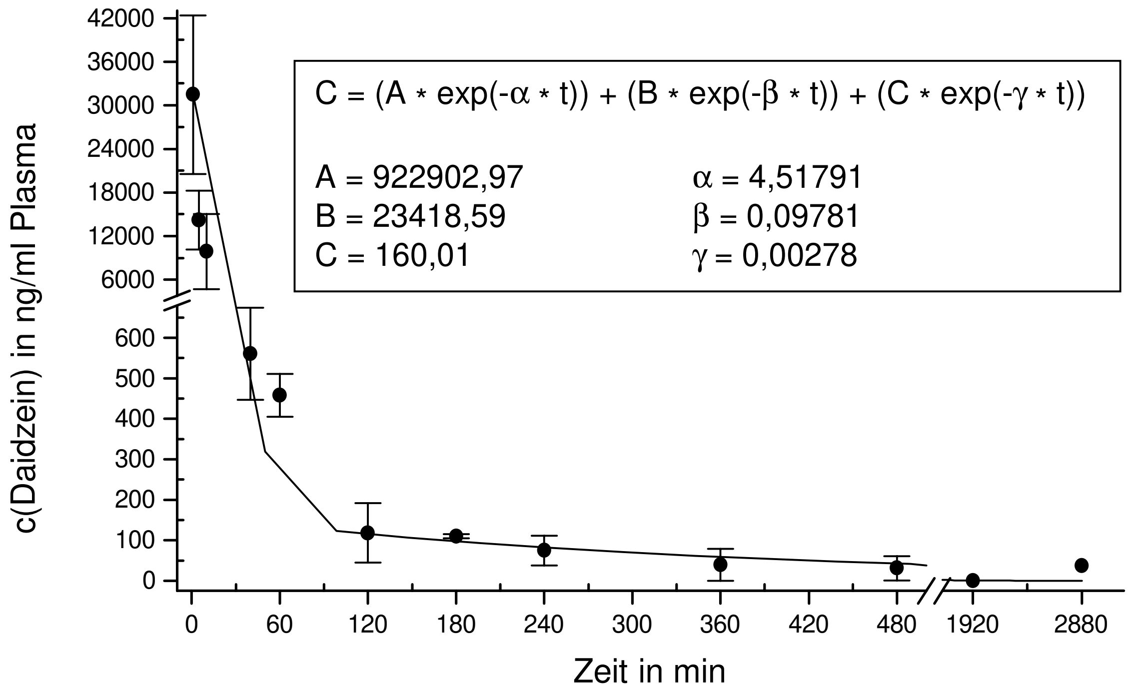


Abb. 26:

Daidzein-Plasmaspiegel in Abhängigkeit von der Zeit nach *i.v.*-Inj. von 10 mg/kg KG in weiblichen DA/Han-Ratten; berechnete Ausgleichskurve nach Dreikompartimenten-Model (n = 2 - 5)

3.4.1.2 Konzentrations-Zeit-Verläufe im Plasma nach *p.o.*-Applikation von Daidzein

In Abbildung 27a sind die mittleren Plasma-Spiegel nach Gabe von 10 mg/kg KG Daidzein *p.o.* dargestellt. Daidzein ist bereits 10 min nach Applikation im Blut nachweisbar, d. h. zumindest ein Teil der Dosis wird sehr schnell aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert. Auffällig am Kurvenverlauf sind vor allem die Fluktuationen und die großen interindividuellen Unterschiede zwischen den Plasma-Spiegeln der einzelnen Tiere, welche die großen Standardabweichungen erzeugen. Diese Fluktuationen sind auch bei den Konzentrations-Zeit-Verläufen der Einzeltiere sichtbar (siehe Abb. 27b). Sie beruhen wahrscheinlich wie zuvor beim *p-tert*-Octylphenol und Bisphenol A primär auf enterohepatischer Rezirkulation des Daidzeins, eventuell bei der hohen Dosis z. T. auch auf Nachresorption von Daidzein aus dem Gastrointestinaltrakt.

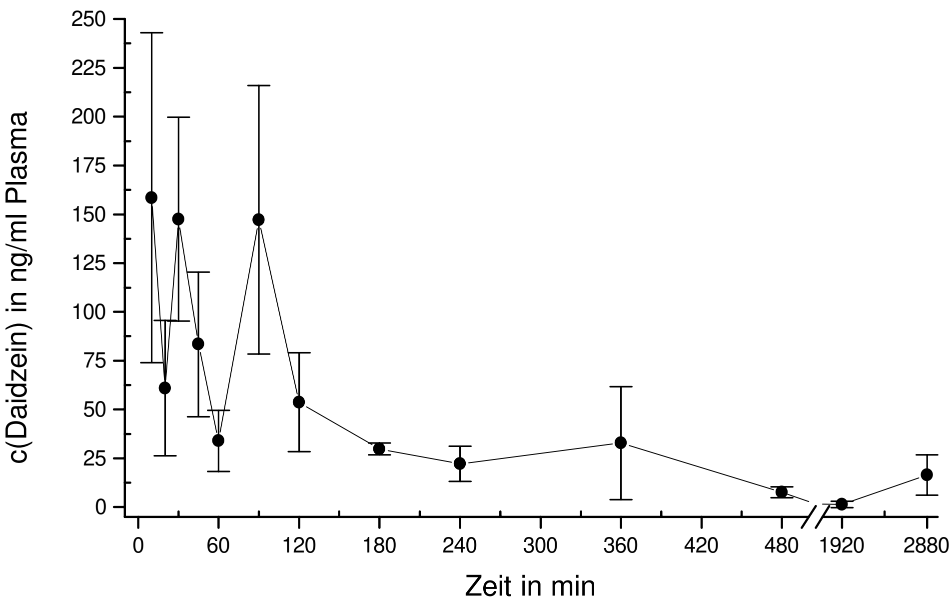


Abb. 27a:
Zeitverlauf der Daidzein-Plasmaspiegel in weiblichen DA/Han-Ratten nach oraler Applikation von 10 mg Daidzein/kg KG (Gruppenmittelwerte ± Standardabweichungen; n = 3 - 5)

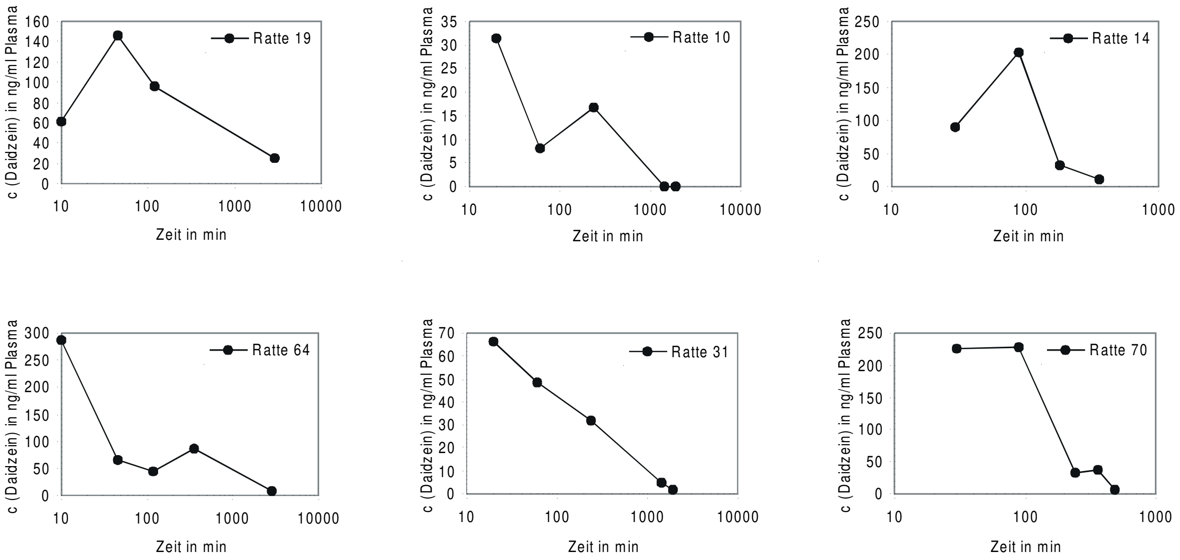


Abb. 27b:
Zeitverlauf der Daidzein-Plasmaspiegel in Einzeltieren nach oraler Appl. von 10 mg/kg KG (jeweils identische Probennahmezeitpunkte bei übereinander angeordneten Tieren)

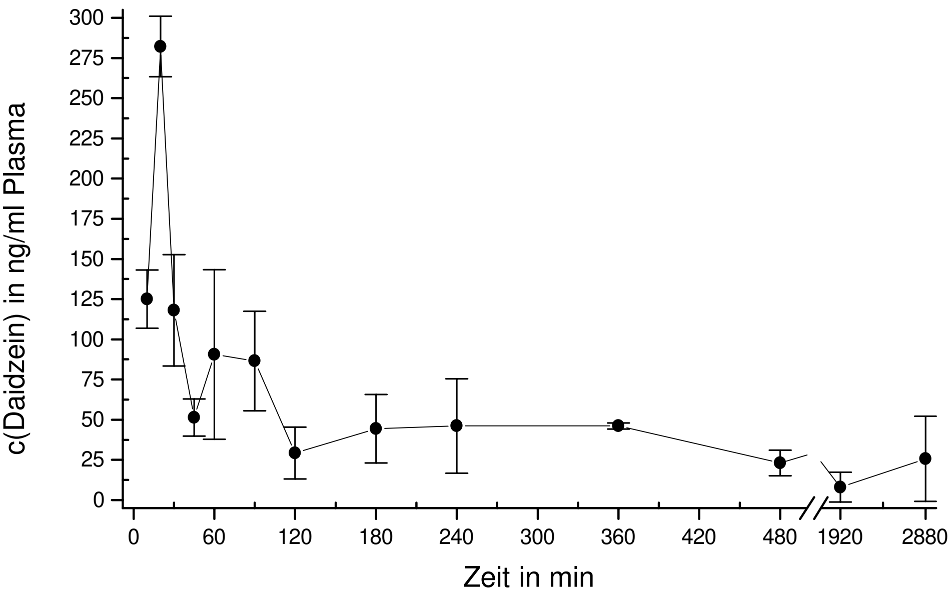


Abb. 28a:
Zeitverlauf der Daidzein-Plasmaspiegel in weiblichen DA/Han-Ratten nach oraler Applikation von 100 mg Daidzein/kg KG (Gruppenmittelwerte ± Standardabweichungen; n = 3 - 5)

Entsprechend sind in den Abbildungen 28a und 28b die Konzentrations-Zeit-Verläufe nach Einmalapplikation von 100 mg/kg KG Daidzein *p.o.* (per Schlundsonde) dargestellt. Wiederum zeigen vor allem die Kurven für die Einzeltiere eine ausgeprägte enterohepatische Rezirkulation und Nachresorption des Daidzeins an.

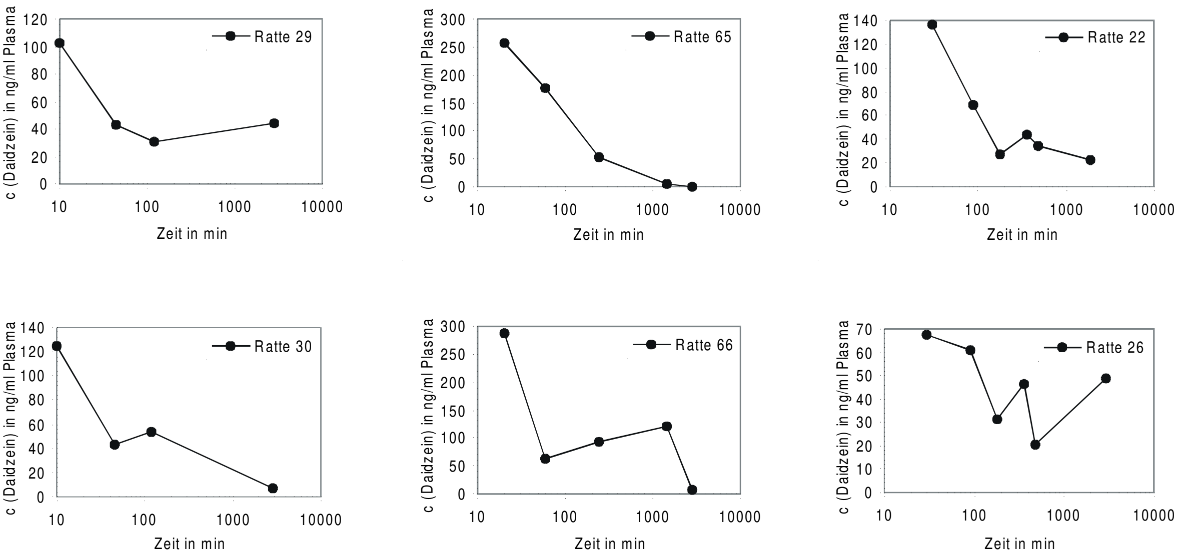


Abb. 28b:
Zeitverlauf der Daidzein-Plasmaspiegel in Einzeltieren nach oraler Appl. von 100 mg/kg KG (jeweils identische Probennahmezeitpunkte bei übereinander angeordneten Tieren)

Die mittleren Plasmaspiegel liegen nach *p.o.*-Gabe von 100 mg/kg KG (Abb. 28a und Abb. 28b) in der gleichen Größenordnung wie nach Gabe der 10fach niedrigeren Dosis (Abb. 27a und Abb. 27b). Dies spricht für eine geringere Bioverfügbarkeit der höheren Dosis.
Basierend auf der Berechnung der Flächen unter den Kurven (AUCs) (s. Kap. 2.9) für die gemittelten Kurvenverläufe ergibt sich für Daidzein eine orale Bioverfügbarkeit von 9,7 % nach Gabe von 10 mg/kg KG bzw. von 2,2 % nach Gabe von 100 mg/kg KG.

3.4.1.3 Vergleich von freiem Daidzein und Gesamt-Daidzein im Plasma

In Ergänzung zu den oben beschriebenen toxikokinetischen Basisparametern wurden auch die Spiegel der Phase-II-Metabolite (Glucuronide und Sulfate) für einige exemplarische Plasmaproben bestimmt (s. Abb. 29). Zu allen untersuchten Zeitpunkten liegen die Gesamt-Daidzein-Spiegel (freies Daidzein + Konjugate) deutlich oberhalb der Spiegel der freien Gehalte. Zwischen Tieren einer Applikationsgruppe fallen interindividuelle Unterschiede in der Konjugatbildung auf. Außerdem ist ein langsamerer Abfall der Gesamt-Gehalte bei Tieren der hohen Dosisgruppe (100 mg/kg KG *p.o.*) verglichen mit Tieren der niedrigeren Dosisgruppe (10 mg/kg KG *p.o.*) zu erkennen. Diese langsamere Clearance könnte auf eine Sättigung des Phase-II-Metabolismus bei der hohen Dosierung zurückzuführen sein.

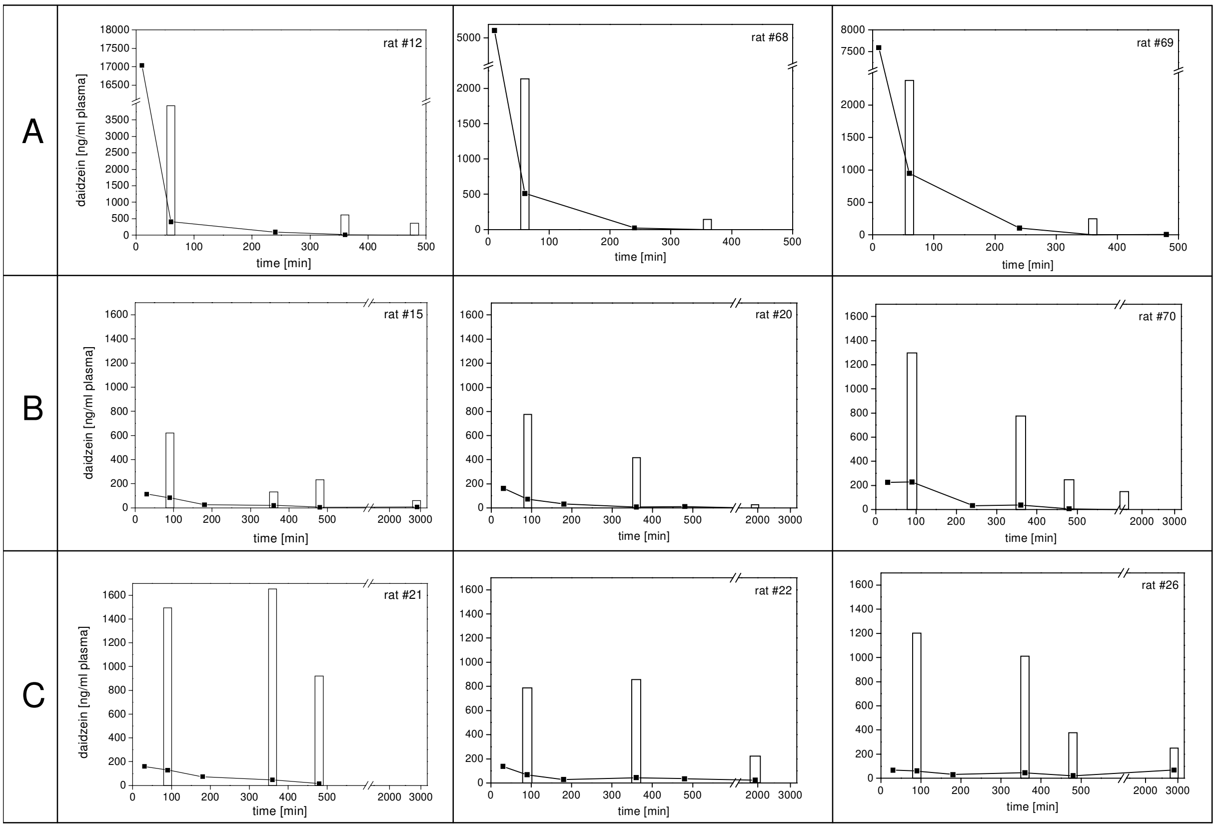


Abb. 29: Analyse von freiem Daidzein (schwarze Quadrate) und Gesamt-Daidzein (weiße Säulen) in Plasma von DA/Han-Ratten nach Gabe von:

A) 10 mg/kg KG Daidzein *i.v.*, B) 10 mg/kg KG *p.o.*, C) 100 mg/kg KG *p.o.*

3.4.2 Daidzein-Gehalte in Gewebeproben nach Einmalapplikation

Zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere (32 h bzw. 48 h nach Applikation; s. Tab. 10) wurden Gewebe entnommen und die Gesamt-Daidzein-Gehalte bei fünf Tieren pro Dosisgruppe in Leber, Niere und Uterus (s. Abb. 30) und bei zwei Tieren pro Dosisgruppe in Lunge, Gehirn und Skelettmuskulatur bestimmt. Gleichzeitig wurde in diesen Proben auch der Genisteingehalt bestimmt, um eine Vorstellung von der Isoflavon-Hintergrundbelastung aus dem Futter der Tiere zu erhalten (s. Kap. 3.4.4). Für Lungen-, Gehirn- und Skelettmuskelgewebe lagen die Daidzeinkonzentrationen für alle analysierten Proben unterhalb der Nachweisgrenze. Für die anderen Gewebe werden die Daidzein-Gehalte in Abbildung 30 dargestellt und mit den Gesamt-Plasma-Spiegeln zum selben Zeitpunkt verglichen. Wie erwartet, sind die Isoflavongehalte in den Kontrolltieren am niedrigsten, weil diese Tiere in der Nacht vor dem

Versuch kein Futter erhalten haben und schon 2 h nach ausschließlicher Gabe des Applikationsmediums getötet wurden. Ratten, denen Daidzein (*p.o.* oder *i.v.*) verabreicht wurde, wurden 32 h oder 48 h nach der Applikation getötet (bei einer Ausnahme nach 8 h) und hatten zuvor Futter und Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung. Es zeigt sich, daß die Daidzein-Gehalte von der Dosis und dem Applikationspfad abhängig sind (s. Abb. 30). Die Daidzeinspiegel der Dosisgruppe A (10 mg/kg KG *i.v.*) sind z. B. höher als in der Gruppe B (10 mg/kg KG *p.o.*), was auf die höhere Bioverfügbarkeit nach *i.v.*-Gabe im Vergleich zur *p.o.*-Applikation zurückzuführen ist. Die höchsten Daidzeinspiegel fanden sich in Gruppe C (100 mg/kg KG *p.o.*).
Trotz deutlicher interindividueller Unterschiede in den Absolut-Gehalten der einzelnen Tiere sind die Gehalte in Leber und Niere im Mittel drei- bis fünffach höher als im Plasma. Chromatogramme der Isoflavon-Analysen in den Uteri waren nicht immer exakt quantifizierbar, weil Störpeaks im Bereich des internen Standards koeluierten. In den meisten Proben lag zum Zeitpunkt der Tötung der Isoflavongehalt in den Uteri in der gleichen Größenordnung wie die Spiegel im Plasma und somit niedriger als in Leber bzw. Nieren.
Die Befunde zeigen z. T. deutliche Unterschiede in den Isoflavonkonzentrationen zwischen Plasma und einigen Geweben. Interessanterweise findet man also auch bei Substanzen, die relativ rasch eliminiert werden, eine Anreicherung in verschiedenen Geweben gegenüber dem Plasma.

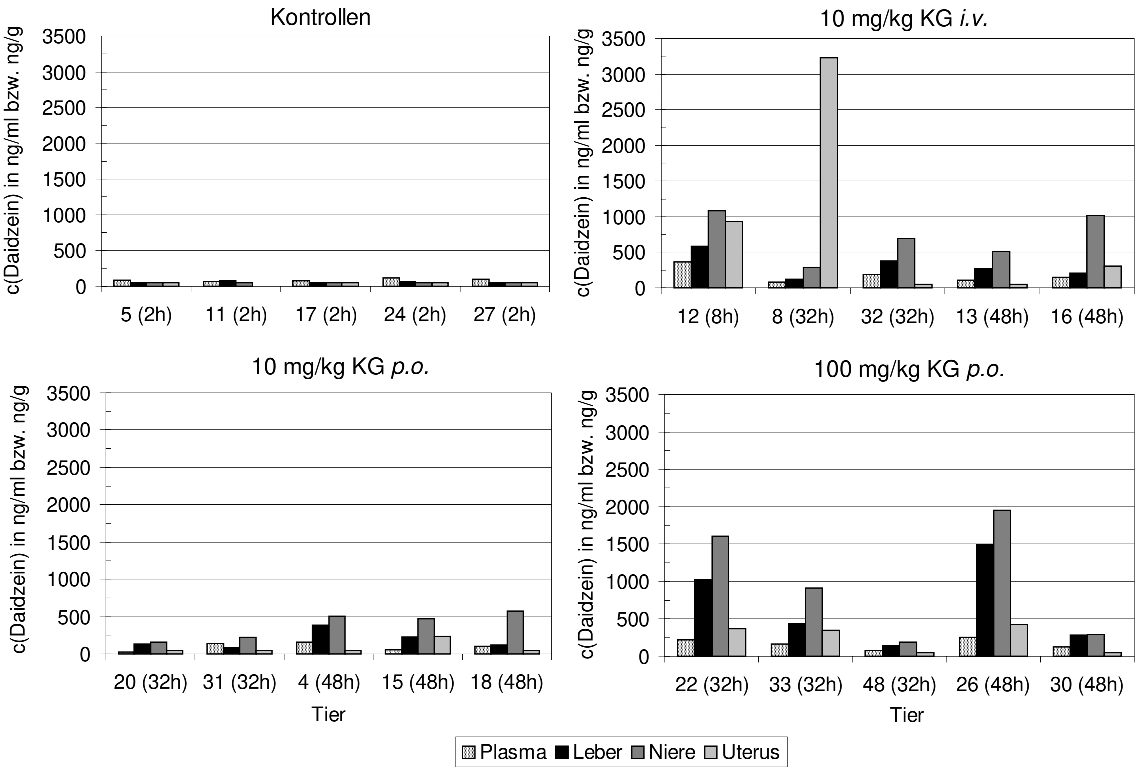


Abb. 30: Gesamt-Daidzein-Gehalte in verschiedenen Geweben* bzw. in Plasma zum Zeitpunkt der Tötung (32 h bzw. 48 h nach Daidzein-Applikation bzw. 2 h nach Lösemittelapplikation bei Kontrolltieren)

(A) 10 mg/kg KG *i.v.*, (B) 10 mg/kg KG *p.o.*, (C) 100 mg/kg KG *p.o.*

(* Uteruswerte unter Vorbehalt, Störpeaks im Chromatogramm)

3.4.3 Daidzein-Gehalte in der Galle nach *i.p.*-Applikation

Entsprechend den Studien mit *p-tert*-Octylphenol wurde die biliäre Exkretion von Daidzein an Ratten mit Hilfe einer sogenannten Gallenfistel untersucht. Das heißt, Daidzein (10 mg/kg KG *i.p.*) wurde an weibliche DA/Han-Ratten verabreicht, denen zuvor eine Polyethylenkanüle in den Gallengang gelegt worden war, über die kontinuierlich sezernierte Galle gesammelt wurde. Die Befunde (s. Abb. 31) zeigen, daß Daidzein effizient mit der Galle ausgeschieden wird. Dabei ist der Hauptteil des Daidzeins konjugiert und nur ein geringer Teil liegt unverändert in freier Form vor. Die maximale Daidzeinkonzentration wird nach etwa 30 min erreicht und 8 h nach Gabe finden sich immer noch deutlich nachweisbare Konzentrationen. Im Zeitraum bis 8 h nach Substanzgabe wurden etwa 27 % des verabreichten Daidzeins biliär ausgeschieden. Die vor Substanzverabreichung gemessenen Konzentrationen können auf Daidzein bzw. Genistein, welches aus dem Futter aufgenommen wurde, zurückgeführt werden, weil den Tieren bis direkt vor Versuchsbeginn Futter *ad libitum* zur Verfügung stand (während des Versuches stand kein Futter bereit).

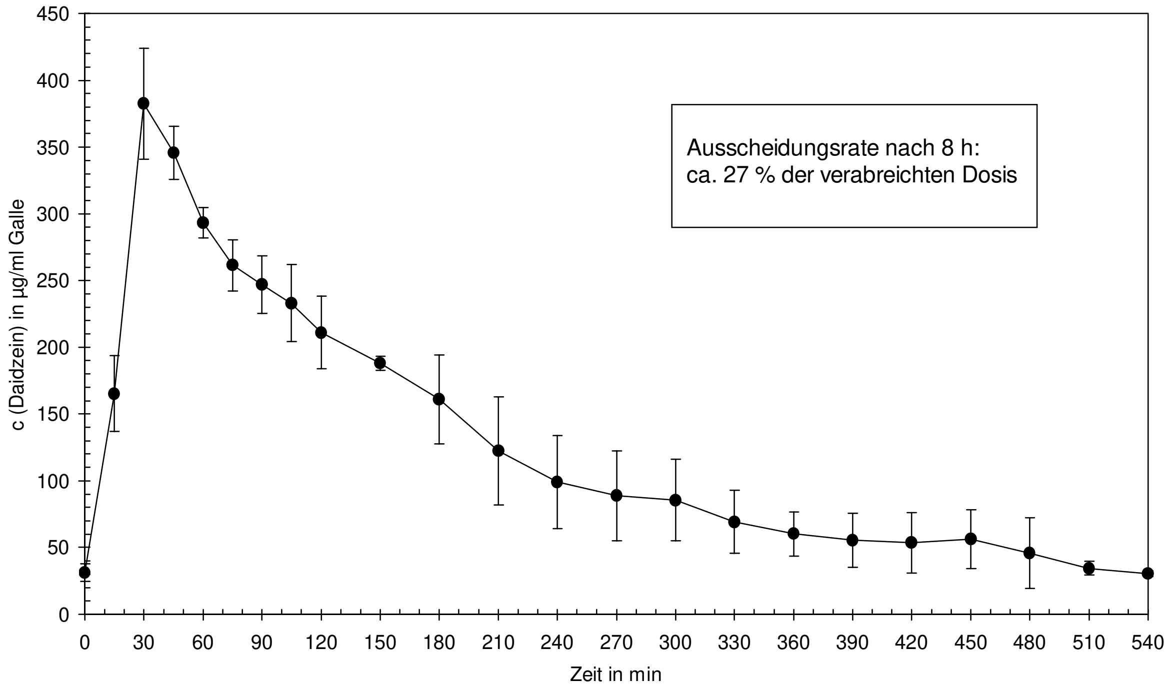


Abb. 31: Zeitverlauf der Daidzein-Gallespiegel in weiblichen DA/Han-Ratten nach *i.p.*-Applikation von 10 mg/kg KG (Gesamtgehalte) (Gruppenmittelwerte ± Standardabweichungen; n = 4)

3.4.4 Isoflavon-Hintergrundbelastung der Versuchstiere

Verschiedene Analysen, insbesondere Gewebe-, Galle- und Plasmaspiegel bei Kontrolltieren, lieferten immer wieder Hinweise auf eine Hintergrundbelastung der Tiere mit Daidzein und Genistein. Da das Nagerfutter Soja enthält, lag die Vermutung einer Hintergrundbelastung aus dieser Quelle nahe. Deshalb wurden die Daidzein- und Genistein-Gehalte der im Projekt verwendeten Futterchargen (Ssniff R/M-Haltung) analysiert und mit den Gehalten üblicher Nagerdiäten verglichen. Zum Vergleich wurden zwei Chargen einer anderen sojahaltigen (Altromin A und B) und einer sojafreien

Diät (Altromin C1000) analysiert. Ferner wurden in der Literatur angegebene Gehalte in anderen Nagerfuttern mit den von unserer Gruppe gefundenen verglichen. Dabei zeigte sich, daß die Isoflavon-Gehalte (Daidzein und Genistein) der im Projekt verwendeten Ssniff-Diät eine durchaus übliche Höhe aufweisen (0,30 - 0,53 mg/g Futter) (Janning et al. 2000; Murphy et al. 1982; Thigpen et al. 1999).

Die biologische Wirksamkeit dieser Hintergrundbelastungen wird in der Literatur diskutiert. So berichten z. B. Boettger-Tong et al. (1998) von einzelnen Ratten, die nach Fütterung bereits ohne Behandlung deutliche Zeichen einer Östrogenisierung aufwiesen und Santell et al. (1997), daß bereits relativ niedrige Genistein-Dosen in Sprague-Dawley-Ratten ein signifikantes Uteruswachstum auslösten.

In unserer Gruppe wurde daher eine Charge der Sniff Diät zweimal mit Ethanol unter Rückfluß extrahiert. Die Analyse ergab, daß nach dieser Behandlung weder Daidzein noch Genistein im Futter nachweisbar waren (Nachweisgrenze ca. 10 µg/g Futter). Das so behandelte Futter wurde zu Pellets gepreßt und der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. H. Michna an der Deutschen Sporthochschule in Köln zur Verfügung gestellt.

Die dortigen Untersuchungen ergaben, daß das relative Uterusfeuchtgewicht bei isoflavon-frei ernährten Ratten nicht höher liegt als bei „normal“ ernährten Tieren (sondern eher niedriger). Außerdem wurde an Wistar-Ratten gezeigt, daß mit Standarddiät ernährte Tiere hinsichtlich des relativen Uterusfeuchtgewichtes nicht mit einer verringerten Sensitivität auf exogene Östrogengaben reagieren.

4 Diskussion

4.1 Qualität der Analytik

Ein Ziel der vorgestellten Arbeit war die Etablierung bzw. Optimierung und Anwendung von analytischen Verfahren zur Bestimmung von Xenoöstrogenen in biologischem Material.

Neben der Ausarbeitung der Probenvorbereitung, umfaßten die entwickelten analytischen Verfahren die chromatographische Trennung mittels GC und HPLC sowie den Nachweis von Xenoöstrogenen mit MS bzw. UV-Detektion. Prinzipiell hätten die Analysen aller Prüfsubstanzen mittels GC-MS erfolgen können, zumal für Daidzein eine sensitivere Bestimmung zu erwarten gewesen wäre als mit dem verwendeten HPLC-UV-System. Allerdings waren die GC-MS-Kapazitäten begrenzt und wurden daher auf die beiden Prüfsubstanzen *p-tert*-Octylphenol und Bisphenol A beschränkt. Die alternativ gewählten HPLC-Methoden für die Isoflavon-Bestimmungen konnten so weit optimiert und etabliert werden (Mikro-HPLC), daß auch sie nachweisstark genug waren.

Für die chromatographischen Systeme wurden jeweils alle variablen Parameter wie Fließ- und Elutionsmittel, Flußrate, Temperaturprogramm, Gradient etc. in Hinblick auf Selektivität, Wiederfindung und Reproduzierbarkeit optimiert.

Bei den verwendeten Systemen sind die Substanzen hinreichend von Störpeaks getrennt und die Empfindlichkeit der eingesetzten Detektoren reicht aus, um die Substanzkonzentrationen in dem untersuchten Probenmaterial sicher quantitativ zu erfassen.

Es existieren lediglich Limitierungen hinsichtlich des Probendurchsatzes. So sind zum Beispiel die Gewebeaufarbeitungen sehr arbeits- und zeitintensiv (Homogenisierung, Hydrolyse). Ebenso behindern Aufarbeitungsprozeduren mit vielen Schritten (Extraktionen, BPA-Derivatisierung etc.) und relativ lange HPLC-Läufe (> 45 min bei der Daidzein-Bestimmung) einen hohen Probendurchsatz.

Die vorgestellten Methoden sind aufgrund dieser Ergebnisse auf jeden Fall bei toxikologisch-chemischen Fragestellungen zur Bestimmung von Xenoöstrogenen in biologischem Material einsetzbar, jedoch nicht für Anwendungen im Routinebetrieb mit hohen Probenzahlen.

4.2 Toxikokinetik von *p-tert*-Octylphenol

Die Intention der dargestellten Experimente war die Ermittlung grundlegender toxikokinetischer Parametern für *p-tert*-Octylphenol in weiblichen DA/Han-Ratten. Diese sind als ergänzende Daten für weitere *in-vivo*-Experimente wie z. B. dem hormonabhängigen RUCA-I Adenocarcinoma-Model (Vollmer und Schneider 1996) hilfreich, da dieses speziell an diesem Rattenstamm etabliert wurde. Verglichen mit dem früheren Datensatz an toxikokinetischen Parametern von OP in männlichen Wistar-Ratten (Certa et al. 1996) ist die biologische Halbwertszeit des OP in der hier vorgestellten Studie deutlich länger. Die terminale Halbwertszeit (γ-Phase) nach *i.v.*-Verabreichung von 5 mg OP/kg KG war bei den männlichen Wistar-Ratten (Certa et al. 1996) ca. 5 h, lag aber bei den weiblichen DA/Han-Ratten der vorliegenden Studie bei ca. 36 h (vgl. Tab. 18). Die Studien unterscheiden sich auch in der Höhe der OP-Plasmaspiegel, die nach oraler Applikation erhalten wurden und deuten somit auf geschlechtsspezifische Unterschiede hin (Mugford und Kedderis 1998). Ein Einfluß aufgrund der Stammunterschiede ist hierbei ebenfalls denkbar, aber eher von untergeordneter Bedeutung.

Im Vergleich zu den früheren Daten in männlichen Wistar-Ratten zeigen die aktuellen Daten in weiblichen DA/Han-Ratten deutlichere Auffälligkeiten im Zeitverlauf der OP-Blutspiegel nach oraler Verabreichung von OP („mehrgipfliger Verlauf“), die auf eine ausgeprägte enterohepatische Zirkulation von OP hinweisen.

Die enterohepatische Zirkulation ist ein typisches Merkmal und eine bekannte Eigenschaft von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Ratten (Löffler und Bolt 1980).

Die maximalen OP-Spiegel im Blut bei weiblichen DA/Han-Ratten nach oraler Gabe von 50 bzw. 200 mg OP/kg KG lagen 4,5 bzw. 3 mal höher als die vorher berichteten Blutspiegel bei männlichen Wistar-Ratten.

Laut früherer *in vitro*-Versuche mit Leber-homogenaten aus männlichen Wistar-Ratten (Certa et al. 1996) sind die Hauptpfade des Lebermetabolismus für OP die Glucuronidierung [V_{max} = 11,24 nmol/(min * mg Mikrosomalprotein)] und mit etwas geringerem Umsatz die Sulfatierung [V_{max} = 2,85 nmol/(min * mg Mikrosomalprotein)]. Dies ist eine wichtige Vorraussetzung für eine ausgeprägte enterohepatische Zirkulation, wobei die β-Glucuronidasen der Darmbakterien mit der Galle sezernierte Glucuronide spalten und somit wieder die ursprünglichen Aglycone entstehen (Löffler und Bolt 1980). Daß OP-Konjugate mit der Galle ausgeschieden werden, ließ sich mit Galleproben nachweisen, welche mit Hilfe einer Gallenfistel gewonnen wurden. Innerhalb von 8 h nach *i.p.*-Gabe von 5 mg/kg KG wurden etwa 8 % der applizierten Dosis eliminiert (s. Abb. 20b). Diese Beobachtung paßt zu den Molekulargewichten der OP-Konjugate (381 Da für das Glucuronid, 285 Da für das Sulfat, wobei die Glucuronidierung dominiert, s. oben), welche im oder über dem Bereich von 300 Da liegen, ab dem bei Ratten die biliäre Exkretion dominiert (Nau 1994; s. Kap. 1.3 „Toxikokinetik").

Nach oraler Applikation resultiert eine fünffach höhere Dosis nicht in einem proportionalem Anstieg der OP-Blutspiegel um denselben Faktor 5 (vgl. Datensätze der Abbildungen 16a, 16b, 17a u. 17b). Die langsamere Absorption der höheren Dosis von 200 mg OP/kg KG aus dem Verdauungstrakt im Vergleich zur niedrigen Dosis von 50 mg OP/kg KG ist wahrscheinlich z. T. durch die geringe Löslichkeit von OP im wäßrigen Medium bedingt. Eine teilweise Präzipitation der nahezu mit OP gesättigten Lösung ist im sauren Milieu des Magens vorstellbar, so daß die Aufnahme hierdurch verzögert werden könnte. Weiterhin kann bei der hohen OP-Dosis eine Sättigung des für die Elimination wesentlichen Phase-II-Metabolismus vermutet werden. Beim Menschen ist dies bei den geringen Dosen durch Exposition gegenüber Alkylphenolen nicht zu befürchten.

Im Rahmen der Wirkstudien im Verbundprojekt zeigte sich außerdem, daß OP nur nach Applikation sehr hoher Dosen (z. B. 200 mg/kg KG) typische östrogene Effekte wie Uteruswachstum auslösen kann. Solche Dosen liegen, wie oben bereits erwähnt, weit oberhalb der Mengen, die der Mensch aufnimmt (ca. 2 µg/kg KG; s. Kap. 1.5).

Die dargestellten Daten lassen außerdem darauf schließen, daß bezüglich der biologischen Disposition von OP in Ratten, geschlechtsspezifische Unterschiede existieren. Es ist wichtig, Aspekte wie eine solche Geschlechtsspezifität oder enterohepatische Zirkulation und andere toxikokinetische Parameter zu kennen, um die Übertragbarkeit von *in vitro*-Daten auf relevante *in vivo*-Situationen besser abschätzen zu können. Sie sind somit für eine toxikologische Risikoabschätzung von OP als endokriner Modulator notwendig (Bolt et al. 1998; Bolt et al. 2001).

Die OP-Elimination ist bei weiblichen Ratten im Vergleich zu männlichen Ratten langsamer. Die hieraus resultierenden höheren OP-Spiegel lassen eine potentielle Akkumulation eher möglich erscheinen, so daß weibliche Ratten in dieser Hinsicht das sensitivere Versuchstier sind.

4.3 Toxikokinetik von Bisphenol A

In einer Reihe experimenteller Systeme zeigte Bisphenol A schwache östrogenartige Aktivitäten (Gaido et al. 1997; Krishnan et al. 1993; Kuiper et al. 1997; Laws et al. 2000). Bisphenol A interagiert sowohl mit α- als auch β-Östrogenrezeptoren (Kuiper et al. 1997, 1998), wobei die östrogene Potenz *in vitro* im Vergleich zu Östradiol gering ist (Gaido et al. 1997; Schafer et al. 1999). Einige Studien weisen auf die Möglichkeit vielfältiger Wirkungen solcher Östrogenrezeptor-Agonisten auf die Genexpression und das Zellwachstum hin (Bergeron et al. 1999; Gould et al. 1998). Diel et al. (2000) charakterisieren Bisphenol A als eine Verbindung mit sehr geringer uterotropher Potenz, d. h. eine östrogene Wirkung war nur in sehr hohen Dosen nachweisbar. In Einklang damit konnte in mehreren Studien nicht bestätigt werden, daß BPA wie früher vermutet bereits im Niedrigdosisbereich Effekte auf die Reproduktion zeigt. Bisphenol A sollte daher auch nicht als selektiv reproduktionstoxische Verbindung angesehen werden (Cagen 1999b).

Toxikokinetische Studien dienen als Bindeglied zwischen toxikodynamischen Befunden in einfachen zellulären Tests und am Ganztier. Hierbei bieten sie Erklärungsmöglichkeiten für Unterschiede zwischen relativen Wirkstärken *in vivo* und *in vitro*. Gemäß einer publizierten Studie mit weiblichen und männlichen Fischer 344-Ratten (Pottenger et al. 2000) ist die Bioverfügbarkeit von Bisphenol A wesentlich vom Weg der Verabreichung und vom Geschlecht abhängig. So ist erkennbar, daß die sehr geringe orale Östrogenität von Bisphenol A (Diel et al. 2000; Laws et al. 2000) aus der geringen Bioverfügbarkeit resultiert. Die in der vorliegenden Studie beobachtete Dosis-Abhängigkeit der oralen Bioverfügbarkeit von BPA (16,4 % bei 10 mg/kg KG, 5,6 % bei 100 mg/kg KG) resultiert z. T. wahrscheinlich wie beim *p-tert*-Octylphenol aus der geringen Löslichkeit der Verbindung im wäßrigen, sauren Milieu des Gastrointestinaltraktes. Eine teilweise Präzipitation der nahezu mit Bisphenol A gesättigten

Lösung ist hier vorstellbar, so daß die Aufnahme bei Gabe einer sehr hohen Dosis hierdurch verzögert werden könnte. So resultiert ähnlich wie beim *p-tert*-Octylphenol auch hier eine zehnfach höhere Dosis bei oraler Applikation nicht in einem proportionalem Anstieg der Bisphenol A-Plasmaspiegel um denselben Faktor 10 (vgl. Datensätze der Abbildungen 22a, 22b, 23a u. 23b).

Die vorliegenden Daten zeigen einen auffälligen, mehrgipfligen Verlauf der Bisphenol A-Plasmaspiegel gegen die Zeit nach oraler Gabe. Dies deutet ebenso wie beim *p-tert*-Octylphenol und Daidzein auf eine extensive enterohepatische Zirkulation von Bisphenol A hin. Dies wird durch die Erkenntnisse anderer Studien (Pottenger et al. 2000; Yokota et al. 1999) unterstützt, denen zufolge die Glucuronidierung der Hauptpfad des Metabolismus von Bisphenol A in Ratten ist. Die Sulfatierung erfolgt in geringerem Umfang. Es wurden zwar im Rahmen dieses Projektes keine Galleproben nach Bisphenol A-Applikation gewonnen und untersucht, jedoch sprechen die genannten Erkenntnisse anderer Studien und der mehrgipflige Verlauf der Konzentrations-Zeit-Verläufe nach oraler Gabe für eine primäre Ausscheidung der BPA-Konjugate über die Galle. Dies paßt ähnlich wie beim *p-tert*-Octylphenol und Daidzein zu den Molekulargewichten der Bisphenol A-Konjugate (403 Da für Glucuronide, 307 Da für Sulfate, 578 Da für Diglucuronide, 386 Da für Disulfate, 482 Da für Dikonjugat-Mischformen), welche alle über dem Wert von 300 Da liegen, ab dem bei Ratten die biliäre Exkretion dominiert (Nau 1994; s. Kap. 1.3 „Toxikokinetik“).

Als Folge der effektiven Glucuronidierung (Pottenger et al. 2000; Yokota et al. 1999) wird Bisphenol A nach intravenöser Gabe schnell aus dem Organismus eliminiert (s. Abb. 21), so daß die Plasmaspiegel bereits 2 h nach der Applikation niedrig sind. Aus den Plasma-Konzentrationsdaten und mit Hilfe des Dreikompartimenten-Modells läßt sich für die Eliminationsphase eine terminale Halbwertszeit von ca. 39 h berechnen. In allen Dosis-Gruppen wurde nach 48 h die analytische Nachweisgrenze von Bisphenol A erreicht.

Die toxikologische Aussagekraft eines einzelnen Wertes für die Eliminations-Halbwertzeit sollte jedoch nicht überbewertet werden, da die Plasmaspiegel selbst nach Verabreichung sehr hoher Dosen von Bisphenol A innnerhalb weniger Stunden auf sehr niedrige Werte absinken, deren Östrogenität als marginal zu bezeichnen ist.

Die BPA-Elimination ist nach Pottenger et al. (2000) bei weiblichen Ratten im Vergleich zu männlichen Ratten langsamer. Die hieraus resultierenden höheren BPA-Spiegel lassen eine potentielle Akkumulation bei weiblichen Ratten eher möglich erscheinen, so daß sie in dieser Hinsicht das sensitivere Versuchstier sind.
Die Toxikokinetik von BPA in weiblichen DA/Han-Ratten spricht für die Hypothese einer schnellen Elimination über die Leber ("first pass"-Effekt) und einer effizienten metabolischen Clearance. Erst bei sehr hohen Dosen (z. B. 100 mg/kg KG) dürfte es zur Bioakkumulation kommen, wenn die Detoxifizierung (Phase II-Reaktionen) gesättigt ist. Beim Menschen ist dies bei den geringen Dosen durch Exposition gegenüber Bisphenol A nicht zu befürchten.
Im Rahmen des Verbundprojektes zeigte sich auch, daß Bisphenol A nur bei sehr hohen Dosen typische östrogene Effekte wie Uteruswachstum verursacht. Solche Dosen liegen weit oberhalb der Mengen, die der Mensch aufnimmt (ca. 1 µg/kg KG; s. Kap. 1.6).

4.4 Toxikokinetik von Daidzein

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen dienten der Etablierung von grundlegenden toxikokinetischen Parametern für Daidzein in weiblichen DA/Han-Ratten, da dieser Rattenstamm bereits in anderen Studien Verwendung fand (Deerberg et al. 1985; Vollmer und Schneider 1996).
Das Phytoöstrogen Daidzein besitzt eine schwache östrogene Wirkung. Diese ist bezogen auf die Ligandenbindung zum Östrogenrezeptor (ER) und der *in vitro*-Induktion zur Transkription von östrogen-regulierten Genen ungefähr 1/1000 der Wirksamkeit von Östradiol (Markiewicz et al 1993; Miksicek 1994; Hopert et al. 1998). Die Bindungsaffinität von Daidzein zu beiden ER-Subtypen ist vergleichbar, ebenso die relative Transaktivierungsaktivität für ER-α und ER-β (Kuiper et al. 1997, 1998). Daidzein stimuliert typische biologische Reaktionen wie Uteruswachstum nur bei relativ hohen Dosen. Bei Mäusen z. B. liegt die ED_{50} für Daidzein nach *p.o.*-Gabe ca. 7000 mal höher als bei Östron und ca. 100 000 mal höher als bei DES (Bickoff et al. 1962).
Daidzein wird schnell aus dem Kreislauf eliminiert. Die terminale Halbwertszeit wurde unter Verwendung des Plasmakonzentrations-Zeitverlaufes nach *i.v.*-Applikation von

10 mg/kg KG (s. Abb. 26) und des Dreikompartimenten-Modells berechnet und beträgt 4,2 h. Dieser Wert ist sehr ähnlich zu Halbwertszeiten, die in anderen Studien ermittelt wurden (s. Tab. 18); Genistein bei der Maus (4,7 h; Supko und Malspeis 1995), Genistein und Daidzein beim Menschen (5,7 h und 4,7 h; King und Bursill 1998; 8,4 h und 5,8 h; Watanabe et al. 1998).

Ebenso wie die Plasmaspiegel des freien Daidzeins nimmt auch die Konzentration der Konjugate (Glucuronide und Sulfate) nach *i.v.*-Gabe schnell ab (s. Abb. 26). Konjugate sind ebenso wie beim *p-tert*-Octylphenol und Bisphenol A die Hauptmetabolite, auch nach Verabreichung von Daidzein per Schlundsonde. Dies zeigt einen effizienten Phase-II-Metabolismus für Isoflavone in weiblichen DA/Han-Ratten.

Ähnlich wie beim *p-tert*-Octylphenol und Bisphenol A resultiert auch hier eine zehnfach höhere Dosis bei oraler Applikation nicht in einem proportionalem Anstieg der Daidzein-Plasmaspiegel um denselben Faktor 10 (vgl. Datensätze der Abbildungen 27a, 27b, 28a u. 28b). Es wurden anhand der Flächen unter den Plasmakonzentrations-Zeitkurven (AUCs) folgende systemische Bioverfügbarkeiten für freies Daidzein berechnet: 9,7 % nach oraler Applikation von 10 mg/kg KG und 2,2 % nach oraler Verabreichung von 100 mg/kg KG. Die Ursache dieser scheinbar dosis-abhängigen Absorptionsprozesse kann sowohl in einer komplexen Kinetik liegen (enterohepatische Zirkulation, s. unten), als auch z. T. in Löslichkeitsproblemen der verabreichten Aglycone. Das Applikationsmedium DMSO, mit dem das Daidzein zugeführt wird, kann wahrscheinlich nicht verhindern, daß ein Teil des gelösten Daidzeins -besonders bei hoher Dosis- durch das wäßrige und saure Milieu des Gastrointestinaltraktes präzipitiert. Diese Vermutung wird durch eine Studie gestützt, bei der mehrere Stunden nach oraler Gabe von 50 und 500 mg/kg KG noch erhebliche Mengen unveränderten Daidzeins im Gastrointestinaltrakt von Ratten gefunden wurde (Yueh und Chu 1977).

Die vorliegenden Daten zeigen einen auffälligen, mehrgipfligen Verlauf der Daidzein-Plasmaspiegel nach oraler Verabreichung. Dies deutet ebenso wie beim *p-tert*-Octylphenol und Bisphenol A auf eine extensive enterohepatische Zirkulation von Daidzein hin (Abbildungen 27a, 27b, 28a u. 28b). Solche mehrfachen Peaks *nach* dem ersten Maximum der jeweiligen Plasmaspiegel wurden auch nach extravaskulären Verabreichungen (*i.p.* / *p.o.*) von Genistein bei Nagern (Supko und Malspeis 1995) und nach oraler Aufnahme von soja- bzw. isoflavonhaltiger Nahrung beim Menschen beobachtet (Watanabe et al. 1998; Franke et al. 1998a; Setchell 1998). Die entero-

hepatische Zirkulation ist ein typisches Merkmal und eine bekannte Eigenschaft von oral verabreichten Östrogenen, sowohl beim Tier (Löffler und Bolt 1980) als auch beim Menschen (Back et al. 1980).
Wie auch bei vorangegangenen Studien mit anderen Rattenstämmen (Yueh und Chu 1977; Yasuda et al. 1994; King 1998) wird Daidzein hier in DA/Han-Ratten effizient zu Glucuroniden und Sulfaten metabolisiert. Daidzein-Konjugate werden primär mit der Galle ausgeschieden. Dies ließ sich mit Galleproben nachweisen, welche mit Hilfe einer Gallenfistel gewonnen wurden. Innerhalb von 8 h nach *i.p.*-Gabe von 10 mg/kg KG wurden etwa 27 % der applizierten Dosis kumulativ eliminiert (s. Abb. 31). Diese Beobachtung paßt zu den Molekulargewichten der Daidzein-Konjugate (429 Da für Glucuronide, 333 Da für Sulfate, 604 Da für Diglucuronide, 412 Da für Disulfate, 508 Da für Dikonjugat-Mischformen), welche alle deutlich über dem Wert von 300 Da liegen, ab dem bei Ratten die biliäre Exkretion dominiert (Nau 1994). Beim Menschen liegt das Molekulargewicht, bis zu dem die Ausscheidung von konjugierten Verbindungen hauptsächlich über den Urin erfolgt, bei ca. 475 Da (Nau 1994; s. Kap. 1.3 „Toxikokinetik“). Daher sollte die enterohepatische Zirkulation auch beim Menschen eine Rolle für Daidzein- (und Genistein-) Konjugate spielen. Weitere Beweise für eine enterohepatische Zirkulation von Isoflavonen liefern Kinetikstudien mit Genistein in Ratten (Barnes et al. 1996; Sfakianos et al. 1997) und beim Menschen nach Aufnahme von sojahaltigen Mahlzeiten (Franke et al. 1998a+b; Setchell 1998; Watanabe et al. 1998; Zava et al. 1998).

Equol ist ein Daidzein-Metabolit, der beim Menschen und beim Tier (z. B. Ratte) durch Darmbakterien gebildet wird (Axelson et al. 1984; King 1998). Mehrere Chromatogramme von Galleproben, aber auch von Plasma- und Gewebeproben, weisen auf die Anwesenheit von Equol hin. Jedoch erlaubte die geringe Sensitivität bei der Detektion von Equol mittels ESI-MS bei den meisten Proben keine zuverlässige Identifikation oder Quantifizierung.

Insgesamt passen die in dieser Arbeit erhobenen toxikokinetischen Daten für Daidzein in weiblichen DA/Han-Ratten zu den Resultaten mit anderen Nagermodellen (s. Tab. 18 u. 19). Ein extensiver Lebermetabolismus resultiert in einer relativ geringen oralen Bioverfügbarkeit dieser Verbindung. Daidzein (und das verwandte Isoflavon Genistein) wird schnell ausgeschieden, wobei die terminale Halbwertszeit

der Eliminationsphase ca. 4 - 6 h (bzw. 5 - 9 h beim Genistein) beträgt. Dies ist im Vergleich zu anderen endokrin wirksamen Substanzen (s. Tab. 18, unterster Block) kurz, zumal die oben diskutierten Beweise für eine enterohepatische Zirkulation vorliegen.
Es scheint partiell zur Aufnahme und Einlagerung von Daidzein und seinen Metaboliten in bestimmte Gewebe zu kommen. So waren die Daidzein-Konzentrationen 32 - 48 h nach Applikation in der Leber und Niere teilweise höher als im Plasma (s. Abb. 30). Solche Erkenntnisse sind für eine toxikologische Risokoabschätzung relevant, da sie helfen, Unterschiede in der relativen hormonellen Potenz *in vitro* und *in vivo* besser zu verstehen (Bolt et al. 1998; Bolt et al. 2001).

4.5 Zusammenfassung der toxikokinetischen Parameter und Literaturvergleich

In den Tabellen 18 und 19 sind die in dieser Arbeit erhobenen und beschriebenen toxikokinetischen Daten zusamengefaßt und werden den Daten aus anderen Studien gegenübergestellt. Der Vergleich zeigt, daß die eigenen Daten zu den Resultaten anderer Nagermodelle bzw. Studien passen (Details s. in den vorangegangenen Kapiteln der Diskussion).

Tab. 18: Biologische Halbwertszeiten endokrin wirksamer Substanzen

Substanz	Spezies	Kompartiment	terminale Halbwertszeit	Literatur
Octylphenol	**DA/Han-Ratte (♀)**	**Blut**	**36,1 h**	**Upmeier et al. 1999**
Octylphenol	Wistar-Ratte (♂)	Blut	5,2 h	Certa et al. 1996
Bisphenol A	**DA/Han-Ratte (♀)**	**Plasma**	**38,5 h**	**Upmeier et al. 2000**
Bisphenol A	Ratte (♀,♂)	Blut	≈ 40 h	Dekant 1998
Daidzein	**DA/Han-Ratte (♀)**	**Plasma**	**4,2 h**	**Janning et al. 2000**
Daidzein	Ratte	Serum	5,8 h	Watanabe et al. 1998
Daidzein	Mensch	Serum	4,7 h	King & Bursill 1998
Genistein	Mensch	Serum	5,7 h	King & Bursill 1998
Genistein	Ratte	Serum	8,8 h	King et al. 1996
Genistein	Ratte	Serum	8,4 h	Watanabe et al. 1998
Genistein	Maus	Serum	4,7 h	Supko und Malspeis 1995
TCDD	Mensch	Blut	7,2 a; 7,6 a	Flesch-Janys et al. 1996; Michalek und Tripathi 1999
TCDD	Ratte	Leber	35 d	van den Berg et al. 1994
PCBs*	Rhesusaffe (♀)	Blut	0,3 - 7,6 a	Mes et al. 1995
p,p'-DDE	Ratte	multiple	80 - 120 d	Muhlebach et al. 1991
Östradiol	Mensch	Blut	4 h	Ginsberg et al. 1995

* hier = Arochlor 1254 (Gemisch aus 30 Kongeneren)
im Fettdruck: in der vorliegenden Dissertation dargestellte Studien

Der letzte Block der Tabelle 18 zeigt zum Vergleich sowohl typische terminale Halbwertszeiten von polychlorierten organischen Schadstoffen als auch das natürliche Steroid Östradiol.

Tab. 19: Bioverfügbarkeiten endokrin wirksamer Substanzen

Substanz	Spezies	Bioverfügbarkeit (Dosis 1)	Bioverfügbarkeit (Dosis 2)	Literatur
Octylphenol	**DA/Han-Ratte (♀)**	**12,3 % (50 mg/kg KG *p.o.*)**	**8,4 % (200 mg/kg KG *p.o.*)**	**Upmeier et al. 1999**
Octylphenol	Wistar-Ratte (♂)	2 % (50 mg/kg KG *p.o.*)	10 % (200 mg/kg KG *p.o.*)	Certa et al. 1996
Bisphenol A	**DA/Han-Ratte (♀)**	**16,4 % (10 mg/kg KG *p.o.*)**	**5,6 % (100 mg/kg KG *p.o.*)**	**Upmeier et al. 2000**
Bisphenol A	Fischer 344 Ratte (♀,♂)	*i.p.* > *s.c.* > *p.o.* ♀ > ♂ (10 mg/kg KG)	*i.p.* > *s.c.* > *p.o.* ♀ > ♂ (100 mg/kg KG)	Pottenger et al. 2000*
Daidzein	**DA/Han-Ratte (♀)**	**9,7 % (10 mg/kg KG *p.o.*)**	**2,2 % (100 mg/kg KG *p.o.*)**	**Janning et al. 2000**

* Vergleich der relativen Bioverfügbarkeiten bei verschiedenen Applikationsrouten
im Fettdruck: in der vorliegenden Dissertation dargestellte Studien

4.6 Ausblick

Weitergehende experimentelle Studien sollten die bekannten Mechanismen und Regulationen der endogenen Hormonwirkungen berücksichtigen, insbesondere auch während der embryonalen, fötalen und perinatalen Entwicklungsphasen. Dabei müßte die quantitative Bewertung der Exposition gegenüber endokrin wirkenden Chemikalien und Phytoöstrogenen im Vergleich zu den endogenen Östrogenen besondere Berücksichtigung finden (BUA 1999).

Angesichts der Vielzahl der zu testenden Substanzen sind weiterhin aussagefähige short-term- und *in-vitro*-Screening-Verfahren erforderlich. Eine abschließende Bewertung oder regulatorische Konsequenzen sind in der Regel jedoch nur auf der Basis von angemessenen *in-vivo*-Studien, die allein relevante Aussagen über Dosis-Wirkungsbeziehungen und damit über Wirkintensitäten im Vergleich zu endogenen Hormonen liefern, gerechtfertigt (BUA 1999 und dort zitierte Literatur).

Die in dieser Arbeit erhobenen toxikokinetischen Daten wurden im Rahmen des Verbundprojektes (s. Kap. 1.4) mit den Ergebnissen der Projektpartner zusammengefaßt und übergreifend diskutiert.
In einem neuen Konzept sind Expositions- und *in-vivo*-Wirkdaten inzwischen für Einzelstoffe zusammengeführt worden, die vergleichende Betrachtungen für Phytoöstrogene und Industriechemikalien erlauben (Bolt et al. 2001).
Ein Ziel ist es, diesen Bewertungsansatz in der Zukunft weiter zu verfeinern: Dabei sollen in geeigneter Weise auch Kombinationswirkungen berücksichtigt werden und sensitive Parameter der Bioassays einen Vergleich relativer Wirkstärken *in vivo* optimieren helfen.

Die gegenwärtigen Forschungsanstrengungen zu Xenoöstrogen-Wirkungen sind sowohl auf nationaler als auch auf internationaler Ebene erheblich. So werden in Deutschland Forschungsvorhaben von den Bundesministerien für Umwelt sowie Bildung und Forschung, von verschiedenen Bundesländern und vom „Verband der Chemischen Industrie“ (VCI) gefördert. International laufen Aktivitäten bei der „Europäischen Union“ (EU), der „Environmental Protection Agency“ der USA (US EPA), der „World Health Organization“ (WHO), bei den Industrieverbänden „European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals“ (ECETOC), „Conseil Européen des Fédération de l’Industrie Chimique“ (CEFIC) und beim „Chemical Industry Institute of Toxicology“ (CIIT) in den USA (VCI 1997; BUA 1999).

5 Zusammenfassung

Toxikologische Wirkungen sogenannter „Xenoöstrogene” sind Gegenstand intensiver Diskussionen unter Fachleuten der Wissenschaft und in der Öffentlichkeit.
Es besteht hierbei prinzipiell Einigkeit darüber, daß solche Stoffe in hohen Dosen in endokrine Regelkreise eingreifen können und entwicklungsbiologische, reproduktionsbiologische und onkologische Effekte verursachen können („Potential”). Kontrovers diskutiert wird jedoch die Frage, welche tatsächlichen Gefährdungen unter realistischen Expositionsszenarios von solchen Stoffen ausgehen („Potenz”). Dies hängt damit zusammen, daß eine Risikobewertung in Bezug auf sehr komplexe Systeme wie das endokrine System schwierig ist.
In der *in vivo*-Situation ist für die relative biologische Wirksamkeit aufgenommener Stoffe neben deren Rezeptoraffinität ihre Toxikokinetik entscheidend, die durch eine Reihe von Faktoren (Resorption, Serum-Proteinbindung, Verstoffwechslung, Akkumulationsverhalten) bestimmt wird. Daher sind Tierversuche unverzichtbar, die diese *in vivo*-Aspekte mit einbeziehen.
Um grundlegende toxikokinetische Parameter zu generieren, wurden zunächst analytische Verfahren zur Bestimmung der ausgewählten Xenoöstrogene in biologischem Material etabliert bzw. optimiert.

Aus den experimentellen Untersuchungen resultierten folgende Ergebnisse:
In weiblichen DA/Han Ratten wurde nach Einmalgabe *i.v.* und *p.o.* die Toxikokinetik von *p-tert*-Octylphenol, Bisphenol A und Daidzein untersucht. Aus den Konzentrations-Zeit-Verläufen im Blut nach *i.v.*-Applikation wurden terminale Halbwertszeiten der Stoffe berechnet: für die beiden Industriechemikalien lagen diese bei ca. 36 h (*p-tert*-Octylphenol) und ca. 39 h (Bisphenol A), für das Phytoöstrogen bei ca. 4 h (Daidzein). Nach oraler Gabe unterschiedlich hoher Dosen fand sich für alle Stoffe nur eine begrenzte Bioverfügbarkeit: im Bereich von 10 - 16 % für die niedrigere Dosis (10 bzw. 50 mg/kg Körpergewicht) bzw. zwischen 2 - 8 % für die höhere Dosis (100 bzw. 200 mg/kg Körpergewicht). Die Blutspiegelkurven für freies *p-tert*-Octylphenol, Bisphenol A und Daidzein zeigen mehrgipflige Verläufe, die mit einer enterohepatischen Rezirkulation der Substanzen in Verbindung gebracht werden. Die Substanzen unterliegen alle einem ausgeprägten *first-pass*-Effekt und werden im Zuge des Phase-II-Metabolismus zu Glucuroniden und Sulfaten umgesetzt. Separate

Experimente zeigen ferner, daß *p-tert*-Octylphenol und Daidzein bzw. deren Konjugate in erheblichem Umfang über die Galle ausgeschieden werden.
Post mortem-Analysen in verschiedenen Geweben zeigen, daß sich Daidzein offenbar in Leber und Niere anreichern kann, da die zu diesem Zeitpunkt gemessenen Gesamtspiegel (freie Substanz plus Konjugate) höher liegen als im Plasma. Bei entsprechenden Untersuchungen für Bisphenol A finden sich deutlich erhöhte Gesamtgehalte (freie Substanz plus Konjugate) bei der höchsten Dosisgruppe (100 mg/kg Körpergewicht *per os*) und dort v. a. im Lebergewebe; im Fett findet man erwartungsgemäß nur die freie, lipophilere Form. Befunde für *p-tert*-Octylphenol (freie und Gesamtspiegel) zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß ausgehend von den im Rahmen des Verbundprojektes ermittelten toxikokinetischen Befunden und Literaturdaten für keinen der Prüfstoffe eine ausgeprägte Bioakkumulation zu erwarten ist. Zum einen liegen die terminalen Eliminationshalbwertszeiten aller untersuchten Substanzen unter 40 Stunden (zum Vergleich: für DDT-Metabolite liegen diese z. B. im Bereich von mehreren Monaten), zum anderen ist bei den erwarteten Expositionen gegenüber Bisphenol A und *p*-Alkylphenolen keine Sättigung des für die Elimination wesentlichen Phase-II-Metabolismus beim Menschen zu befürchten. Die toxikokinetischen Daten erklären auch weitgehend die Unterschiede zwischen der *in vitro* bestimmten relativen östrogenen Potenz der Substanzen und davon abweichende *in vivo* ermittelte relative Wirkstärken.
Diese Befunde fließen neben anderen als essentielle Elemente in ein Risikobewertungsmodell ein, das vergleichende Betrachtungen für Phytoöstrogene und Industriechemikalien als exogene Belastungen erlaubt (Bolt et al. 2001).

Alle Ergebnisse der hier vorgestellten Studien zur Kinetik von *p-tert*-Octylphenol, Bisphenol A und Daidzein nach Einmalapplikation an weibliche DA/Han-Ratten sind bereits auf diversen Kongressen vorgestellt und inzwischen als Originalarbeiten publiziert worden (s. „Wissenschaftliche Publikationen“, Kap. 8).

6 Literaturverzeichnis

Adlercreutz H (1992) Is genistein the key to soy's success? The Lancet 16 (339): 1233

Adlercreutz H (1995) Phyto-estrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. Environ Health Perspect 103 [Suppl 7]: 103-112

Adlercreutz H (1998) Epidemiology of phytoestrogens. Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism 12 (4): 605-623

Adlercreutz H (1998) Human health and phytoestrogens. In: Korach K (ed) Reproductive and developmental toxicology. Dekker, New York: 299-371

Adlercreutz H, Mousavi Y, Clark J (1992) Dietary phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo study. J Steroid Biochem Molec Biol 41 (3-8): 331-337

Adlercreutz H, Honjo H, Higashi A (1991) Urinary excretion of lignans and iso-flavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. Am J Clin Nutr 54: 1093-1100

Albertazzi P, Pansini F, Bonaccorsi G (1998) The effect of dietary supplementation on hot flushes. Obstetrics & Gynecology 91: 6-10

Altwein JE (1997) Mit Phytoöstrogenen gegen den Krebs. Deutsche Apotheker Zeitung 51/52: 25-28

Anderson JW (1995) Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. New Engl J of Medicine, Aug: 276-282

Arenholt-Bindslev D, Breinholt V, Preiss A, Schmalz G (1999) Time-related bisphenol-A content and estrogenic activity in saliva samples collected in relation tp placement of fissure sealants. Clin Oral Invest 3: 120-125

Arjmandi B, Alekel L, Hollis B (1996) Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. J Nutr 126: 161-167

Ashby J, Houthoff E, Kennedy SJ, Stevens J, Bars R, Jekat FW, Campbell P, van Miller J, Carpanini FM, Randall GLP (1997) The challenge posed by endocrine-disrupting chemicals. Environ Health Perspect 105: 164-169

Ashby J, Tinwell H, Haseman J (1999) Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF-1 mice exposed in utero. Regul Toxicol Pharmacol 30: 156-166

Axelson M, Sjövall J, Gustafsson BE, Setchell KDR (1984) Soya - a dietary source of the nonsteroidal estrogen equol in man and animals. J Endocr 102: 49-56

Back DJ, Bolt HM, Breckenridge AM, Crawford FE, Orme MLE, Rowe PH, Schindler AE (1980) The pharmacokinetics of a large (3 mg) oral dose of ethinylestradiol in women. Contraception 21: 145-153

Baker ME (1995) Endocrine activity of plant-derived compounds: an evolutionary perspective. Proc Soc Exp Biol Med 208, 1: 131-138

Barnes S, Sfakianos J, Coward L, Kirk M (1996) Soy isoflavonoids and cancer prevention. Adv Exp Med Biol 401: 87-100

Barrett J (1996) Phytoestrogens. Friends or foes? Environ Health Perspect 104: 478-482

Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) (1988) Nonylphenol. BUA-Stoffbericht 13, S. Hirzel Verlag, Stuttgart

Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) (1997) Bisphenol A (2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)propan). BUA-Stoffbericht 203, S. Hirzel Verlag, Stuttgart

Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) (1999) Biologische Bedeutung synthetischer und natürlicher endokrin wirkender Stoffe - Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit. BUA-Stoffbericht 212, S. Hirzel Verlag, Stuttgart

Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) (2000) Genistein - Modellstoff zur Beschreibung endokriner Wirkungen von Phytoöstrogenen. BUA-Stoffbericht 222, S. Hirzel Verlag, Stuttgart

Bergeron RM, Thompson TB, Leonard LS, Pluta L, Gaido KW (1999) Estrogenicity of bisphenol A in a human endometrial cell line. Mol Cell Endocrinol 150: 179-187

Bickoff EM, Livingston AL, Hendrickson AP, Booth AN (1962) Relative potencies of several estrogen-like compounds found in forages. Agric Food Chem 10: 410-412

Bingham SA, Atkinson C, Liggins J, Bluck L, Coward A (1998) Phyto-oestrogens: where are we now? Br J Nutr 79: 393-406

Boettger-Tong H, Murthy L, Chiapetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Mäkelä S (1998) A case of laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on in vivo responses to exogenously administered estrogens. Environm Health Perspect 106: 369-373

Bogh IB, Christensen P, Dantzer V, Groot M, Thofner IC, Rasmussen RK, Schmidt M, Greve T (2001) Endocrine disrupting compounds: effect of octylphenol on reproduction over three generations. Theriogenology 55 (1): 131-150

Bolt HM (1980) Drug interaction involving oral contraceptives. Rev Drug Metab Drug Interact 3: 31-45

Bolt HM (1998) Report of the EUROTOX symposium "Human and environmental risk assessment of existing chemicals" ICT VIII, Paris, July 8. EUROTOX Newsl 21: 77-79

Bolt HM, Janning P, Michna H, Degen GH (2001) Comparative assessment of endocrine modulators with oestrogenic activity: I. Definition of a hygiene-based margin of safety (HBMOS) for xeno-oestrogens against the background of European developments. Arch Toxicol 74: 649-662

Bolt HM, Schuhmacher US, Degen GH (1998) Special aspects of endocrine modulators in human and environmental risk assessment of existing chemicals. EUROTOX Newsl 21: 72-75

Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N (1995) Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. Environ Health Perspect 103 (6): 608-612

Brzezinski P (1999) Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? Europ J of obstetrics and gyneco 85: 47-51

Cagen SZ, Waechter JM Jr, Dimond SS, Breslin WJ, Butala JH, Jekat FW, Joiner RL, Shiotsuka RN, Veenstra GE Harris LR (1999a) Normal reproductive organ development in Wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water. Regul Toxicol Pharmacol 30: 130-139

Cagen SZ, Waechter JM Jr, Dimond SS, Breslin WJ, Butala JH, Jekat FW, Joiner RL, Shiotsuka RN, Veenstra GE, Harris LR (1999b) Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. Toxicol Sci 50: 36-44

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebæk NE (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. Brit Med J 305: 609-613

Cassidy A (1996) Physiological effects of phyto-estrogens in relation to cancer and other human health risks. Proc Nutr Soc 55: 399-417

Cassidy A, Bingham S, Setchell K (1994) Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of pre-menopausal women. Am J Nutr 60: 333-340

Certa H, Fedtke N, Wiegand HJ, Müller AMF, Bolt HM (1996) Toxicokinetics of *p-tert*-octylphenol in male Wistar rats. Arch Toxicol 71: 112-122

Chahoud I, Werner W, Faqi AS (1999) Determination and kinetics of bisphenol A in dams and fetuses after multiple dose exposure to pregnant rats (abstract). Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 359 [Suppl 3]: R169

Colburn T, Dumanoski D, Myers JP (1996) Our stolen future. Dutton/Penguin, New York, USA

Colburn T, vom Saal FS, Soto AM (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environ Health Perspect 101: 378-384

Coldham NG, Sivapathasundaram S, Dave M, Ashfield LA, Pottinger TG, Goodall C, Sauer MJ (1998) Biotransformation, tissue distribution, and persistence of 4-nonylphenol residues in juvenile rainbow trout. Drug Metab Dispos 26 (4): 347-354

Coward L, Kirk M, Albin N, Barnes S (1996) Analysis of plasma isoflavones by reversed-phase HPLC-multiple reaction ion monitoring-mass spectrometry. Clin Chim Acta 247: 121-142

Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL (1997) Special report on endocrine disruption. US EPA, Office of Research and Development. Washington, D.C. (EPA/630/R-96/012, Feb 1997)

Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, Wood WP, Anderson DG, Baetcke KP, Hoffmann JL, Morrow MS, Rodier DJ, Schaeffer JE, Touart LW, Zeeman MG, Patel YM (1998) Environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. Environ Health Perspect 106, Suppl 1: 11-56

Deerberg F, Rehm S, Rapp KG (1985) Survival data and age-associated spontaneous diseases in two strains of rats. In: Archibal J, Ditchfield J, Rowsell HC (eds) The contribution of laboratory animal science to the welfare of man and animals. Fischer, Stuttgart: 171-179

Degen GH, Bolt HM (2000) Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. Int Arch Occup Environ Health 73: 433-441

Degen GH, Foth H, Kahl R, Kappus H, Neumann HG, Oesch F, Schulte-Hermann R (1999) Hormonell aktive Substanzen in der Umwelt: Xeno-oestrogene - Stellungnahme der Beratungskommission in der Sektion Toxikologie der DGPT. DGPT-Forum 24: 30-36

Dekant (1998) Belastung des Menschen durch Phyto- und Xenoöstrogene am Beispiel von ausgewählten Substanzen. 1. Statusseminar der Bundesministerien für Bildung, Wissenschaft, Forschung & Technologie und Umwelt, Naturschutz & Reaktorsicherheit „Chemikalien in der Umwelt mit Wirkung auf das endokrine System" in Dresden 1998: 103

Derendorf H, Garett ER (1987) Pharmakokinetik: Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

Dermer OC (1977) Bisphenol A. In: McKetta JJ, Cunningham WA (eds) Encycl Chem Process. Dekker, New York: 406-430

Deutsche Forschungsgemeinschaft (1998) Hormonell aktive Stoffe in Lebensmitteln. Symposium/Kurzfassung. Wiley-VCH Verlag, Weinheim

Diel P, Schulz T, Smolnikar K, Strunck E, Vollmer G, Michna H (2000) The ability of xeno- and phytoestrogens to modulate the expression of estrogen sensitive genes in the rat uterus: estrogenicity profiles and uterotropic activity. J Steroid Biochem Mol Biol 73: 1-10

Diel P, Smolnikar K, Schulz T, Laudenbach U, Degen GH, Schuhmacher U, Bolt HM, Michna H (1998) Molecular and morphological analysis of the endocrine profile of the xenoestrogens bisphenol A, p-tert-octylphenol, o,p'-DDT and the phytoestrogen daidzein (abstract). Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 358 [Suppl 3]: R770

Doerffel K (1987) Statistik in der analytischen Chemie. Verlag Chemie, Weinheim.

Doerffel K, Geyer R und Müller H (1994) Analytikum. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig

Dwyer JT, Goldin BR, Saul N (1994) Tofu and soy drinks contain phytoestrogens. J Am Diet Assoc 94: 739-743

ERCCWG (Epoxy Resin Can Coating Work Group) (1998) Potential exposure to bisphenol A from epoxy can coatings. Inter-industry group on bisphenol A and alkyl phenols, The Society of the Plastics Industry, Inc (SPI)

European Union (1997) 4-Nonylphenol, branched nonylphenol. SIDS Initial Assessment Report for 6th SIAM

European Union (1999) Risk assessment of 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol. Human health effects. European Chemicals Bureau, Ispra, Italy

Fitzpatrick M (2000) Soy formulas and the effects of isoflavones on the thyroid. NZ Med J 113: 24-26

Flesch-Janys D, Becher H, Gurn P, Jung D, Konietzko J, Manz A, Papke O (1996) Elimination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in occupationally exposed persons. J Toxicol Environ Health 47: 363-378

Franke AA, Custer LJ, Cerna CM, Narala K (1995) Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine. Proc Soc Exp Biol Med 208: 18-26

Franke AA, Custer LJ, Tanaka Y (1998a) Isoflavones in human breast milk and other biological fluids. Am J Clin Nutr 68 [Suppl]: 1466S-1473S

Franke AA, Custer LJ, Wang W, Shi CY (1998b) HPLC analysis of isoflavonoids and other phenolic agents from foods and from human fluids. Proc Soc Exp Biol Med 217: 263-273

Fritsche S, Steinhart H (1999) Occurrence of hormonally active compounds in food: a review. Eur Food Res Technol 209: 153-179

Fung EY, Ewoldsen NO, Germain HA Jr, Marx DB, Miaw CL, Siew C, Chou HN, Gruninger SE, Meyer DM (2000) Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant. J Am Dent Assoc 131 (1): 51-58

Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Portier CJ, McDonnell DP (1997) Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. Toxicol Appl Pharmacol 143: 205-212

Gamache PH, Acworth IN (1998) Analysis of isoflavonoids and other phenolic agents in plasma, tissue, and urine using HPLC with coulometric array detection. Proc Soc Exp Biol Med 217: 274-280

Gambacciani M (1997) Ipriflavone prevents the loss of bone mass in pharmacological menopause induced by GnRH-agonists. Maturitas 28: 75-81

Gandrass J, Kurz J, Schmidt B, Zimmermann A (2001) Bioassay-directed chemical analysis - a case study of bisphenol A in the Elbe river. Second Status-Seminar "Endocrine Disruptors" April 2001 in Berlin: 91

Giger W, Brunner PH, Schaffner C (1984) 4-Nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. Science 225: 623-625

Ginsberg ES, Walsh BW, Shea BF, Gao X, Gleason RE, Barbieri RL (1995) The effect of ethanol on the clearance of estradiol in postmenopausal women. Fertil Steril 63: 1227-1230

Golden RJ, Noller KL, Titus-Ernstoff L, Kaufman RH, Mittendorf R, Stillman R, Reese EA (1998) Environmental endocrine modulators and human health: An assessment of the biological evidence. Crit Rev Toxicol 28: 109-227

Gould JC, Leonard LS, Maness SC, Wagner BL, Zacharewski T, Safe S, McDonell DP, Gaido KW (1998) Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. Mol Cell Endocrinol 142: 203-214

Greim H, Deml E (1996) Toxikologie - Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner. VCH Verlag, Weinheim.

Gülden M, Turan A, Seibert H (1997) Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. Umweltbundesamt Texte 46/97. Forschungsbericht 102 04 279; UBA-FB 97-068

Günther K (1998) Isomerenspezifische Ultraspurenanalytik von Nonylphenolen in umweltrelevanten Biomatrices. Tag der Tenside, Leipzig 1998. Fresenius J Anal Chem 216: M54-M55

Guillette LJ, Gross T, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR (1994) Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in florida. Environ Health Perspect 102: 680-688

Handelsman DJ (1997) Sperm output of healthy men in Australia: magnitude of bias due to self-selected volunteers. Hum Reprod 12 (12): 2701-2705

Harborne JB (1995) Ökologische Biochemie: Eine Einführung. Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Heemken O, Kuballa J, Stachel B (2001) Xenoestrogens in the river Elbe and its tributaries. Second Status-Seminar "Endocrine Disruptors" April 2001 in Berlin: 103

Herbst AL, Ulfelder H, Poskanzer DC (1971) Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal stibestrol therapy with tumor appearance in young women. N Engl J Med 284: 878-881

Holt S (1997) Phytoestrogens for a healthier menopause. Alternative & complementary therapies: 1-5

Holtey-Weber R (2000) Zur gesundheitlichen Relevanz von Xenoestrogenen in Wasser und in Lebensmitteln. GIT Labor-Fachzeitschrift 9: 1030-1031

Hopert AC, Beyer A, Frank K, Strunck E, Wünsche W, Vollmer G (1998) Characterization of estrogenicity of phytoestrogens in an endometrial-derived experimental model. Environ Health Perspect 106: 581-586

Howe SR, Borodinsky L (1998) Potential exposure to bisphenol A from food-contact use of polycarbonate resins. Food Addit Contam 15: 370-375

Howe SR, Borodinsky L, Lyon RS (1998) Potential exposure to bisphenol A from food-contact use of epoxy coated cans. J Coat Technol 70 (877): 69-74

Hübschmann HJ (1996) Handbuch der GC-MS. VCH-Verlag, Weinheim

Ingram D, Sanders K, Kolybaba M (1997) Case-control study of phyto-estrogens and breast cancer. Lancet 350: 971-972 & 990-994

Janning P, Schuhmacher US, Upmeier A, Diel P, Michna H, Degen GH, Bolt HM (2000) Toxicokinetics of the phytoestrogen daidzein in female DA/Han rats. Arch Toxicol 74: 421-430

Jekat FW (1998) Assessment of the oestrogenic activity of bisphenols. In: Eisenbrand G et al. (Hrsg.) Hormonally active agents in food. Symposium organized by the DFG Senate Commission on the Evaluation Food Safety. VCH-WILEY, Weinheim

Jennings R (1994) Bisphenol A producers expecting a resurgence. Chemical Marketing Reporter, June 20: 11

Jordan VC, Mittal S, Gosden B (1995) Structure activity relationships of estrogens. Environ Health Perspect 61: 97-110

King RA (1998) Daidzein conjugates are more bioavailable than genistein conjugates in rats. Am J Clin Nutr 68: 1496S-1499S

King RA, Broadbent JL, Head RJ (1996) Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats. J Nutr 126: 176-182

King RA, Bursill DB (1998) Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. Am J Clin Nutr 67: 867-872

Kirschner EM (1996) Growth of top 50 chemicals slowed in 1995 from very high 1994 rate. Chem Eng News 74 (15): 16-22

Knight D, Eden JA (1995) Phytoestrogens - a short review. Maturitas 22: 167-175

Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D (1993) Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. Endocrinology 132: 2279-2286

Kuiper GGJ, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β. Endocrinology 138: 863-870

Kuiper GGJ, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β. Endocrinology 139: 4252-4263

Kurzer M, Xu X (1997) Dietary phytoestrogens. Ann Rev Nutr 17: 353-381

Latscha HP, Klein HA (1984) Analytische Chemie, Chemie - Basiswissen III. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.

Laws SC, Carey SA, Ferrell JM, Bodman GJ, Cooper RL (2000) Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. Toxicol Sci 54: 154-167

Lewis SK, Lech JJ (1996) Uptake, disposition, and persistence of nonylphenol from water in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). Xenobiotica 26 (8): 813-819

Liggins J, Bluck LJ, Runswick S, Atkinson C, Coward WA, Bingham SA (2000) Daidzein and genistein contents of vegetables. Br J Nutr 84 (5): 717-725

Löffler S, Bolt HM (1980) Untersuchungen zum enterohepatischen Kreislauf von Östradiol und Äthinylöstradiol bei der Ratte. Arzneimittelforschung 30: 810-813

Lundh T (1995) Metabolism of estrogenic isoflavones in domestic animals. Proc Soc Exp Biol Med 208, 1: 33-39

Mäkelä S, Hyder SM, Stancel GM (1999) Environmental estrogens. In: Oettel M, Schillinger E (eds) Estrogens and antiestrogens. Springer, Berlin Heidelberg New York (Handbook of experimental pharmacology, vol 135/II): 613-663

Manabe A, Kaneko S, Numazawa S, Itoh K, Inoue M, Hisamitsu H, Sasa R, Yoshida T (2000) Detection of bisphenol-A in dental materials by gas chromatography-mass spectrometry. Dent Mater J 19 (1): 75-86

Markiewicz L, Garey J, Adlercreutz H, Gurpide E (1993) In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens. J Steroid Biochem Mol Biol 45: 399-405

Marquardt H, Schäfer SG (1994) Lehrbuch der Toxikologie. BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich

Mazur W (1998) Phytoestrogen content in foods. Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism 12 (4): 729-742

Mes J, Arnold DL, Bryce F (1995) Postmortem tissue levels of polychlorinated biphenyls in female rhesus monkeys after more than six years of daily dosing with arochlor 1254 and in their non-dosed offspring. Arch Environ Contam Toxicol 29: 69-76

Meyer VR (1996) Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern. Hüthig-Verlag, Heidelberg

Michalek JE, Tripathi RC (1999) Pharmakokinetics of TCDD in veterans of Operation Ranch Hand: 15 year follow up. J Toxicol Environ Health 57: 369-378

Miksicek RJ (1994) Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. J Steroid Biochem Mol Biol 49: 153-160

Molteni A, Brizio-Molteni L, Persky V (1995) In vitro hormonal effects of soybean isoflavones. J Nutr 125: 751S-756S

Müller AMF, Makropoulos V, Bolt HM (1995) Toxicological aspects of oestrogen-mimetic xenobiotics present in the environment. Toxicol Ecotoxicol News 2: 68-73

Müller S, Schlatter C (1998) Oestrogenic potency of nonylphenol - a case study to evaluate the relevance of human non-occupational exposure. Pure Appl Chem 70: 1847-1853

Müller S, Schmid P, Schlatter C (1998) Pharmacokinetic behaviour of 4-nonylphenol in humans. Environ Toxicol Pharmacol 5: 257-265

Mugford CA, Kedderis GL (1998) Sex-dependent metabolism of xenobiotics. Drug Metab Rev 30: 441-498

Muhlebach S, Moor MJ, Wyss PA, Bickel MH (1991) Kinetics of distribution and elimination of DDE in rats. Xenobiotica 21: 111-120

Murkies AL (1998) Clinical reviews 92. Phytoestrogens. JCEM 83: 297-299

Murkies AL, Lombard C, Strauss BJG (1995) Dietary flour supplementation decreases post-menopausal hot flushes: effect of soy and wheat. Maturitas 57 (7): 655-664

Murphy PA, Farmakalidis E, Johnson LD (1982) Isoflavone content of soya-based laboratory animal diets. Fd Chem Tox 30: 315-317

Nakamura Y, Tsuji S, Tonogai Y (2000) Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. J AOAC Int 83 (3): 635-650

Nau (1994) Toxikokinetik. In: Marquardt H, Schäfer SG (eds) Lehrbuch der Toxikologie. BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim: 49

Nimrod AC, Benson WH (1996) Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. Crit Rev Toxicol 26: 335-364

North K, Golding J, the ALSPAC Study Team (2000) A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. BJU Int 85: 107-113

Odum J, Pyrah ITG, Foster JR (1999) Comparative activities of *p*-nonylphenol and diethylstilbestrol in Noble rat mammary gland and uterotrophic assays. Reg Toxicol Pharmacol 29: 184-195

Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C (1996) Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. Environ Health Perspect 104 (3): 298-315

Otto M (1995) Analytische Chemie. Verlag Chemie, Weinheim

Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ, Waechter JM Jr (2000) The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. Toxicol Sci 54: 3-18

Rasmussen PE, Erb K, Westergaard LG, Laursen SB (1997) No evidence for decreasing semen quality in four birth cohorts of 1.055 Danish men born between 1950 and 1970. Fertil Steril 68 (8): 1059-1064

Reinli K, Block G (1996) Phytoestrogen content of foods - a compendium of literature values. Nutr Cancer 26: 123-148

Roche Lexikon Medizin (1987). Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore

Safe SH (1995) Environmental and dietary estrogens and human health: Is there a problem? Environ Health Perspect 103: 346-351

Santell RC, Chang YC, Nair MG, Helferich WG (1997) Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. J Nutr 127: 263-269

Schafer TE, Lapp CA, Hanes CM, Lewis JB, Wataha JC, Schuster GS (1999) Estrogenicity of bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate in vitro. J Biomed Mater Res 45: 192-197

Schäfer WR, Zahradnik HP, Fijus-Plessner N, Schneider K (1996) Anthropogene Substanzen mit unerwünschter Östrogenwirkung. Umweltmed 1: 35-42

Schröder E (1991) Massenspektrometrie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo

Schuhmacher US, Upmeier A, Michna H, Diel P, Smolnikar K, Laudenbach U, Bolt HM, Degen GH (1999) Toxicokinetics of the phytoestrogen daidzein in female DA/Han rats after single application (abstract). Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 359 [Suppl 3]: R158

Schwedt G (1996) Taschenatlas der Analytik. Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Setchell KDR (1998) Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. Am J Clin Nutr 68 [Suppl]: 1333S-1346S

Setchell KDR, Cassidy A (1999) Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. J Nutr 129: 758S-767S

Setchell KDR, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubl JE (1997) Exposure of infants to phytoestrogens from soy-based infant formula. Lancet 350: 23-27

Sfakianos J, Coward L, Kirk M, Barnes S (1997) Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. J Nutr 127: 1260-1268

Sharpe RM, Skakkebæk NE (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproduction tract? Lancet 341: 1392-1395

Sonnenschein C, Soto AM, Fernandez MF, Olea N, Olea-Serrano MF, Ruiz-Lopez MD (1995) Developement of a marker of estrogenic exposure in human serum. Clin Chem 41: 1888-1895

Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C (1991) *p*-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from “modified“ polystyrene. Environ Health Perspect 92: 167-173

Spindler KD (1997) Vergleichende Endokrinologie - Regulation und Mechanismen. Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Stachel B, Heemken OP, Lepom P, Sawal G, Reincke H, Theobald N (2001) The occurrence of industrial chemicals in river waters. Second Status-Seminar "Endocrine Disruptors" April 2001 in Berlin: 25

Stephanou E, Giger W (1982) Persistant organic chemicals in sewage effluents 2. quantitative determinations of nonylphenols and nonylphenol ethoxylates by glass capillary gas chromatography. Environ Sci Technol 16: 800-805

Stropp G (2000) Hormonähnliche Wirkungen von Chemikalien - eine aktuelle Diskussion in der Toxikologie. BIOforum 9: 584-586

Supko JG, Malspeis L (1995) Plasma pharmacokinetics of genistein in mice. Int J Oncol 7: 847-854

Tham DM, Gardner CD, Haskell WL (1998) Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. J Clin Endocrinol Metab 83 (7): 2223-2235

Thigpen JE, Setchell KDR, Goelz M, Forsythe DB (1999) The phyto-estrogen content of rodent diets. Environm Health Perspect 107: A182-A183

Tyl RW, Meyer CB, Marr MC, Brine DR, Fail PA, Seely JC, van Miller JP (1999) Two-generation reproduction study with para-tert-octylphenol in rats. Regul Toxicol Pharmacol 30 (2Pt1): 81-95

Uehar M, Arai Y, Watanabe S, Adlercreutz H (2000) Comparison of plasma and urinary phytoestrogens in Japanese and Finnish women by time-resolved fluoro-immunoassay. Biofactors 12 (1-4): 217-225

Upmeier A, Certa H, Ebert R (1997) Bioavailability and toxicokinetics of octylphenol pt in female DA rats after single gavage application compared to single intravenous injection. Study Protocol VCI-97/0227, Toxikologie, Hüls AG

Upmeier A, Degen GH, Schuhmacher US, Certa H, Bolt HM (1999) Toxicokinetics of *p-tert*-octylphenol in female DA/Han rats after single i.v. and oral application. Arch Toxicol 73: 217-222

Upmeier A, Degen GH, Diel P, Michna H, Bolt HM (2000) Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han rats after single i.v. and oral application. Arch Toxicol 74: 431-436

van den Berg M, De Jongh J, Poiger H, Olson JR (1994) The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. Crit Rev Toxicol 24: 1-74

VCI (Verband der Chemischen Industrie) (1998) Europäisches Forschungsprogramm zu endokrinen Stoffen gestartet. Chemie Report 5-6/1998: 10

Vollmer G, Schneider MR (1996) The rat endometrial adenocarcinoma cell line RUCA-I: a novel hormone-responsive in vivo/in vitro tumor model. J Steroid Biochem Mol Biol 58: 103-115

vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer K, Nagel SC, Parmigiani S, Welshons WV (1998) A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production and behavior. Toxicol Indust Health 14: 239-260

Vree TB, Timmer CJ (1998) Enterohepatic cycling and pharmacokinetics of oestradiol in postmenopausal women. J Pharm Pharmacol 50 (8): 857-864

Wähälä K, Hase T, Adlercreutz H (1995) Synthesis and labeling of isoflavone phytoestrogens, including daidzein and genistein. Proc Soc Exp Biol Med 208 (1): 27-32

Wakai K (1999) Dietary intake and sources of isoflavones among Japanese. Nutrition and cancer 33 (2): 139-145

Ward TJ, Boeri RL (1991) Bioconcentration test with nonylphenol and the fathead minnow, *pimephales promelas*. EnviroSystems Division Resource Analysts, Incorporated, Hampton, New Hampshire. EnvironSystems Study Number 8975-CMA: 72 pp

Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, Takahashi T, Miura T, Arai Y, Mazur W, Wähälä K, Adlercreutz H (1998) Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). J Nutr 128: 1710-1715

Weeks JA, Adams WJ, Guiney PD, Hall JF, Naylor CG (1996) Risk assessment of nonylphenol and ist ethoxylates in U.S. river water and sediment. Royal Soc Chem 189: 276-291

Whitten PL, Naftolin F (1992) Effects of a phytoestrogen diet on estrogen-dependent reproductive processes in immature female rats. Steroids: 57-61

Whitten PL, Lewis C, Russel E (1995) Potential adverse effects of phytoestrogens. J Nutr 3: 771S-776S

Wingeder RJ, Niketas P, Switala CK (1998) Developement of methods for the determination of bisphenol A in food stimulants. J Coat Technol 70 (877): 75-82

Yasuda T, Kano Y, Saito K, Ohsawa K (1994) Urinary and biliary metabolites of daidzin and daidzein in rats. Biol Pharm Bull 17: 1369-1374

Yasuda T, Mizunuma S, Kano Y, Saito K, Ohsawa K (1996) Urinary and biliary metabolites of genistein in rats. Biol Pharm Bull 19: 413-417

Yokota H, Iwano H, Endo M, Kobayashi T, Inoue H, Ikushiro S, Yuasa A (1999) Glucuronidation of the environmental estrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. Biochem J 340: 405-409

Yueh TL, Chu HY (1977) The metabolic fate of daidzein. Sci Sin 20: 513-521

Zacharewski T (1997) In vitro bioassays for assessing estrogenic substances. Environ Sci Technol 31: 613-623

Zava DT, Dollbaum CM, Blen M (1998) Estrogen and progestin bioactivity of foods, herbs, and spices. Proc Soc Exp Biol Med 217: 369-378

7 Lebenslauf

Name:	Andreas Upmeier
Geburtsdatum:	16. November 1968
Geburtsort:	Dortmund
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Bildungsweg:

08/1975 - 07/1979	Osterfeld-Grundschule in Unna-Mühlhausen
09/1979 - 06/1988	Pestalozzi-Gymnasium in Unna
06/1988	Abitur
10/1988 - 11/1995	Studium der Chemie an der Universität Dortmund
09/1991 - 11/1992	Zivildienst am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund
01/1995 - 08/1995	Diplomarbeit am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. A. C. Broekaert und Herrn Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt
11/1995	Abschluß als Diplom-Chemiker
10/1995 - 12/1995	studentische Hilfskraft am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund
01/1996 - 03/1997	wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund
05/1997	Beginn der Dissertation am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt
10/1997	Aufnahme als Kollegiat in das Graduiertenkolleg „Toxikologie und Umwelthygiene“ der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
05/1997 - 08/1998	experimentelle Teile der Dissertation in der Toxikologie der HÜLS AG in Marl
05/1997 - 05/2000	wissenschaftlicher Mitarbeiter im Projekt „Grundlagen und Mechanismen reproduktionstoxischer Stoffwirkungen“ am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund

8 Wissenschaftliche Publikationen

Certa H, Fedtke N, Wiegand HJ, Kocher K, Schuhmacher US, Upmeier A, and Bolt HM (1998) Toxicokinetics of *p-tert*-octylphenol in male and female rats. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Supplement to Volume 357 No 4: R 138, Abstract 539

Upmeier A, Schuhmacher US, Certa H, Bolt HM, and Degen GH (1998) Blood-levels of *p-tert*-octylphenol in female DA/Han rats after single application. Toxicology Letters, Supplement 1/95: 206-207

Schuhmacher US, Upmeier A, Michna H, Diel P, Smolnikar K, Laudenbach U, Bolt HM, and Degen GH (1999) Toxicokinetics of the phytoestrogen daidzein in female DA/Han-rats after single application. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Supplement to Volume 359 No 3: R158, Abstract 617

Upmeier A, Degen GH, Schuhmacher US, Certa H, Bolt HM (1999) Toxicokinetics of *p-tert*-octylphenol in female DA/Han rats after single i.v. and oral application. Archives of Toxicology 73: 217-222

Upmeier A, Bolt HM, and Degen GH (1999) Plasma-levels of bisphenol A in female DA/Han rats after single application. 10th EUROTOX Training & Discussion Session, Dec 16, Dortmund (Poster)

Upmeier A, Michna H, Diel P, Laudenbach U, Bolt HM, and Degen GH (2000) Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han-rats after single application. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Supplement to Volume 361 No 4: R 140, Abstract 545

Upmeier A, Degen GH, Diel P, Michna H, Bolt HM (2000) Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han rats after single i.v. and oral application. Archives of Toxicology 74: 431-436

Janning P, Schuhmacher US, Upmeier A, Diel P, Michna H, Degen GH, Bolt HM (2000) Toxicokinetics of the phytoestrogen daidzein in female DA/Han rats after single i.v. and oral application. Archives of Toxicology 74: 421-430

Degen GH, Janning P, Upmeier A, Diel P, Michna H, Bolt HM (2000) Comparative toxicokinetics of bisphenol A in pregnant and non-pregnant DA/Han rats. Bisphenol A: Low dose effects - high dose effects, Nov 18-20, Berlin, Abstract