

Toxikologische Untersuchungen an Sedimenten und ausgewählten Kontaminanten

Dissertation

zur Erlangung des Naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Vorgelegt dem Departments Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Hassan Iznaguen
aus Hamburg

Hamburg 2009

Diese Arbeit ist im Zeitraum von Juli 2001 bis April 2006 am Institut für Pharmakologie, Abteilung für Toxikologie, des Uniklinikums Eppendorf in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Johannes Westendorf und am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Wilfried A. König angefertigt und nach dessen Tod (2004) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke fertig gestellt worden.

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Dr. h. c. mult. W. Francke
Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. H. Hühnerfuß
Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg

- 1. Prüfer:** Prof. Dr. Dr. h. c. mult. W. Francke
Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg
- 2. Prüfer:** Prof. Dr. H. Hühnerfuß
Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg
- 3. Prüfer:** Prof. Dr. J.A.C. Broekaert
Institut für Anorganische und Angewandte Chemie, Universität Hamburg
- 4. Prüfer:** Dr. S. Franke
Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg
- 5. Prüfer:** Dr. M. Steiger
Institut für Anorganische und Angewandte Chemie, Universität Hamburg

Tag der Disputation: 03. Juli 2009

Diese Arbeit widme ich in größter Hochachtung meinen lieben Eltern

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wilfried A. König danke ich für die herzliche Aufnahme im Arbeitskreis sowie für die Bereitschaft zu einer interdisziplinären Zusammenarbeit über die Grenzen des Fachbereichs hinweg. Ich danke in diesem Zusammenhang auch Herrn Prof. Dr. Johannes Westendorf für die herzliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe sowie die stete Bemühung zur finanziellen Unterstützung. Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke danke für die Bereitschaft zur Übernahme der Betreuung nach dem Tod von Herrn Prof. Dr. Wilfried A. König.

Allen Kolleginnen und Kollegen in den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Wilfried A. König und Prof. Dr. Johannes Westendorf, insbesondere Frau Sabine Schröder für die unproblematische Unterstützung bei Fragen zur Zellbiologie (EROD-Test, Zytotoxizität in H4IIE-Zellen), Herrn Klaus Söhren für die Durchführung des Östradiol-Verdrängungsassays (Tritium-Markierung) sowie der fachmännischen Unterstützung bei mechanischen Fragestellungen im Zusammenhang mit der HPLC und ‚last but not least‘ Frau Annegret Ruge für ihre kompetente Unterstützung bei Fragen zum Ames-Test.

Herrn PD. Dr. Wolfgang Pfau danke ich für die wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Diskussionen und sowie der Unterstützung bei der kritischen Hinterfragung mancher Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stephan Franke, der für Fragestellungen jeder Art stets zur Diskussion und fachlichen Unterstützung bereit war und stetes Interesse am Fortschreiten der Arbeit zeigte.

Frau Dr. Sonja Jaschke sowie Herrn Dr. Frank Werner bin ich dankbar für das mühevoll Korrekturlesen dieser Arbeit. Zudem danke ich Frau Dr. Sonja Jaschke für wertvolle Diskussionen zur allgemeinen Toxikologie – ihre wertvolle didaktischen Fähigkeiten ermöglichten mir den Zugang zur Toxikologie.

Für die Aufnahme der NMR-Spektren danke ich der NMR-Abteilung und Herrn Dr. V. Sinnwell. Herrn Manfred Preusse sowie Frau Annegret Meiners danke ich für die rasche und zuverlässige Unterstützung bei der Anfertigung der Massenspektren sowie in Fragen zur Handhabung des Massenspektrometers.

Sehr herzlich danken möchte ich schließlich noch meinen Freunden für die seelische Unterstützung insbesondere in der letzten Phase der Fertigstellung dieser Arbeit: bei Herrn Dr. Sönke Asmussen der in Form von musikalischer Untermalung das eine oder andere Mal zur Erheiterung beigetragen hat, Frau Dipl.-Chem. Verena Kraehmer, die durch ihr Fürwort stets einen Platz im Nebenfachpraktikum ergattert und somit zur Finanzierung der letzten Phase beigetragen hat. Herrn cand. Dipl.-Chem. Sven Kruspe, mit dem es sehr wertvolle Diskussionen gab.

Schließlich möchte ich Herrn Dr. med. Stephan Grosser danken, einem sehr kompetenten Nephrologen, der ab und an wohl das Verständnis verlor, wenn ich mal wieder den Beginn der Dialyse auf die lange Bank schob.

Schließlich möchte ich mich besonders herzlich bei meinen Eltern bedanken, die in schwierigen Phasen der Arbeit mit moralischer Unterstützung diese gefördert haben. Ihnen sei diese Arbeit gewidmet.

Abkürzungsverzeichnis	10
1. Einleitung	13
1.1. Biologie und Chemie von Sedimenten.....	13
1.2. Sedimentbewertung und toxizitätsgeleitete Analytik	14
1.3. Genotoxizität als ökotoxikologischer Parameter	16
2. Zielsetzung.....	18
3. Fremdstoffmetabolismus.....	20
3.1. Aufnahme, Verteilung, Umwandlung und Ausscheidung	20
3.2. Fremdstoffmetabolismus	20
3.3. Cytochrom P450 System – Vorkommen und Familien	20
3.4. Mutagenese, Kanzerogenese und Genotoxizität.....	22
3.5. Klassifizierung von Mutationen	23
3.6. Mechanismen der DNA-Schädigung – chemische Kanzerogenese	23
3.7. Genotoxizitäts- und Mutagenitätstests	24
3.7.1. Allgemeines.....	24
3.7.2. Ames-Test.....	24
3.7.3. Arabinose (Ara-) Test.....	25
3.7.4. Ames- und Arabinose-Test – ein Vergleich	26
4. Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD)-Test.....	27
4.1. Mechanismus der Aktivierung von EROD	27
5. Östrogene Wirkungen	29
5.1. Mechanismus östrogenen Wirkung	29
5.2. Ökologische Relevanz von Xenoöstrogenen	30
5.3. Östradiol-Verdrängungsassay und Luciferase-Testsystem	31
6. Geographie der Probenahmeregionen	32
6.1. Geographie des Taihu (Großer See), Region Shanghai	32
6.2. Sedimentproben des Taihus	33
6.3. Geographie des Raumes Bitterfeld-Wolfen (Mulde)	33
6.4. Wasser und Sedimentproben der Mulde	34
7. Analytik von Sedimenten	37
7.1. Probenvorbereitung.....	37
7.2. Identifizierung von Einzelsubstanzen	38
7.3. Analytisch-toxikologische Qualitätsaspekte.....	38
7.4. Strategie toxizitätsgeleiteter Analytik	39
8. Untersuchung von Taihusedimenten.....	40
8.1. Toxizität und Mutagenität (Ara-Test) in Bakterien	40
8.1.1. Bakterientoxizität der Extrakte.....	40
8.1.2. Mutagenität im Bakterientest – (Ara-Test).....	41

8.2. Ergebnisse des EROD-Tests	47
8.3. Zusammensetzung mutagener Sedimentproben	48
8.3.1. Identifizierung einzelner Komponenten	48
Alkylierte PAK.....	59
Hetero-PAK	61
Reten und dessen Homologa	65
Chlorbenzole	68
Cyanursäurederivate ("Triazin-Analoga")	71
Benzothiazol.....	71
Terpenoide Inhaltsstoffe	73
8.3.2. Identifizierung einzelner Komponenten im ethanolischen Sedimentextrakt.....	75
8.4. Untersuchung toxikologischer Eigenschaften einzelner Komponenten	84
Lineare Alkylbenzole	84
Reten.....	86
9. Ergebnisse der Untersuchungen von Muldeproben.....	88
9.1. Brunnenwasserproben (BVV) - Erscheinung	88
9.1.1. Toxizität in Bakterien	88
9.1.2. Zytotoxizität in Hepatozyten (UDA-Test)	89
9.1.3. EROD-Test.....	90
9.1.4. Östrogene Aktivität der Brunnenwasserproben (BVV)	91
9.1.5. Chemische Zusammensetzung der Brunnenwasserproben (BVV)	94
9.1.6. Synthese und Identifizierung von 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol.....	97
9.1.7. Nachweis der östrogen Wirkung von 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol im Östradiol-Verdrängungsassay	123
9.2. Sedimentproben der Mulde.....	123
9.2.1. Toxizität und Mutagenität in Bakterien (Ara-/Ames-Test).....	123
9.2.2. Vergleich der Aceton/Hexan-Extrakte mit Ethylacetat-Extrakten im Ara-Test	124
9.2.3. Vergleich der Resultate aus Ara- und Ames-Test	127
9.2.4. Chemische Zusammensetzung mutagener Fraktionen.....	129
9.2.5. Mutagenität der Fraktionen der Hexan/Aceton-Extrakte S031 und S032.....	130
9.2.6. Fraktionen der Extrakte S031 und S032 Ethylacetat.....	135
9.2.7. EROD-Test.....	138
9.2.8. Östrogene Wirkung ausgewählter Sedimentextrakte	138
9.2.9. Ara-Test mit 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol.....	141
9.2.10. 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol: Östradiol-Verdrängungs- und	143
Luciferase-Assay.....	143
10. Toxikologie bromierter Indole	146
10.1. Hintergrund und Zielsetzung	146
10.2. Synthese der Dibromindole	146
10.3. Toxikologische Untersuchungen an unterschiedlich substituierten Bromindolen.....	148
10.3.1. Toxizität in Bakterien	148
10.3.2. Bakterienmutagenese-Test (Ara-Test)	150
Untersuchungen an Dibromindolen (-S9)	150
3,4,7- , 3,6,7-Tribromindol und 2,3,5,7-Tetrabromindol.....	151
10.3.3. Untersuchungen zur Mutagenität nach metabolischer Aktivierung.....	152
3,4,7- , 3,6,7-Tribromindol und 2,3,5,7-Tetrabromindol.....	153
10.3.4. EROD-Test.....	153

10.3.5. Extraktion & Charakterisierung von Dibromindolmetaboliten nach.....	154
Inkubation mit Rattenleberhomogenat.....	154
Blindwert	154
Metabolite des 3,4-Dibromindols.....	155
Metabolite des 3,5-Dibromindols.....	158
Metabolite des 3,6-Dibromindols.....	160
Metabolite des 3,7-Dibromindols.....	162
11. Diskussion	165
11.1. Biologische Testsysteme.....	165
11.2. Taihu	166
Ethanolische Sedimentextrakte.....	170
11.3. Mulde	171
11.3.1. Brunnenwasserproben (BVV).....	171
Zytotoxizität in der Rattenhepatozyten-Zelllinie (H4IIE)	171
Toxizität in Bakterien	172
Östrogene Wirkungen	172
Analytisch-chemische Untersuchungen	173
11.3.2. Sedimentproben der Mulde	174
Toxizität in Bakterien.....	174
Ara-/Ames-Test	174
Östrogene Wirkung	174
11.4. Bromindole - Toxikologie und Metabolismus	176
12. Zusammenfassung.....	178
13. Summary	180
14. Ausblick.....	182
15. Material und Methoden.....	184
15.1. Reinigung der Geräte	184
15.2. Chemikalien.....	184
15.3. Blindwerte	184
15.4. Standards	184
15.5. Probenahmestellen, Bezeichnungen, Erscheinung und Trockenmassen der Sedimentproben	186
15.6. Extraktion und Probenvorbereitung der Sediment- und Wasserproben	188
15.6.1. Extraktion der Taihu Trockensedimente.....	188
15.6.2. Extraktion der Mulde Sedimente	188
15.6.3. Extraktion der Brunnenwasserproben BVV 473-511 aus der Mulde	188
15.6.4. Clean-up der Sedimentextrakte: Größenausschlusschromatographie (GPC)	188
15.7. Toxikologische Untersuchungen	189
15.7.1. Parameter für die Toxikologie	189
15.7.2. Arabinoseresistenz- (Ara-Test)/ Ames-Test - Rezepte.....	192
15.7.3. Ethoxyresorufin O-Deethylase (EROD) -Test.....	195
15.7.4. Zytotoxizität in H4IIE-Zellen (Hepatomzellen)	197
15.7.5. Östradiol-Verdrängungsassay mit ER α und ER β	197
15.7.6. Luciferase-Reportergenassay (LUC-Assay) mit MVLN Zellen	199

15.8. Geräte und instrumentelle Analytik.....	204
15.8.1. Kolonienzähler	204
15.8.2. Messung der β -Strahlung im Szintillationszähler.....	204
15.8.3. Messung der Fluoreszenz mit dem Fluorocounter (EROD+LUC)	204
15.8.4. Kapillargaschromatographie.....	204
15.8.5. Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS)	204
15.8.6. Kernresonanzspektroskopie (NMR)	205
15.8.7. Präparative HPLC	205
15.9. Synthesen.....	206
15.9.1. Darstellung von Dibromindolen	206
15.9.2. Friedel-Crafts-Synthese von 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol	208
15.9.3. Metabolisierungsreaktionen mit dem S9-Mix.....	210
16. Anhänge	212
16.1. RI der Standards	212
16.2. Sicherheitshinweise	215

Abkürzungsverzeichnis

2-AA	2- <u>A</u> mino <u>a</u> nthracen
APEOs	<u>A</u> lky <u>p</u> henyl <u>e</u> tho <u>x</u> ylate
APnEOs	<u>A</u> lky <u>p</u> henol poly <u>e</u> tho <u>x</u> ylate
ArH	<u>A</u> ry <u>l</u> hydrocarbon (Arylkohlenwasserstoffe)
ARNT	<u>A</u> rH <u>R</u> eceptor <u>N</u> uclear <u>T</u> ranslocator
Ara-Test	<u>A</u> ra <u>b</u> inose-Resistenz-Test
BTEX-Aromaten	<u>B</u> enzol- <u>T</u> oluol- <u>E</u> thylbenzol und <u>X</u> ylol
COSY	<u>C</u> orrelation <u>S</u> pectroscopy
CYP450	<u>C</u> ytochrom <u>P</u> igment 450
δ [ppm]	chemische Verschiebung gegenüber TMS gemessen in ppm
d	Dublett
DBI	<u>D</u> ibrom <u>i</u> ndol
DC	<u>D</u> ünnschicht <u>c</u> hromatographie
DCM	<u>D</u> ichlorm <u>e</u> than
DDT	<u>D</u> ichlor <u>d</u> iphenyl <u>t</u> richlorethan 1,1,1-Trichlor-2,2-bis(p-chlorphenyl)ethan
DES	<u>D</u> iethyl <u>s</u> tilböstrol
DEHP	<u>D</u> iethyl <u>h</u> exyl <u>p</u> hthalat
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfo <u>x</u> id
DNA/DNS	<u>D</u> eoxyribon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid/ <u>D</u> esoxyribon <u>u</u> clein <u>s</u> äure
DRE	<u>D</u> ioxin- <u>r</u> esponsive <u>E</u> lement
D/W-Kurve	<u>D</u> osis/ <u>W</u> irkungs-Kurve
ED ₅₀	<u>E</u> ffektive <u>D</u> osis <u>50</u> % : Dosis, bei der bei 50 % der Individuen der erwünschte Effekt auftritt
EE	<u>E</u> ssigsäure <u>e</u> thylester
EI	<u>E</u> lektronenstoß <u>I</u> onisation

Abkürzungsverzeichnis

ER α /ER β	<u>E</u> strogen <u>R</u> eceptor α/β
ERE	<u>E</u> strogen <u>R</u> esponsive <u>E</u> lements (Kontrollelemente im Promotor des Gens)
EROD-Test	<u>E</u> thoxy <u>r</u> esorufin- <u>O</u> - <u>D</u> eethylase-Test
EtOH	Ethanol
FID	<u>F</u> lammen <u>i</u> onisations <u>d</u> etektor
GC	<u>G</u> as <u>c</u> hromatograph
GC/MS	<u>G</u> as <u>c</u> hromatographie- <u>M</u> assens <u>s</u> pektrometrie
GPC	<u>G</u> el <u>p</u> ermeations <u>c</u> hromatographie
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
J	Kopplungskonstante
K _{ow}	Oktanol / Wasser-Verteilungskoeffizient
LAB	<u>l</u> ineare <u>A</u> lkyl <u>b</u> enzole
LD ₅₀	<u>L</u> etale <u>D</u> osis 50 , mittlere tödliche Dosis bei der noch 50% der ursprünglichen Population leben
LUC – Essay	<u>L</u> uciferase Essay
M	molar [mol/L]
MC	<u>M</u> ethyl <u>c</u> holanthren
MNNG	<u>N</u> - <u>M</u> ethyl- <u>N'</u> - <u>n</u> itro <u>n</u> itrosoguanidin
MVLN-Zellen	genetisch modifizierte Mammakarzinomzellen (MCF-7, M ichigan C ancer F oundation)
m/z	Masse/Ladung
M ⁺	Molekülion
MS	Massenpektrometer/Massenspektrum
NADP(H)	<u>N</u> icotinsäureamid <u>a</u> denosin <u>d</u> inukleotid <u>p</u> hosphat (reduzierte Form: Hydrid)
NMR	<u>N</u> uclear <u>M</u> agnetic <u>R</u> esonance
PAK	<u>P</u> oly <u>a</u> romatische <u>K</u> ohlenwasserstoffe

Abkürzungsverzeichnis

PCBs	<u>P</u>oly <u>c</u>hlorierte <u>B</u>iphenyle
PCDD	<u>P</u>oly<u>c</u>hlorierte <u>D</u>ibenzo <u>D</u>ioxine
PCP	<u>P</u>ent<u>c</u>hlor<u>p</u>henol
ppm	<u>P</u>arts <u>p</u>er <u>m</u>illion (Einheit der chemischen Verschiebung im NMR-Experiment)
POP	<u>P</u>ersistent <u>O</u>rganic <u>P</u>ollutant
RI	<u>R</u>etentions<u>i</u>ndex
s	Standardabweichung einer Stichprobe
TCDD	2,3,7,8- <u>T</u>etrachlor<u>d</u>ibenzod<u>i</u>oxin
TIC	<u>T</u>otal <u>I</u>on <u>C</u>urrent
TLC	<u>T</u>hin <u>L</u>ayer <u>C</u>hromatography (dt. <i>Dünnschichtchromatographie</i>)
TMÄ	<u>T</u>rocken<u>m</u>asseäquivalente
TMS	<u>T</u>etra<u>m</u>ethyl<u>s</u>ilan
VOC's	<u>V</u>olatile <u>O</u>rganic <u>C</u>ompounds
v/v	Volumenverhältnis

1. Einleitung

Sedimente als Bestandteile der aquatischen Umwelt stellen eine Senke für Umweltchemikalien dar, in denen der erste Anreicherungsschritt gegenüber dem frei beweglichen Wasser erfolgt. Sedimente stehen mit der aquatischen Fauna und Flora in engerem Kontakt. Von besonderem ökotoxikologischen Interesse sind Sedimente aus Gewässern, die im Einzugsbereich von Industrie- bzw. Ballungsgebieten stammen, da diese aufgrund der Belastung mit Umweltchemikalien eine Quelle für unterschiedlichste Xenobiotika darstellen. Es wurde daher je ein besonders großes Ballungsgebiet (Taihu (großer See) nahe Shanghai) sowie ein stark mit chemischen Rückständen belastetes Gebiet (Mulde bei Bitterfeld) in die Untersuchungen einbezogen.

Die Sedimente aus dem chinesischen Taihu-See geben interessante Informationen über den Verschmutzungsgrad des Sees, der der Bevölkerung zur Grundversorgung mit Trinkwasser dient. Diese Region steht seit Anfang der 80er Jahre unter einer stark wachsenden Industrialisierung, wobei sich die Auswirkungen auf die Wasserqualität in den 90er Jahren extrem bemerkbar gemacht haben. Eine Folge der steigenden Verschmutzung des Gewässers ist sind Engpässe in der Wasserversorgung der Bevölkerung, da die Aufbereitungsanlagen mittlerweile nicht mehr in der Lage sind, das Wasser in entsprechender Qualität zur Verfügung zu stellen.^[1] Zudem stellt die Desinfizierung durch Chlorierung des Trinkwassers ein weiteres, ernst zu nehmendes Problem dar, da sich intermediär u.a. mutagen wirksame "Nebenprodukte" bilden können^[2]

Doch auch in den modernen Industrienationen erfolgen, obschon gesetzliche Regelungen bestehen, stetig Einträge in die Umweltmedien, die in zunehmendem Maße mit Kontaminanten belastet sind, deren toxische Wirkungen sich erst nach längeren Zeiträumen zeigen. Als Beispiel eines europäischen Industriestandortes werden die Ergebnisse der Untersuchungen der Region Bitterfeld-Wolfen sowie der Zwickauer Mulde vorgestellt.

Die Sedimentproben aus dem Muldegebiet im Raum Bitterfeld repräsentieren ein Gebiet, das eines der größten Industriezentren der ehemaligen DDR war, und in dem sowohl technische Vorrichtungen als auch gesetzliche Regelungen zur Reinhaltung des Wassers kaum vorhanden waren.^[3] Erst durch eine starke Modernisierung der Industrieanlagen in den Jahren nach der Wiedervereinigung, konnte eine Verbesserung der Gesamtsituation festgestellt werden. In der Region Bitterfeld war vor allem chemische Industrie angesiedelt. Diese Fabriken hatten die Mulde über längere Zeiträume mit Abwässern belastet.^[4] Durch das starke Hochwasser im Jahr 2002 kam es dann zu einer Aufwirbelung des Sediments, das dadurch auf das umliegende Gelände verteilt wurde.^[5]

1.1. Biologie und Chemie von Sedimenten

Sedimente sind ein wichtiger Teilbereich des aquatischen Lebensraums, wobei es zwischen den Lebensräumen in Meeren, Flüssen und Seen zu differenzieren gilt. Hier spielt vor allem die Größe des Ökosystems eine entscheidende Rolle, für die die Aufnahmekapazität von Schadstoffen und die Austauschprozesse/-geschwindigkeit (z.B. Absinken von Plankton, Umverteilung von Wassermassen, Verdünnungseffekte) Relevanz hat. Sedimente, die durch direkte Ablagerung, Sedimentation von Partikeln oder auch durch chemische Fällung entstehen, können Xenobiotika^a partikulär aus der Wasserphase adsorbieren und damit zu einer Konzentrierung dieser Verbindungen führen. Eine weitere Konzentration der Xenobiotika erfolgt nach Aufnahme der Partikel durch Organismen, die im Sediment leben. Dies führt schließlich zu einer Anreicherung von Xenobiotika innerhalb der Nahrungskette, weswegen die Untersuchung von Sedimenten als Startmaterial eine zentrale Rolle spielt.

^a Lat. Xeno = Fremd , bio (griech.) =leben(s)..., lebensfremde Stoffe

Eine Klassifizierung des Sediments erfolgt nach geologischen Gesichtspunkten anhand unterschiedlicher Korngrößen (von $<4 \mu\text{m}$ bis 2mm). Durch die geringe Beweglichkeit des Wassers im Sediment, bedingt durch variierende Anteile an Ton und Silt (Schlick- bzw. Sandböden), kommt es zu einem weitaus stärkeren chemischen Vertikalgradienten als im freien Wasser. Chemisch setzt sich das Sediment aus einer oxidierenden und einer reduzierenden Schicht zusammen, was aus dem unterschiedlichen Gehalt an Oxiden (Nitrate, Sulfate und Carbonate) und dem Sauerstoffgehalt in der jeweiligen Schicht resultiert. Dieser wird zum einen reguliert durch das Porenwasser, das sich im Austausch mit der darüber liegenden Wassersäule befindetet, zum anderen durch mechanische Durchmischung der Schichten durch darin lebende Organismen, sowie als Photosyntheseprodukt benthischer Mikroalgen.^[6]

1.2. Sedimentbewertung und toxizitätsgeleitete Analytik

Gegenstand der ökotoxikologischen Forschung ist die Wirkungsanalyse von (Schad-)Stoffen auf die Strukturen und Funktionen von hinsichtlich Raum und Zeit variablen, vielfältigen Ökosystemen.^[7] Die Ausmaße von stofflichen Veränderungen im Ökosystem lassen sich durch Messung eines „biologischen“ Parameters wie z.B. Artenvielfalt in Abhängigkeit vorgewählter Bedingungen erfassen.^[8] Diese Ergebnisse können dann der Prognose für das Umweltgefährdungspotential eines Xenobiotikums dienen. Aufgrund der Komplexität der Umwelt, bedingt durch zahlreiche Faktoren (wie z.B. physikalische oder chemische, aber auch ökologische Interdependenzen, sowie Kombinationseffekte von Stoffgemischen) und deren Auswirkungen auf die Lebewesen, lässt sich stets nur ein bestimmter Ausschnitt erfassen und modellieren.

Ziel toxikologisch-chemischer Untersuchungen von Sedimenten sind Informationen über die durch die Nahrungskette aufgenommenen Xenobiotika und die daraus resultierenden Gefahren für das Benthos. Sedimente als Bestandteil aquatischer Ökosysteme enthalten Informationen über die Belastungssituation des Flusses in Form von schwer abbaubaren (persistenten) Schadstoffen, die in tieferen Sedimentschichten gespeichert sind und über lange Perioden in diesen lagern.

Zu den persistenten Schadstoffen (**Persistent Organic Pollutants – POP**), gehören Verbindungen, die verschiedene Substanzklassen repräsentieren. Persistenz der Xenobiotika bedeutet, dass sie längere Zeiträume unverändert im Umweltmedium überdauern können. Sie gelangen z.B. als im Fettgewebe gespeicherte Substanzen in die Nahrungskette und können dort akkumulieren. Als toxikologisch wirksame Substanzen zeigen diese z.T. hormonaktive Eigenschaften und können so den Stoffwechsel beeinflussen.^[9, 10] Im Fall von Überschwemmungen und den daraus resultierenden höheren Strömungsgeschwindigkeiten können die tiefer liegenden Sedimentschichten aufgewirbelt werden, wodurch die darin befindlichen (Schad-)Stoffe an die Oberfläche gelangen. Sie stehen somit den frei beweglichen Wassermassen und der Fauna (Makrobenthos) zur Verfügung. Die Untersuchung der im Sediment gespeicherten Kontaminanten ist deshalb von besonderem Interesse, da diese auf dem Weg über den nahe an der Uferregion gelegenen Boden oder aquatische Lebewesen, die dem Menschen direkt oder indirekt als Nahrung dienen, in die Nahrungskette gelangen können.

Tiefere Schichten stehen über das darin enthaltene Porenwasser im engen Austausch mit der im Sediment lebenden Fauna z.B. Krebstieren (*Crustacea*, Makrobenthos) bzw. Ruderfußkrebse (*Copepoda*, Meiobenthos).

Da diese am Anfang der Nahrungskette stehen, kann eine Sedimentbelastung älteren Datums in Abhängigkeit von der Löslichkeit des jeweiligen Schadstoffes, ausgedrückt als K_{ow} -Wert (Gleichung 1-1), vom darin lebenden Organismus aufgenommen werden.

Die (Schadstoff-)Belastung des Sedimentes führt deshalb zu einer Störung des empfindlichen Lebensraumes. Die Gleichung 1-1 drückt das Konzentrations- verhältnis einer Substanz in der wässrigen Phase und der Oktanolphase aus, deren Phasen miteinander im Gleichgewicht stehen.

$$K_{OW} = \frac{C_{x,Octanol}}{C_{x,Wasser}}$$

Gleichung 1-1: Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser;

$C_{x, Octanol}$ = Konzentration der Verbindung in n-Octanol

$C_{x, Wasser}$ = Konzentration der Verbindung in Wasser

Diese Erkenntnisse führten dazu, dass eine Bewertung der Belastungssituation eines Sediments allein mit Hilfe chemischer Untersuchungsmethoden nur unvollständig ist. Insbesondere findet so die Bioverfügbarkeit sowie die Wirkungen der Schadstoffe auf den Organismus keine Berücksichtigung. Diese Gesichtspunkte finden gegenwärtig in Form von toxikologisch geleiteter Analytik zunehmend Beachtung. Diese Tendenz spiegelt sich in den Ergebnissen unterschiedlicher Arbeitsgruppen wieder, die unterschiedliche toxikologische Parameter schwerpunktmäßig untersuchen. So fordern Calmano et. al.^[7, 8], dass zu einer umfassenden Sedimentcharakterisierung folgende Gesichtspunkte zu berücksichtigen sind:

- Historische Informationen zur Belastungssituation des Sediments,
- Physikalisch-chemische Parameter zur Sedimentcharakterisierung,
- Analyse der benthischen Biozönosestruktur,
- Gesamtsedimenttoxizität durch Kombination unterschiedlicher Biotestverfahren,
- Weitergehende Experimente zur Erfassung der Sedimenttoxizität

Ahlf et al.^[11] nennt die möglichen Kriterien, um eine Sedimenttoxizität hinsichtlich ökologischer Auswirkungen zu erfassen. Insbesondere sei hier das von ihm vorgeschlagene Stufenverfahren genannt, das neben der physikalisch-chemischen Charakterisierung des Sediments eine Kombination unterschiedlicher Biotests auf das Gesamtsediment, das Eluat und das Porenwasser vorsieht.

Darüber hinaus lässt sich die ökotoxikologische Wirkung der Sedimentinhaltsstoffe durch Freilandexperimente erfassen, die die Auswirkungen der Kontaminanten auf das benthische Leben berücksichtigt. Die Erfassung der Biozönosestruktur im Sediment lässt Rückschlüsse auf die Belastungssituation zu.^[11]

Prinzipieller Vorteil der Biotestkombination ist die Erfassung unterschiedlicher Expositionspfade sowie die unterschiedliche Empfindlichkeit der Testorganismen gegenüber den Umweltchemikalien. Darauf basierend ergaben sich tendenziell zwei prinzipielle Arbeitsweisen, wie im Folgenden erläutert wird.

Einerseits geht man vom „Ganztier“-Experiment aus, in dem die Organismen als Bioindikatoren die Güte der Lebensbedingungen in deren Lebensraum anzeigen. Dazu wird die Konzentration eines oder mehrerer Parameter, so genannter Biomarker, bestimmt und in Zusammenhang mit der Belastung des (aquatischen) Lebensraumes interpretiert. Im Mittelpunkt des Interesses steht dabei stets die Auswirkung einer Substanz auf den Testorganismus. Typischer Parameter der PAK-Belastung eines Gewässers ist die Cytochrom P450 1A1 (CYP-450 1A1)-Konzentration.^[12, 13, 14] Dem gleichen Zweck dienen auch Experimente mit Kleinlebewesen, wie dies z.B. im Zebrafischtest^[15] bzw. im Leuchtbakterientest^[16] umgesetzt ist. Der Leuchtbakterientest ist als zertifizierter DIN-Test zur Bewertung der Wasserqualität standardisiert und dient der Bewertung des Belastungsgrades.^[17]

Andererseits wird gegenwärtig auch der Einsatz von Geweben oder Organen der im Biotop lebenden Organismen herangezogen.^[18] Dies erweist sich als Ersatz für das Experiment am lebenden Tier, wobei sowohl die Zahl der "verbrauchten" Individuen (pro Versuchsreihe) als auch der nötige Aufwand drastisch reduziert wird. So zeigten Untersuchungen des Einflusses von Extrakten des Nordseewassers auf isolierte Karpfen-Leukozyten (*Cyprinus carpio*) genotoxische Effekte in Form von DNA-Strangbrüchen.^[18]

Aktuell finden Kombinationsexperimente (Testbatterien) Anwendung, die unterschiedliche Wirkungen erfassen und einen gründlicheren Überblick über das Wirkspektrum von Xenobiotika auf die Organismen des Biotops erlauben.^[19, 20] Zu den häufigsten in der Literatur beschriebenen Bioindikatoren der Testbatterien zählen Hormonaktivitätsmessungen (im Falle von Xenoöstrogenen) oder Bestimmungen von Hitzeschockproteinen (als Bioindikator für Stressfaktoren).^[21, 22] Zur Erfassung genotoxischer Wirkungen werden z.B. der Mikrokerntest oder der COMET-Assay verwendet, die andere Endpunkte der Indikation aufweisen als der Salmonella/Mikrosomentest (Ames-Test) sowie Zellen höherer Organismen.^[23, 24]

1.3. Genotoxizität als ökotoxikologischer Parameter

Eine Einschätzung der Bedeutung der Genotoxizität als ökologischer Parameter^[25, 26] ist nicht nur allein aufgrund der vielschichtigen Einflussgrößen sondern auch im Zusammenhang mit der Diskussion zum Schwellenwert schwierig. In Tabelle 1-1 werden die essentiellen Parameter, die für die (Gen-)Toxizität von Bedeutung sind, wiedergegeben und vom Standpunkt der Ökologie eingehender erläutert.

Parameter	Bedeutung
Dosis	Wirkung ist dosisabhängig, je niedriger die erforderliche Dosis, desto höher die biologische Potenz
Zeit	Wirkung ist abhängig davon, wie lange der Organismus mit dem Xenobiotikum im Kontakt steht und wie häufig Exposition erfolgte (einmalig oder wiederholt: chronisch)
Spezies	Ergebnisse aus Tierversuchen bedürfen "Sicherheitsfaktoren" bei Transformation auf den Menschen; Wirkung für männl. und weibl. Individuen kann verschieden sein
Bioverfügbarkeit	physikalischer Parameter, abhängig von der Zustandsform ("Spezie") ^a sowie der Löslichkeit
Generationszeit	Individuen mit kurzer Generationszeit (z.B. Bakterien) sind weniger empfindlich für genotoxische Wirkungen
"Organ"	genotoxische Wirkung in Keimzellen: mit Konsequenz für Population; Körperzelle: Individuum betroffen; mögliche Konsequenz des Tumorwachstums

Tabelle 1-1: Auswahl einiger biologischer, chemischer und physikalischer Parameter der Genotoxizität^[27]

Die Wirkung von anthropogenen, genotoxischen Substanzen ist im Zusammenhang mit dem Wirkort im Organismus und der Spezies, die von einem genotoxischen Effekt betroffen ist, zu betrachten. Sind nur Körperzellen betroffen, so kann dies im Extremfall letal für ein Individuum sein. Da höhere Organismen über eine Vielzahl von Schutz- und Reparaturmechanismen verfügen, ist ein Ableben nur abhängig von der Dosis und der Häufigkeit der Einwirkung eines genotoxischen Agens.

^a Unter Spezies versteht man in der Chemie die definierte chemische Zustandsform bzw. Zusammensetzung einer Verbindung

Bestimmte Mutationen in somatischen Zellen können aber Ausgangspunkt für ein Wachstum maligner Tumoren sein und stellen so eine Gefahr für das Leben des Individuums dar. Kommt es dagegen zu einer Veränderung im Genom der Keimzellen, so können die Schäden auch an die Folgegeneration vererbt werden. Im Extremfall, d.h. wenn mehrere Individuen betroffen sind, hat dies Konsequenzen für die Reproduktionsrate mit negativen Auswirkungen auf der Populationsebene. Im Gesamtkontext der Ökologie führt diese Reduktion der Populationsdichte einer Spezies auch zu Einschränkungen für solche Spezies, die in der Nahrungskette weiter oben stehen.

Darüber hinaus ist die Generationsfolge des Individuums ausschlaggebend. Unterliegt das Individuum einer kurzen Generationszeit, wie es bei einzelligen Organismen der Fall ist, so werden vererbte Mutationen sehr schnell ausselektiert. Höhere Organismen unterliegen dagegen einer langen Generationszeit und die Weitergabe genetischer Schäden an die Folgegeneration wirkt sich gravierender aus. Besonders betroffen sind Tiere mit geringer Nachkommenzahl, wie z.B. Raubvögel, wogegen solche mit großer Nachkommenzahl, wie die meisten Nagetiere, die Schäden besser kompensieren können, indem sie stets genügend gesunde Nachkommen hervorbringen, die den Erhalt der Population garantieren. Genotoxische Effekte treten nicht nur nach Exposition des Organismus mit anthropogenen Substanzen auf, sondern können auch durch biogene Einwirkung induziert werden.

2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Wirkungsspektrum von Kontaminanten aus Sedimenten unterschiedlicher Industrieregionen anhand verschiedener toxikologischer Parameter zu analysieren und umweltrelevante Sedimentinhaltsstoffe zu identifizieren. Die Ergebnisse der toxikologischen Untersuchungen sollten mit chemisch-analytischen Untersuchungen korreliert werden. Unbekannte Inhaltsstoffe sollten gegebenenfalls durch Synthese von Vergleichs-substanzen charakterisiert werden.

Um einen umfassenden Überblick des in Sedimenten auftretenden toxischen Wirkungsspektrums zu erhalten, sollten die mutagenen und östrogenen Wirkungen als auch die Fähigkeit zur Induktion von Cytochrom P450 1A1 (CYP-450 1A1) untersucht werden. Die Relevanz dieser toxikologischen Parameter resultiert aus deren mannigfachen z.T. miteinander interferierenden Wirkungen im Organismus. Daraus ergeben sich unterschiedliche Gesichtspunkte für die Integrität des aquatischen Ökosystems und letztendlich auch für die Gesundheit des Menschen.

Die Untersuchung der Sedimentinhaltsstoffe auf Mutagenität sollte mit Hilfe bakterieller Mutagenese-Kurzzeit-Testsysteme erfolgen. Zur Anwendung kamen neben dem Arabinoseresistenz-Test (Ara-Test), der von Pueyo entwickelt und von Vahl und Westendorf für umwelttoxikologische Untersuchungen eingesetzt wurde^[28,29] auch der klassische Ames-Test.^[30] Um eine bessere Abschätzung des resultierenden Risikos für den Menschen zu erhalten, sollte die Zytotoxizität in V79 Zellen^[31] untersucht werden.

Ein wichtiger Biomarker, der ebenfalls von ökotoxikologischer Bedeutung ist, ist das Cytochrom P450 1A1 (CYP-450 1A1). Die Bestimmung der CYP-450 Konzentration im Organismus (meistens in der Leber) ist ein in der Ökotoxikologie fest etablierter Parameter^[25, 32], da das CYP-450 1A1 im Fremdstoffmetabolismus eine zentrale Rolle für die Entgiftung des Organismus spielt und dessen Konzentration mit dem Verschmutzungsgrad des Biotops, in dem der Organismus lebt, korreliert. Mit Hilfe des Ethoxyresorufin O-Deethylase Testsystems (EROD-Test), in Verbindung mit H4IIE-Zellen (Rattenhepatomzellen) sollte die Bestimmung der Cytochrom P-450 Konzentration erfolgen. Die Induktion von CYP-450 1A1 im EROD-Test gibt zudem Auskunft über die strukturelle Ähnlichkeit der Sedimentinhaltsstoffe mit 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD), das neben Methylcholanthren den stärksten bekannten Induktor in diesem Testsystem darstellt.^[32, 33, 34]

Da Umweltchemikalien, insbesondere wenn diese persistent sind, nicht nur mutagene oder Cytochrom-induzierende Wirkungen haben können, sollte ebenfalls die östrogene Wirkung der Sediment- und Wasserextrakte untersucht werden. Hierfür sollte der Östradiol-Verdrängungsassay an rekombinanten Estrogenrezeptoren und ergänzend der Luciferase-Reportergenassay an MVLN-Zellen (humane Brustkrebszellen, stabil mit dem Luciferase-Gen transfiziert) verwendet werden. Während mit dem Östradiol-Verdrängungsassay lediglich eine Aussage über die Fähigkeit der Bindung einer Substanz an die Östrogenrezeptoren möglich ist, was eine Unterscheidung zwischen Agonisten und Antagonisten nicht zulässt, kann mithilfe des Luciferaseassays zusätzlich auch deren intrinsische östrogene Wirkung studiert werden.

Die chemischen Analysen sollten auf die leicht-flüchtigen Komponenten beschränkt werden, die unzersetzt mit Hilfe gängiger analytisch-chemischer Methoden (GC/MS) erfasst werden können. Nicht-kommerziell erhältliche zu identifizierende Substanzen sollten, sofern der Aufwand dies rechtfertigte, synthetisiert und spektroskopisch charakterisiert werden.

Die Sedimentproben stammten aus dem chinesischen Taihu-See, der in der Industrieregion von Shanghai liegt, und aus der Zwickauer Mulde bei Lengenfeld. Zudem sollten Brunnenwasserproben aus der Muldereion bei Bitterfeld-Wolfen untersucht. Die anthropogenen Einträge im Muldesystem waren Gegenstand verschiedener Arbeiten^[35,36], so dass eine umfangreiche Dokumentation zu diesen vorliegt.

Um die bislang unbekanntes toxikologischen Eigenschaften der in Nordseesedimenten nachgewiesenen Dibromindole^[37, 38] eingehender zu untersuchen, sollten die 3, x-Dibromindolisomere (x = 4, 5, 6, 7) synthetisiert werden. Diese sollten auch hinsichtlich deren Diagenese untersucht werden. Bislang war diese Substanzklasse toxikologisch nicht bzw. nur teilweise im Leuchtbakterientest erfasst.^[39] Neben den Dibromindolen sollten auch höher bromierte Indole sowohl im Bakterienmutagenesetest als auch im EROD-Test auf die Induktion von CYP-450 1A1 untersucht werden.

3. Fremdstoffmetabolismus

3.1. Aufnahme, Verteilung, Umwandlung und Ausscheidung

Aufnahme, Verteilung, Umwandlung und Ausscheidung sind die Stufen, die ein Fremdstoff nach Passieren der natürlichen Barrieren (z.B. Epidermis, Mukosa, Zellmembran) durchläuft. Je nach physikalischem Zustand des Fremdstoffes kommen unterschiedliche Aufnahmewege in Betracht. Für den Menschen sind insbesondere Stoffe relevant, die entweder mit der Nahrung oder inhalativ in den Körper gelangen. Nach Eindringen in den Organismus wird eine Substanz verteilt und z.T. metabolisiert, was in Abhängigkeit von den Substanzeigenschaften unterschiedlich lange Zeiträume in Anspruch nehmen kann. Schließlich erfolgt die Ausscheidung über aktive bzw. passive (z.B. über die Expiration) Transportprozesse.^[40,41]

3.2. Fremdstoffmetabolismus

Die Leber spielt als Organ für die Umwandlung von toxischen in weniger toxische Substanzen eine zentrale Rolle. Ziel der Umwandlungsreaktionen ist die Erhöhung der Wasserlöslichkeit lipophiler Substanzen im Verlauf des Phase-I- bzw. Phase-II Metabolismus (Abbildung 3-1), in dem die Substanzen u.a. oxidiert und die Oxidationsprodukte konjugiert werden. Durch die Oxidation, unter Beteiligung unterschiedlicher Cytochrom P450-Enzyme, werden polare Gruppen (z.B. Sauerstofffunktionen) in den Fremdstoff eingeführt, an die im Phase-II Metabolismus weitere Gruppen wie z.B. Glutathion oder Glukuronsäure addiert werden, was eine weitere Steigerung der Wasserlöslichkeit bewirkt. Die Cytochrome zählen zu den mischfunktionellen Monooxygenasen, die die Übertragung von Sauerstoff auf das Substrat katalysieren.

3.3. Cytochrom P450 System – Vorkommen und Familien

In Säugetierzellen sind die Cytochrome membrangebunden. Sie finden sich teils an der inneren Membran der Mitochondrien, teils an der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Im menschlichen Körper kommen Cytochrome an vielen Orten (z.B. in Leber, Darm, Lunge u.a.) vor, wobei sie in der Leber besonders zahlreich vorhanden sind. Cytochrome sind Hämoproteine, die aus einer einzelnen Hämgruppe und 400 bis 500 Aminosäuren bestehen. Das Absorptionsspektrum der reduzierten Form des Cytochrom P450 (CYP-450) zeichnet sich durch ein Absorptionsmaximum bei 450 nm aus, weshalb sie auch als P450 (P=Pigment) bezeichnet werden. Cytochrome der gleichen Familie haben mindestens 40% gleiche Aminosäuresequenzen; diejenigen, die zur gleichen Subfamilie gehören, haben mehr als 55% gleiche Aminosäuresequenzen. Die Polymorphie der Cytochrome bedingt, dass diese durch unterschiedliche Substanzen induziert werden. Für die vorliegende Arbeit ist das CYP-450 1A1 von besonderer Bedeutung, da es im direkten Zusammenhang mit dem hier verwendeten EROD-Test steht (vgl. Kapitel 4). Darüber hinaus sind an der metabolischen Aktivierung von Xenobiotika mit dem Rattenleberhomogenat im Mutagenesetest unterschiedliche Cytochrome beteiligt. Durch die Verwendung von Rattenleberhomogenat als Zusatz in bakteriellen Testsystemen wird der Stoffwechsel im höheren Organismus simuliert.

Folgende Reaktionen werden durch CYP-450 Enzyme katalysiert:

- Hydroxylierung aliphatischer oder aromatischer Kohlenwasserstoffe
- Epoxydierung von Olefinen
- Oxygenierung von Heteroatomen (S,N) sowie N-Hydroxylierung
- Desalkylierung von Heteroatomen (O,S,N) (→EROD-Test)
- Esterspaltung
- Dehydrierung

Exemplarisch sei die Metabolisierung des Benzols durch CYP-450 wiedergegeben (Abbildung 3-1).

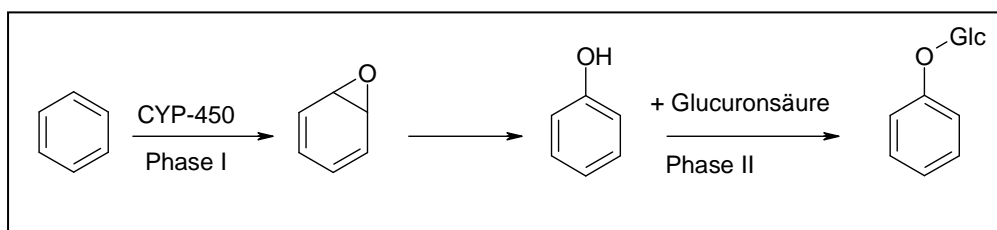


Abbildung 3-1: Phase I und Phase II Metabolismus von Benzol unter Bildung eines hydrophilen Konjugationsproduktes mit Glucuronsäure (Glc)

Als Nebeneffekt der Entgiftung von Xenobiotika im Phase-I Metabolismus kann es zur intermediären Bildung von Elektronenmangelzentren wie z.B. Radikalen, Carbenium-/Nitreniumionen und damit unter Umständen zu einer "Giftung" des Xenobiotikums kommen. Die Toxifizierung resultiert aus der gewonnenen Fähigkeit des Xenobiotikums z.B. unter Adduktbildung mit Nucleophilen (z.B. DNA-Basen, Proteinseitenketten) zu reagieren. Dies sei am Beispiel des 2-Aminoanthracens verdeutlicht (Abbildung 3-2).

Das Schema gibt nur eine der möglichen Reaktionen wieder, wobei N-Arylhydroxylamin die zentrale Rolle für die Bildung des Nitreniumions spielt. Intermediär treten N- bzw. O-Acetylierungsprodukte auf, die entweder unter Abspaltung von Essigsäure oder nach Umlagerung mit anschließender Abspaltung des Acetylrestes das Nitren bilden.

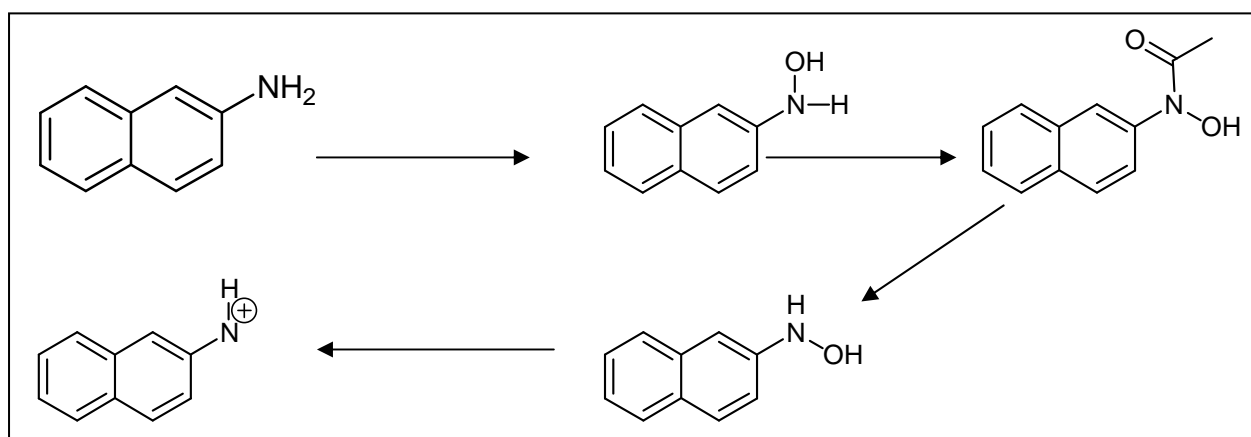


Abbildung 3-2: Oxidation des 2-Aminoanthracens, Reagenz der Positivkontrolle für den AMES-Test mit metabolischer Aktivierung (Phase-I Metabolismus)^[41,42], unter Bildung eines Nitreniumions

Die Giftung des 2-Aminoanthracens entsteht durch die intermediäre Bildung des Nitrens, das mit nucleophilen Zentren, wie z.B. DNA Basen, unter elektrophiler Addition sogenannte Addukte bilden kann. Die intermediär auftretenden Adduktbildungen stellen Mutationen dar, die bei ausbleibender oder fehlerhafter Reperatur letztendlich zur Tumorbildung führen können. Verschiedene Substanzen wie z.B. Aminoaromaten (2-Aminoanthracen) oder PAK (Benzo[a]pyren) sind erst nach metabolischer Aktivierung stark mutagen wirksam (vgl. Abbildung 3-2).

3.4. Mutagenese, Kanzerogenese und Genotoxizität

Veränderungen der DNA, die als Mutation bezeichnet werden, können sowohl in Keimzellen als auch in Körperzellen erfolgen. Führt die Mutation in einer Körperzelle zu bleibenden Schäden, so kann dies zur Kanzerogenese und als Folge zum Tod des Organismus führen. Mutationen in Keimzellen können in der Folgegeneration zu Missbildungen führen oder letal wirken.

Vom Begriff der Mutagenität ist der Begriff der Genotoxizität zu differenzieren, wobei unter letzterem alle strukturellen Veränderungen der DNA mit möglichen, schadhafte Konsequenzen für den betroffenen Organismus verstanden werden. Somit müssen genotoxisch wirksame Noxen nicht zwangsläufig zu einer Mutagenese führen. Jedoch setzt die Manifestierung der Mutagenese eine genotoxische Wirkung voraus.^[43,44] Ursache von Mutationen sind spontane und ungerichtete (strukturelle) Veränderungen, die einzelne Gene, Chromosomen oder das gesamte Genom betreffen können. Spontane Mutationen können infolge von fehlerhafter Replikation, chemischer Modifikationen der Basen oder strukturellen Veränderungen auftreten, die chemischer (intermediär erzeugte reaktive Teilchen, wie z.B. OH-Radikale oder Elektrophile) oder physikalischer Natur sind (wie Strahlung z.B. natürliche Radioaktivität, UV-Strahlung). Chemische Modifikationen können durch hydrolytische Abspaltung, Oxidation oder Alkylierung einer Base erfolgen.

Genotoxische Substanzen erhöhen dosisabhängig die Spontanmutationsrate, und es treten verstärkt bleibende Veränderungen im Genotyp auf (Mutationen). Daneben gibt es weitere Mechanismen, die zu Mutationen führen können (s. Abbildung 3-3).

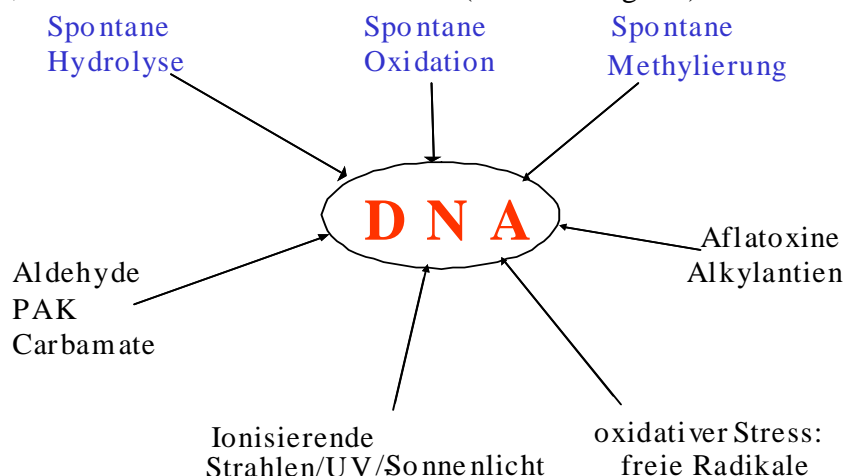


Abbildung 3-3: Schädigende Einflüsse auf die DNA nach^[45]

So kann beispielsweise eine Spontanmutation durch die Imin-Enamin-Tautomerie^[46,47] (vgl. Abbildung 3-4), z.B. des Cytosins hervorgerufen werden, was eine veränderte Basenpaarung zur Folge hat und damit eine Abwandlung der biologischen Information.

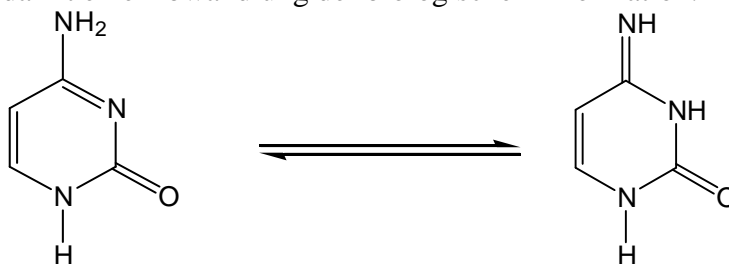


Abbildung 3-4: Imin-Enamin-Tautomerie des Cytosins

3.5. Klassifizierung von Mutationen

Auftretende Mutationen lassen sich nach der Größe des mutierten Bereichs im Genom klassifizieren und werden in Genmutation, Genom- oder Chromosomenmutationen unterschieden. Grundlage der Bakterienmutagenesetests stellen Genmutationen^[41-42,46,48] dar, die entweder als Basenpaarsubstitutionen (Punktmutation) oder als Frameshift-Mutationen (Leserastermutation) auftreten. Die Punktmutation, der Austausch einer einzelnen Base, erfolgt entweder als Transition (Austausch z.B. einer Purinbase gegen eine andere) oder als Transversion (Austausch einer Purinbase gegen eine Pyrimidinbase).

Eine Punktmutation führt nicht zwangsläufig zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz, d.h. im Phänotyp (Erscheinung) des Organismus, da der genetische Code degeneriert ist und Unterschiede von einer Base in der Basensequenz toleriert werden. Durch genetisch modifizierte Bakterienstämme, kann dies mit dem Ames-Test dennoch erkannt werden (vgl. Kapitel 3.7.2.). Frameshift-Mutationen dagegen entstehen durch die Insertion bzw. Deletion eines oder mehrerer Basenpaare, so dass im Falle einer Insertion eine Verschiebung gegenüber der ursprünglichen Basensequenz resultiert.

Dies hat zur Konsequenz, dass völlig neue oder veränderte Proteine entstehen können bis hin zu einem kompletten Verlust des Proteins. Im Falle einer Deletion kann es zu einer Verkürzung der Polypeptidsequenz kommen.

3.6. Mechanismen der DNA-Schädigung – chemische Kanzerogenese

Zu den wichtigsten chemischen Modifikationen eines Nukleotids sind Oxidation oder Alkylierung einer DNA-Base zu zählen. Infolge von z.B. nukleophilen Additionen oder Schiff'sche-Base-Reaktionen kommt es zur Adduktbildung. Dies führt zu sterischen Veränderungen innerhalb der Doppelhelix und so zu Konformationsänderungen. In der Konsequenz kommt es zu einem fehlerhaften oder ausbleibenden Ablesen durch die Polymerasen dieser DNA-Region. Die chemischen Modifikationen der DNA resultieren aus:

- Der Bildung eines Elektrophils (z.B. Epoxide) oder Radikals während des Phase-I Metabolismus, was zu einer elektrophilen Addition am N⁷-Stickstoff, von Guanin bzw. am N³ von Adenin unter Ausbildung von Addukten führt. Zu den Elektrophilen zählen u.a. auch alkylierende Verbindungen (z.B. Dimethylsulfat oder **N-Methyl-N'-nitro**nitrosoguanidin = MNNG), die als sogenannte „direct acting mutagens“ keine Aktivierung durch Enzyme des Phase-I Metabolismus bedürfen und direkt in einer Additionsreaktion mit der DNA reagieren.^[45,47]
- Interkalation von planaren Molekülen (klassische Beispiele sind Ethidiumbromid oder Actinomycin) in die Furche bzw. die Basenpaarungen, was zu einer Konformationsänderung der DNA führt^[46,47]
- Bildung von Thymidin-Dimeren durch UV-Bestrahlung^[46-49] unter Vernetzung der DNA-Stränge sowie
- Bindung an einen Transkriptionsfaktor (Protein) mit nachfolgender Änderung der Konformation.^[50]

3.7. Genotoxizitäts- und Mutagenitätstests

3.7.1. Allgemeines

Das genotoxische Potenzial einer Verbindung kann durch verschiedene biologische Testverfahren und mit unterschiedlichen genetischen Endpunkten überprüft werden. Bislang stehen *in vitro* prinzipiell zwei methodische Ansätze zur Untersuchung auf Genotoxizität zur Verfügung: mikrobiologische Untersuchungsverfahren sowie Testmethoden auf Basis von Säugerzellen.^[51] Die Grundannahme genotoxischer Testmethoden ist die Korrelation zwischen primärer DNA-Schädigung und dem Auftreten von Tumoren. Damit wird vorausgesetzt, dass im Test beobachtete genotoxische Veränderungen in somatischen Zellen zu manifesten malignen Tumoren im entsprechenden Gewebe führen können.

Die Testsysteme lassen sich drei wesentlichen genetischen Endpunkten zuordnen:

- Induktion von DNA-Schäden und –Reparatur,
- Genmutationen und zytogenetische Veränderungen
- In-vitro-Transformationsvorgänge kultivierter Säugerzellen.

3.7.2. Ames-Test

Für den einfachen Nachweis mutagen wirksamer Substanzen benutzte B. Ames^[30] ein genetisch modifiziertes Bakteriensystem, das den Vorteil einer kurzen Generationszeit hatte und empfindlich auf Mutagene reagierte. Das Prinzip des Ames-Test basiert auf einer (Gen-) Mutation im Histidin-Gen von *Salmonella typhimurium*-Stämmen. Diese führten zu einer Histidin Defizienz, so dass diese Bakterien auf Histidin-freiem Agar nicht wuchsen. Erst durch Zusatz eines mutagen wirkenden Agens wie z.B. 2-Nitrofluoren (ohne metabolische Aktivierung) bzw. 2-Aminoanthracen (bei metabolischer Aktivierung, vgl. Abbildung 3-2) kam es zum Wachstum von Kolonien, so dass eine Rückmutation stattgefunden haben musste.^[52]

Darüber hinaus besitzen diese gentechnisch veränderten Bakterienstämme eine Mutation, die zu einem fehlerhaften Aufbau der Zellwand führt und damit die Permeabilität für lipophile Substanzen erhöht. Die Excisions-Mutation dieser Bakterien erzeugt ein funktionsunfähiges Excisionsreparatursystem und verhindert, dass die Bakterienzelle fehlerhafte DNA-Bereiche korrigiert. Man spricht definitionsgemäß nur dann von einer Mutagenität der Testsubstanz, wenn die Koloniezahl mindestens eine Verdopplung gegenüber Negativ- bzw. der Lösungsmittelkontrolle (sogen. Spontanmutationsrate) ergibt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die *Salmonella*-Stämme *S. typhimurium* TA 98 (Leserastermutation), TA 100 (Punktmutation) und TA 1535 (Punktmutation) verwendet.

Die Vorinkubations-Methode unterscheidet sich von der Platten-(oder auch Direkt-) Inkubationsmethode durch eine Vorinkubationszeit, in der die Bakterien mit der Testlösung inkubiert werden, bevor die Lösung auf den Agarplatten ausplattiert wird. Der Vorteil dieser Methode ist, dass eine längere Inkubation der Testsubstanz mit den Bakterien und eine gleichmäßigere Verteilung und Aufnahme der Substanzen durch die Bakterien erfolgt. Diese Methode ist somit gegenüber der Platteninkubationsmethode empfindlicher. Der Vorteil der Direktinkubationsmethode ist, dass diese reproduzierbarere Ergebnisse für Experimente mit S9-Aktivierung liefert.

3.7.3. Arabinose (Ara-) Test

Die Bakterienstämme im Arabinose-Resistenztest weisen eine Deletion im Arabinose-Operon auf. In der Literatur^[53,54,55] wird diskutiert, dass im *araD*-Gen eine Mutation vorliegt, die den Metabolismus von L-Ribulose-5-Phosphat (Abbildung 3-6) durch ein nicht exprimiertes Genprodukt hemmt was bakteriostatisch wirkt, sofern keine Repressoren des *ara*-Operons wie D-Glukose vorhanden sind.^[53] Als einzige Kohlenstoffquelle wird Glycerin beigefügt, so dass eine Repression des *ara*-Operons (Abbildung 3-5) nicht erfolgt und ausschließlich Mutanten wachsen können.

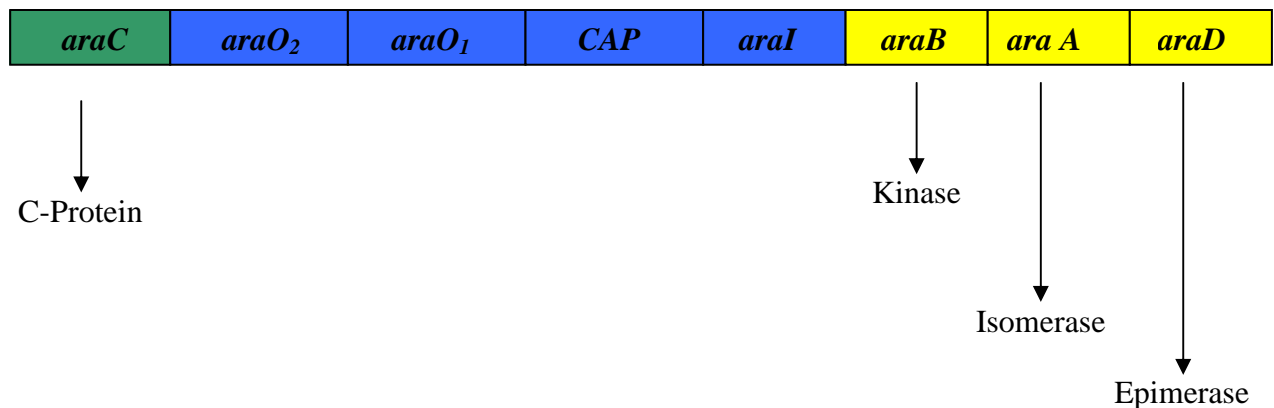


Abbildung 3-5 Arabinose-Operon. *araC*: Regulatorgen; *araO_{1,2}*, *CAP*, *araI*: Kontrollgene; *araB*, *araA*, *araD*: Strukturgene mit entsprechenden Genprodukten^[47,56]

Das Auftreten von Arabinose-resistenten Zellen basiert auf Vorwärtsmutationen, die dazu führen, dass der Arabinose-Metabolismus an einer früheren Stelle gehemmt wird. Für die Hemmung kommen die Strukturgene *araA* und *araB* in Betracht (vgl. Abbildung 3-5), die für L-Arabinose-Isomerase bzw. L-Ribulose-Kinase codieren.

Zusätzlich wird das Operon durch das Regulatorgen *araC* reguliert, welches das gesamte Operon abschaltet, wenn die Synthese des Aktivators (Arabinose) ausbleibt. Übergänge von Arabinose-empfindlichen zu Arabinose-resistenten Zellen spiegeln also Vorwärtsmutationen wieder, die eine Folge von Missense- und Nonsense-Basensubstitutionen als auch von Frameshift-Mutationen sein können.^[53]

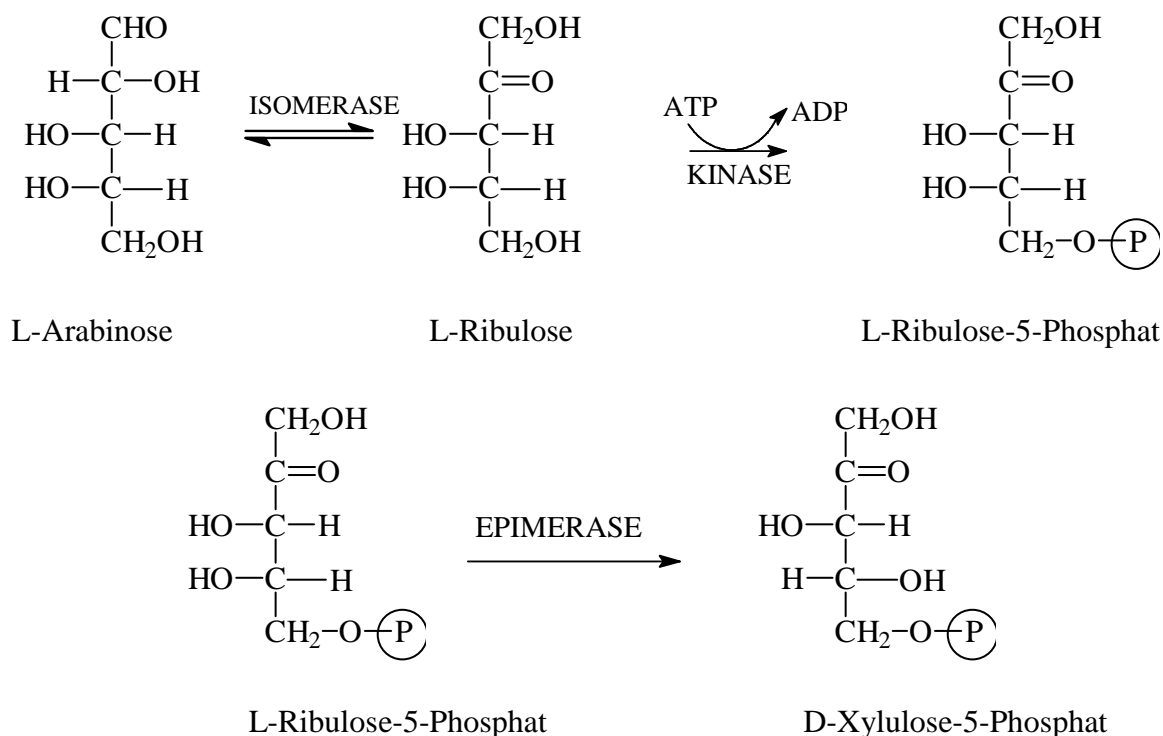


Abbildung 3-6 Stoffwechsel der Arabinose in *E. coli* mit den Enzymen, den Genprodukten des Arabinose-Operons^[47,56]

Ara-Mutanten können also durch Mutation im *araB* und *araD* Gen überleben, da durch eine Mutation der Arabinosestoffwechsel umgangen wird. In nicht-mutierten Zellen wirkt die Arabinose bakteriostatisch und die Zellen gehen zugrunde. Eine Vorwärtsmutation spiegelt also die Ausbildung einer Resistenz wieder. Für die Untersuchungen mit dem Ara-Test wurden *Escherichia coli* Stämme des Typs UC 1121 verwendet. Der Stamm UC 1121 (wildtyp) besitzt eine *rfa*-Mutation, die die Zellwandpermeabilität erhöht, sowie eine Mutation des Gens für die Excisionsreparatur.

3.7.4. Ames- und Arabinose-Test – ein Vergleich

Die Gemeinsamkeit beider Testsysteme ist, dass die Selektion auf Mutanten erfolgt, deren Erscheinen im Phänotyp eine Folge von DNA-Veränderungen ist, die auf einer Rück- (Ames-Test) bzw. Vorwärtsmutation (Ara-Test) im Genom basiert. Vorteil des Rückmutationssystemes ist seine genetisch bedingte Spezifität, da nur ein einzelnes Gen rückmutiert. Durch die Wahl entsprechend modifizierter *S. typhimurium* Stämme im Ames-Test lässt sich der Mutationstyp, also Punkt- oder Leserastermutation, unterscheiden.^[41,52] So kann die mutagene Wirkung einer Substanz im Testsystem gezielt spezifiziert werden.

Die Vorwärtsmutationen sind dagegen sehr unspezifisch ausgerichtet, da Mutationen auf mehrere Gene umfassenden DNA-Abschnitten erfolgen können. Da hierfür unterschiedliche Mutationstypen in Frage kommen können, ist eine Unterscheidung zwischen Punkt- und Leserastermutation mit diesem Testsystem nicht möglich. Vorteil dieses Testsystems gegenüber dem Ames-Test ist die wesentlich höhere Empfindlichkeit gegenüber Mutagenen, da eine Mutation auf unterschiedlichen Genabschnitten erfolgen kann. Wie die Arbeiten von B. Ames^[57,58] weiter zeigten, sind alle Kanzerogene mutagen wirksam. Der Umkehrschluss dagegen ist nicht zwingend gültig, da auch nicht mutagene Kanzerogene gefunden wurden, zu denen die Tumorpromotoren zählen.

Sequenzen, die sogen. **Dioxin-responsive Elements (DRE)**, und aktiviert in der Folge eine Genbatterie, die ihrerseits zur Aktivierung/Expression der Cytochrom P450 Enzyme führt. Die Konzentration der gebildeten Deethylase im EROD-Test wird auf die Proteinmenge der Zelle bezogen, einem Indikator für die Schädigung der Zelle durch die untersuchten Substanzen.

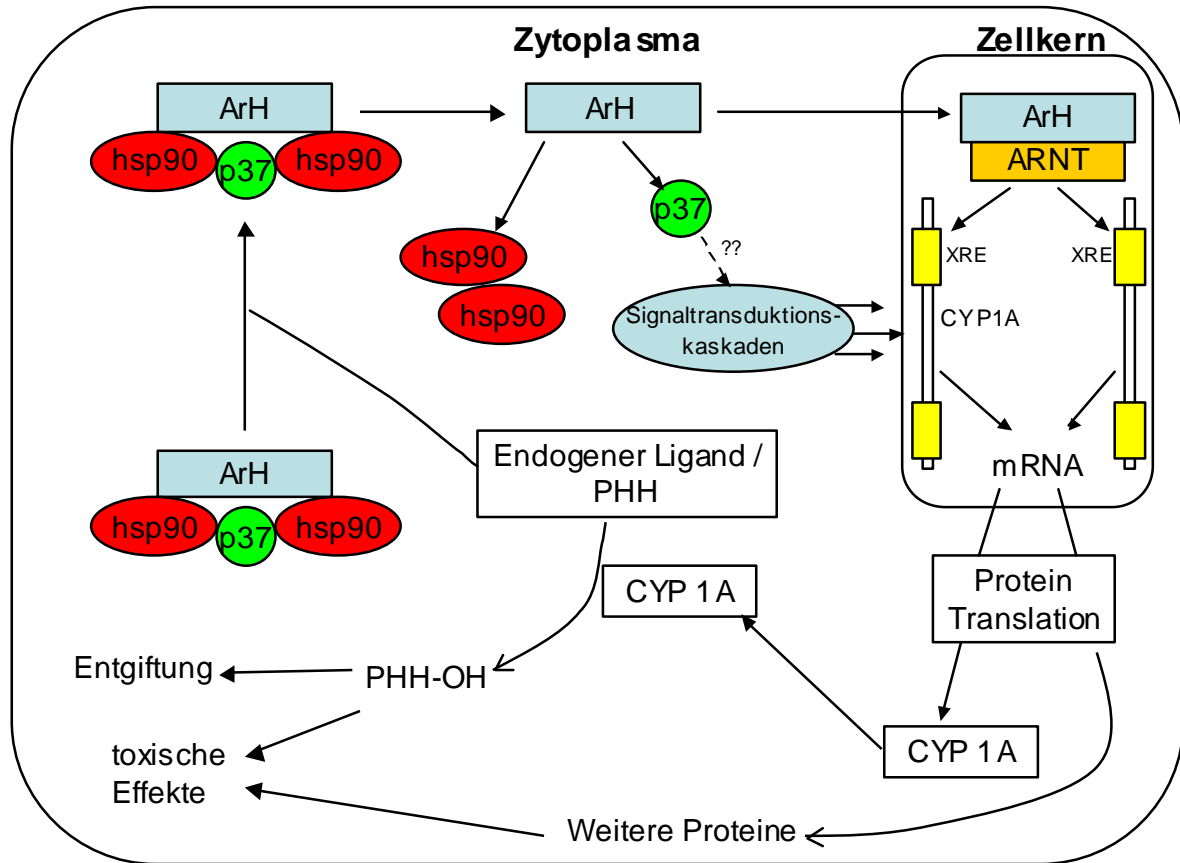


Abbildung 4-2 Induktion von EROD bzw. CYP 1A1 modifiziert n. Jeff J. Whyte and Donald E. Tillitt [62]

5. Östrogene Wirkungen

Die Untersuchung östrogen wirksamer Substanzen in der Umwelt ist nicht nur durch ihre endokrin wirksamen Eigenschaften begründet, sondern östrogene Wirkungen stehen in engem Zusammenhang mit der chemischen Kanzerogenese.^[63] Ähnlich wie die Tumorpromotoren, die zur Klasse der epigenetischen Kanzerogene zählen und deren Wirkungen nicht auf strukturellen (genotoxischen) Veränderungen der DNA beruhen, sind auch die endokrin wirksamen Substanzen zu dieser Gruppe zu zählen. Zunächst werden die Testmethoden zur Erfassung der endokrinen Wirkung und die Biochemie der endokrinen Wirkung kurz dargestellt. Abschließend wird kurz auf deren Zusammenhang mit der chemischen Kanzerogenese (vgl. Kap. 5.1.) sowie auf die ökologische Bedeutung endokrin wirksamer Substanzen (vgl. Kap.5.2) eingegangen.

5.1. Mechanismus östrogenen Wirkung

Im Gegensatz zu den übrigen Signalstoffen (z.B. Acetylcholin, Adrenalin), deren biologische Wirkung rezeptorvermittelt über eine Signaltransduktionskaskade im Zellinneren übertragen und gleichzeitig verstärkt wird, erfolgt die (hormonelle) Wirkung lipophiler Signalstoffe wie dem Cortisol oder Östradiol direkt im Zellkern der Zielzelle, da es die Zellmembran passieren kann.^[45,47] Nach Bindung des Steroids an den nucleären Rezeptor binden diese als Homo- bzw. Heterodimere an Kontrollelemente (**E**strogen **R**esponsive **E**lement) im Promotor des entsprechenden Gens und regulieren so als Transkriptionsfaktoren die Genexpression. So lässt sich über die Glucocorticoidkonzentration (Cortisol) im Blut die Enzymmenge in der Gluconeogenese regulieren (hormonelle Regulation der katabolischen Enzyme).

Die hormonellen Rezeptoren ER α bzw. ER β werden allosterisch reguliert, d.h. nach Bindung des Östrogens kommt es im Rezeptor zur Konformationsänderung. Die Unterschiede in der Peptidsequenz der Rezeptoren gibt Abbildung 5-1 wieder.

Wichtig hervorzuheben ist hierbei, dass die höchste Übereinstimmung der Proteinsequenz beider Rezeptoren sich in der DNA-Bindungsdomäne befindet. Diese (hochkonservierte) Bindungsdomäne besteht aus einem Zinkfinger, der an palindromische DNA-Sequenzen des Promotors bindet.^[45]

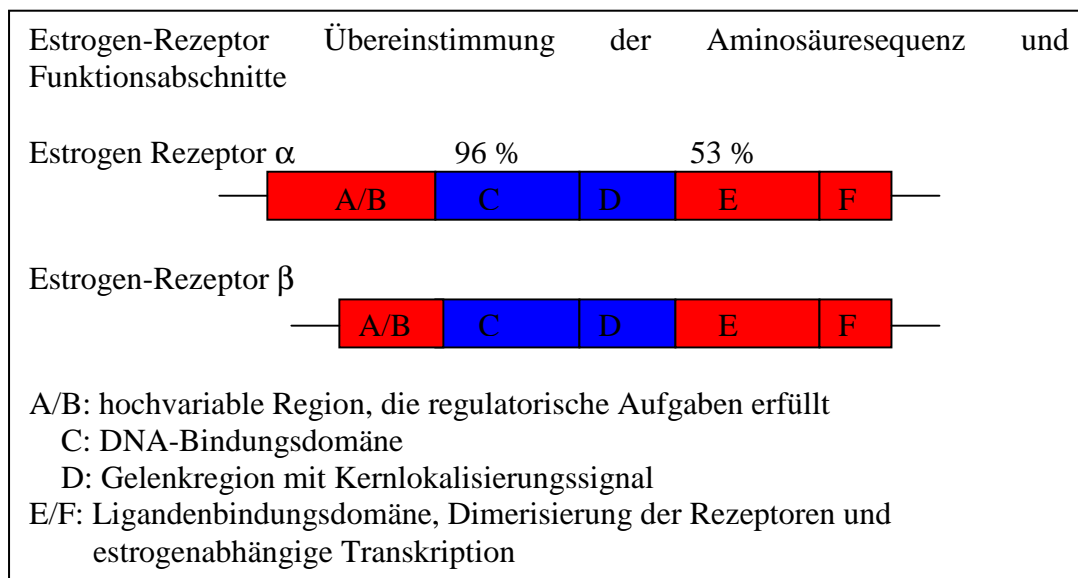


Abbildung 5-1: Proteinkartierung der Estrogenrezeptoren^[45]

In der medizinischen Literatur werden häufig Fälle von Brust- bzw. Gebärmutterkrebs nach einer Hormontherapie diskutiert^[64] und daher ein kausaler Zusammenhang zwischen östrogenen Wirkung und Kanzerogenese aufgezeigt. Im Zusammenhang mit Xenoöstrogenen besteht der Verdacht, dass diese an der Entstehung hormonabhängiger Erkrankungen (Brustkrebs, Hodendkrebs) sowie Störungen der Fruchtbarkeit beteiligt sind. Ein kausaler Zusammenhang zwischen einer mutagenen und der östrogenen Wirkung konnte speziell für das Diethylstilböstrol nachgewiesen werden.^[65]

5.2. Ökologische Relevanz von Xenoöstrogenen

Zu den sogenannten endokrin wirksamen Substanzen zählen neben Phytoöstrogenen, wie z.B. Flavonoiden, auch eine Reihe von Umweltchemikalien, wie Alkylphenolethoxylate (APEOs) bzw. deren Abbauprodukte (z.B. Nonylphenol) sowie Brandschutzmittel wie die Tetrabrombisphenylether oder PCBs.^[26,41] Tabelle 5-1 gibt einen Überblick über die östrogen-aktiven Substanzen und deren technische Verwendung. Wie aus dieser Zusammenfassung hervorgeht, sind die „endocrin disruptors“^[66] ausgesprochen heterogen und dadurch nicht ohne weiteres einer bestimmten Stoffklasse zuzuordnen.

Substanz	Verwendung
Alkylphenole	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Detergenzien, Industriewaschmittel ▪ Antioxidationsmittel in Kunststoffen ▪ Körperpflegemittel
Bisphenol A	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Konservendosen ▪ Zahnfüllungen aus Kunststoff ▪ Polycarbonate und Epoxidharze
Chlorierte Verbindungen wie PCBs, Dioxine	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hydrauliköle ▪ Kontaminanten in fetthaltigen Produkten
Ethinylöstradiol Pentachlorphenol (PCP)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bestandteil von oralen Kontrazeptiva ▪ Holzschutzmittel, Lederwaren
Pestizide, wie DDT & Metabolite	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Trinkwasser (Atrazin) ▪ Kontaminanten in fetthaltigen Lebensmitteln ▪ Boden, Wasser
Phthalate	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kunststoffe ▪ Lebensmittelverpackungen ▪ Klebstoffe ▪ Emulsionsfarbstoffe,.....
Tributylzinn	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Anstrich an Schiffen ▪ Katalysatoren für die Kunststoffproduktion ▪ Antimikrobielle Sportbekleidung

Tabelle 5-1 Vorkommen von östrogen-wirksamen Verbindungen^[67]

5.3. Östradiol-Verdrängungsassay und Luciferase-Testsystem

Zur Erfassung der östrogenen (endokrinen) Wirkung gibt es verschiedene Testmethoden (z.B. E-Screen^[68], Yeast-Screen Assay^[69], alkalische Phosphatase-Assay^[70]), von denen in dieser Arbeit der Östradiol-Verdrängungsassay, dessen Testprinzip die kompetitive Bindung zweier konkurrierender Verbindungen am Östrogenrezeptor darstellt, sowie der Luciferase-Assay (in MVLN-Zellen, s.u.), der biologische Aktivität innerhalb der Zelle anzeigt, verwendet wurde. Der Unterschied beider Testsysteme liegt in der biologischen Aussage des Ergebnisses. Während im Östradiol-Verdrängungsassay lediglich eine Aussage über die Affinität einer Substanz zum Östrogenrezeptor getroffen werden kann, erlaubt der Luciferase-Test eine Aussage darüber, ob eine Substanz agonistische oder antagonistische Wirkungen in der Zelle entfaltet und liefert damit eine Aussage über die Effektivität der Rezeptoraktivierung nachgeschalteten Schritte der Signaltransduktion. So kann z.B. der maximale Effekt eines Agonisten schon bei Besetzung nur eines Bruchteils der Rezeptoren erfolgen.

Die Grundlage des Östradiol-Verdrängungsassays ist die „Gleichgewichtskurve“ zweier Substanzen am Östrogenrezeptor, die aus der unterschiedlichen Affinität dieser Stoffe zum Rezeptor resultiert. Voraussetzung für eine kompetitive Verdrängung ist zunächst eine vollständige Absättigung der Rezeptoren mit ³H-markiertem Östradiol, das durch die konkurrierende Verbindung von dem Rezeptor verdrängt wird. Gemessen wird schließlich die Menge an ³H-Östradiol, die durch den Kompetitor aus dem Rezeptor verdrängt wurde. Diese wird schließlich ins Verhältnis gesetzt zu der Menge an gebundenem ³H-Östradiol der Negativkontrolle. Eine Substanz ist somit umso stärker "östrogen" wirksam, je größer der Anteil an verdrängtem Östradiol und damit die detektierte Menge an ³H-markiertem Östradiol sind. Als östrogen wirksame Substanz (Positivkontrolle) wird Diethylstilbestrol (DES) verwendet, das eine definierte Menge ³H-Östradiol aus dem Estrogenrezeptor verdrängt.

Diese Testmethode wird allgemein als Östradiol-Verdrängungsassay bezeichnet. Der Luciferase-Assay verwendet genetisch modifizierte Mammakarzinomzellen (MCF-7, Michigan Cancer Foundation), die nach Einfügen des Reportergens in der Lage sind, Luciferase zu exprimieren. Dies setzt innerhalb der "Indikatorreaktion" Luciferin zu Oxyluciferin um, und das emittierte Licht wird gemessen (Abbildung 5-2). Diese genetisch modifizierten Zellen werden als MVLN Zellen bezeichnet.

Durch die Bindung einer östrogenaktiven Substanz an den humanen Östrogenrezeptor, der als Komplex an das **E**strogen **R**esponsive **E**lement (ERE) der DNA bindet, erfolgt die Regulation des Luciferasegens und bewirkt so dessen Expression. Gemessen wird die Chemolumineszenz der Luciferasereaktion, die der Menge an gebildeter Luciferase und damit der östrogenen Aktivität der Testsubstanz proportional ist.

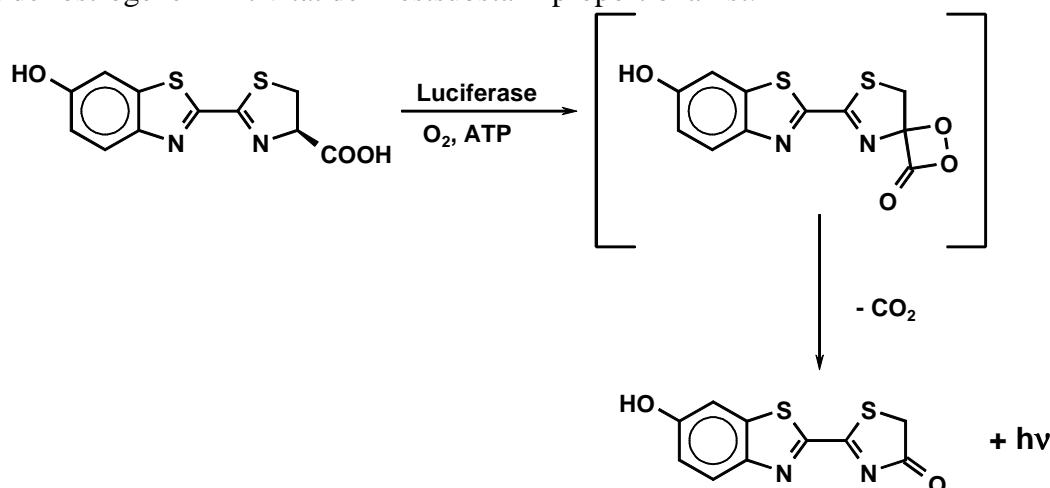


Abbildung 5-2: Detektionsprinzip des Luciferase-Tests

6. Geographie der Probenahme-Regionen

Im Folgenden wird eine Darstellung der geographischen Hintergründe der im Rahmen der Messkampagnen beprobten Regionen angegeben. Darüber hinaus werden Besonderheiten der Region im Kontext genauer beleuchtet.

6.1. Geographie des Taihu (Großer See), Region Shanghai

Die Region Shanghai zählt zu den wirtschaftlich sich am schnellsten entwickelnden Gebieten Chinas. Als Hauptkontaminationsquellen des Taihus sind neben Haushaltsabwässern, die ohne Klärung direkt eingeleitet werden, auch Abwässer aus landwirtschaftlichen Betrieben sowie aus Industrien (chemische und Papierindustrie) zu nennen. Diese Einträge tragen zu einer starken Eutrophierung bei, welche durch chemische Düngemittel und Futterreste aus der landwirtschaftlichen Tierhaltung verstärkt wird.^[71, 72] Der Taihu ist Chinas drittgrößter Süßwassersee^a mit einer Fläche von ca. 2400 km² und einer durchschnittlichen Tiefe von 2 Metern. In der Region des Taihus leben mehr als 34 Mio. Menschen. Diese Region zählt zu den am dichtesten bevölkerten Gebieten Chinas. Landesweit hat dieses Gebiet das höchste Urbanisierungsniveau. So hat die nahegelegene Stadt Wuxi eine Einwohnerzahl von über 4 Millionen Menschen. Die Region umfasst die Provinzen Jiangsu, Zhejiang und Anhui und die regierungsunmittelbare Stadt Shanghai (Abbildung 6-1).^[73]

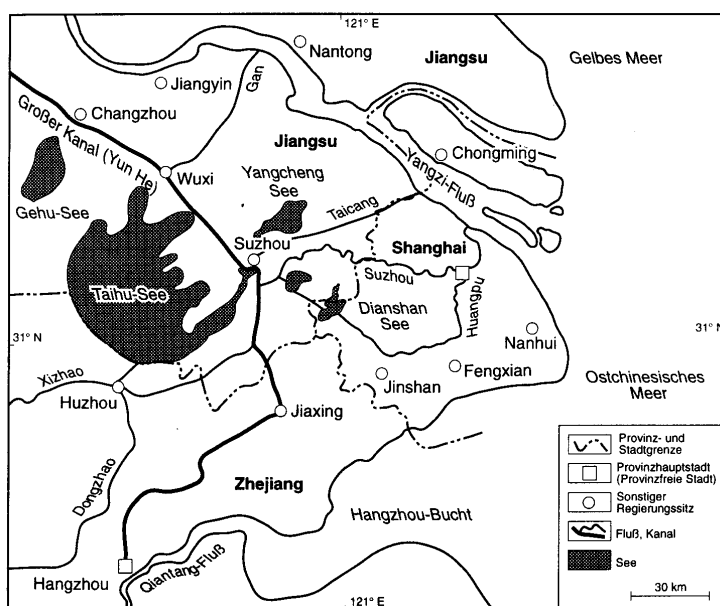


Abbildung 6-1: Geographische Lage des Taihus^[73]

In den Städten Wuxi und Suzhou werden 80% des Wassers für den täglichen Gebrauch aus diesem See verwendet. Die Zunahme des Algenwachstums infolge der Eutrophierung des Sees führte zu einem Anstieg von Fäulnisprodukten. Infolgedessen wurde die tägliche Wasserversorgung der Stadt Wuxi um 25% reduziert und für 116 Fabriken die Produktion ganz oder teilweise eingestellt.^[74]

^a Geographische Koordinaten: ~ 31°12'03,44" (Nord) und 120° 08'25,32" (Ost)

6.2. Sedimentproben des Taihus

Die Probennahme im Taihu geschah durch die Arbeitsgruppe von Prof. Jianhua Shen (Chinesische Akademie der Wissenschaften, Shanghai), mit dem uns eine Zusammenarbeit verband, die vom BMBF finanziert wurde. Die Abbildung 6-2 zeigt die Probenahmestellen, von denen die Proben #0, #5 und #6 aus der Region der höchsten Eutrophierung des Taihus stammen. Die Probenahmestelle #0 liegt in der Nähe der Stadt Wuxi und damit in einem der am stärksten belasteten Gebiete des Sees. Die übrigen Proben #1, #6, #9 und #12 stammen aus weniger stark belasteten Gebieten. Die Sedimentproben wurden vor Ort genommen und lagen als gefriergetrocknete Proben vor, die in Hamburg extrahiert und im Bakterienmutagenesetest untersucht wurden (vgl. Kap. 15).

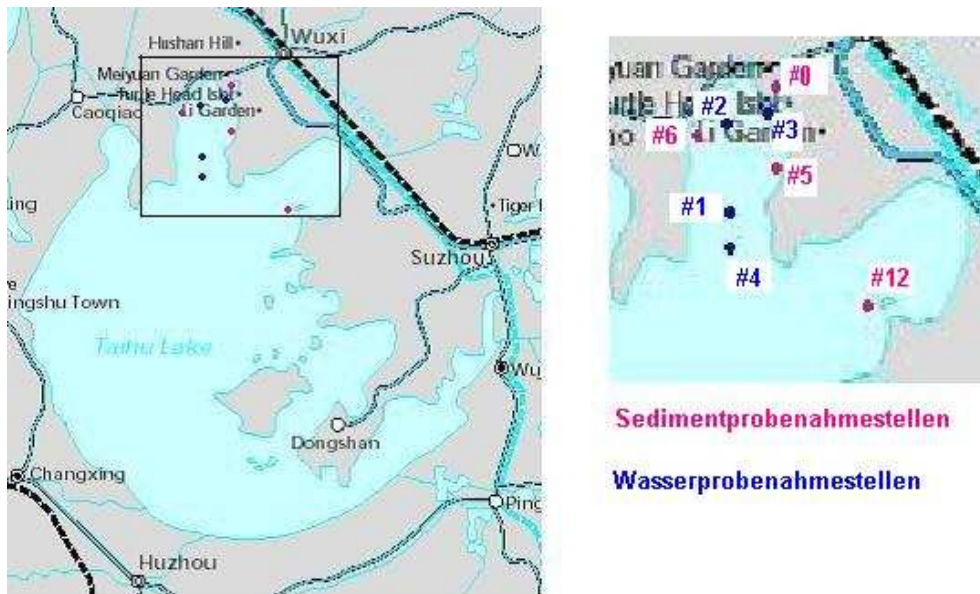


Abbildung 6-2 Probenahmestellen Taihu

6.3. Geographie des Raumes Bitterfeld-Wolfen (Mulde)

Die Mulde ist ein linkselbisch gelegener, nicht schiffbarer Fluss und beginnt ihren Lauf am Zusammenfluss der beiden Quellflüsse Zwickauer Mulde und Freiburger Mulde ca. 5 km nördlich von Colditz (Sachsen) (Abbildung 6-3).

Auf ihren 143 km bis zur Mündung in die Elbe bei Dessau sperren 11 Wehre und die Staumauer des Mulde-Stausees bei Bitterfeld ihren Weg. Der Stausee ist durch das Fluten eines Braunkohlen-Tagebaus entstanden und etwa 6 km lang. Die Region Bitterfeld-Wolfen ist seit gut einem Jahrhundert durch eine Vielzahl dort angesiedelter Unternehmen der chemischen Industrie bekannt. Auf einem Areal von ca. 1200 ha haben sich fast 350 unterschiedliche Firmen (z.B. Hüls, Bayer, Akzo Nobel, etc.) angesiedelt.



Abbildung 6-3: Die geographische Lage der Mulde (Dessau) als Zufluss zur Elbe

6.4. Wasser und Sedimentproben der Mulde

Bei den Wasserproben BVV 473-515 handelt es sich um Brunnenproben, die aus dem Raum Bitterfeld-Wolfen stammen. In Abbildung 6-4 ist die Probenahmeregion dargestellt und die Probennummern den entsprechenden Probenahmestellen zugeordnet.

Allgemeiner Teil

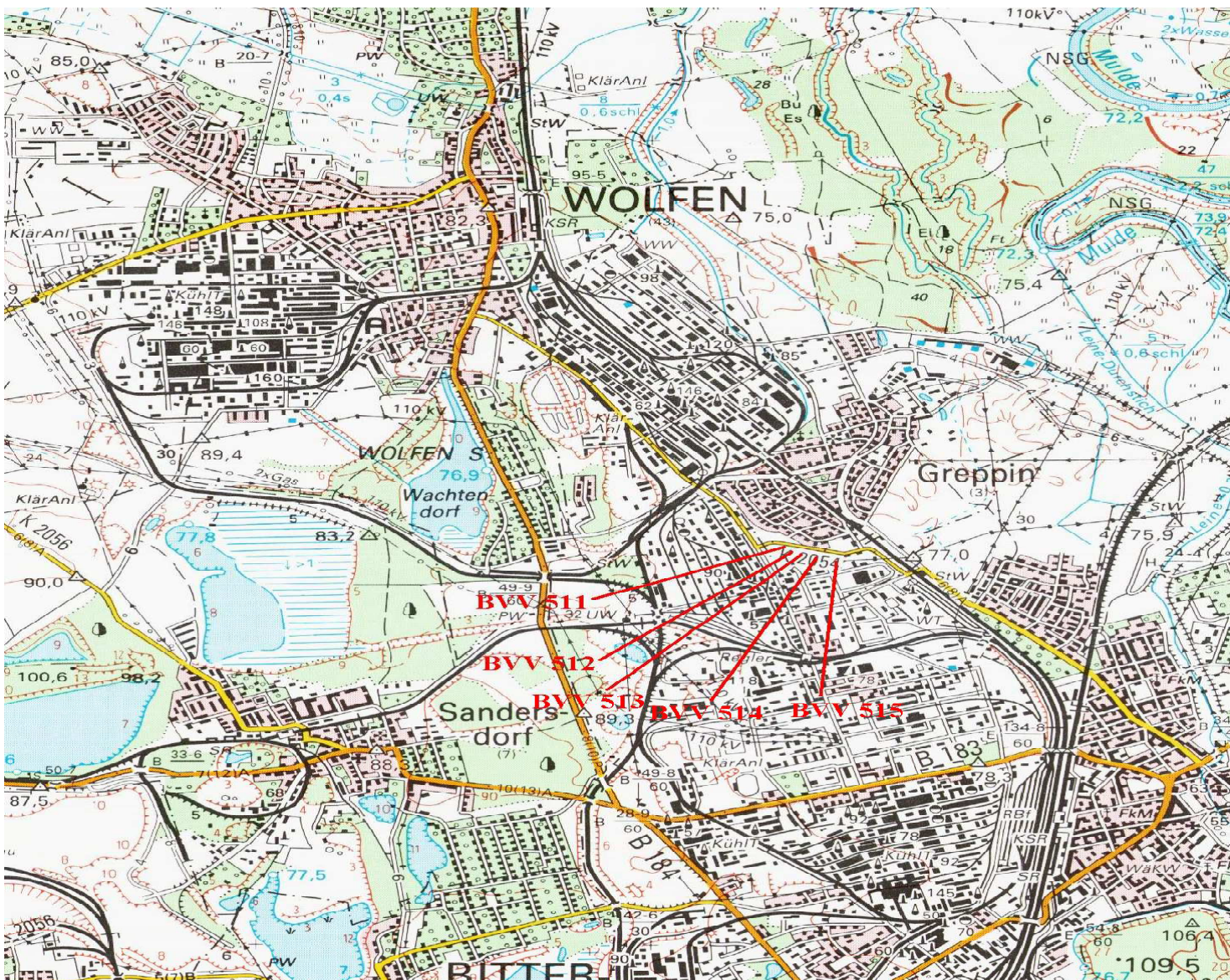


Abbildung 6-4: Probenahmestellen der Grundwasserproben^[75]

Die räumliche Einordnung der Probenahmestandorte für die Sedimentproben mit den Bezeichnungen 403.628.027-.042 (vgl. Tabelle 15-2, S.238) kann anhand der markierten Stellen (Abbildung 6-5) nachvollzogen werden. Im Folgenden werden nur die letzten drei Ziffern zur Bezeichnung verwendet, also bedeutet z.B. S032 das Sediment mit der Probennummer 403.626.032.

Allgemeiner Teil

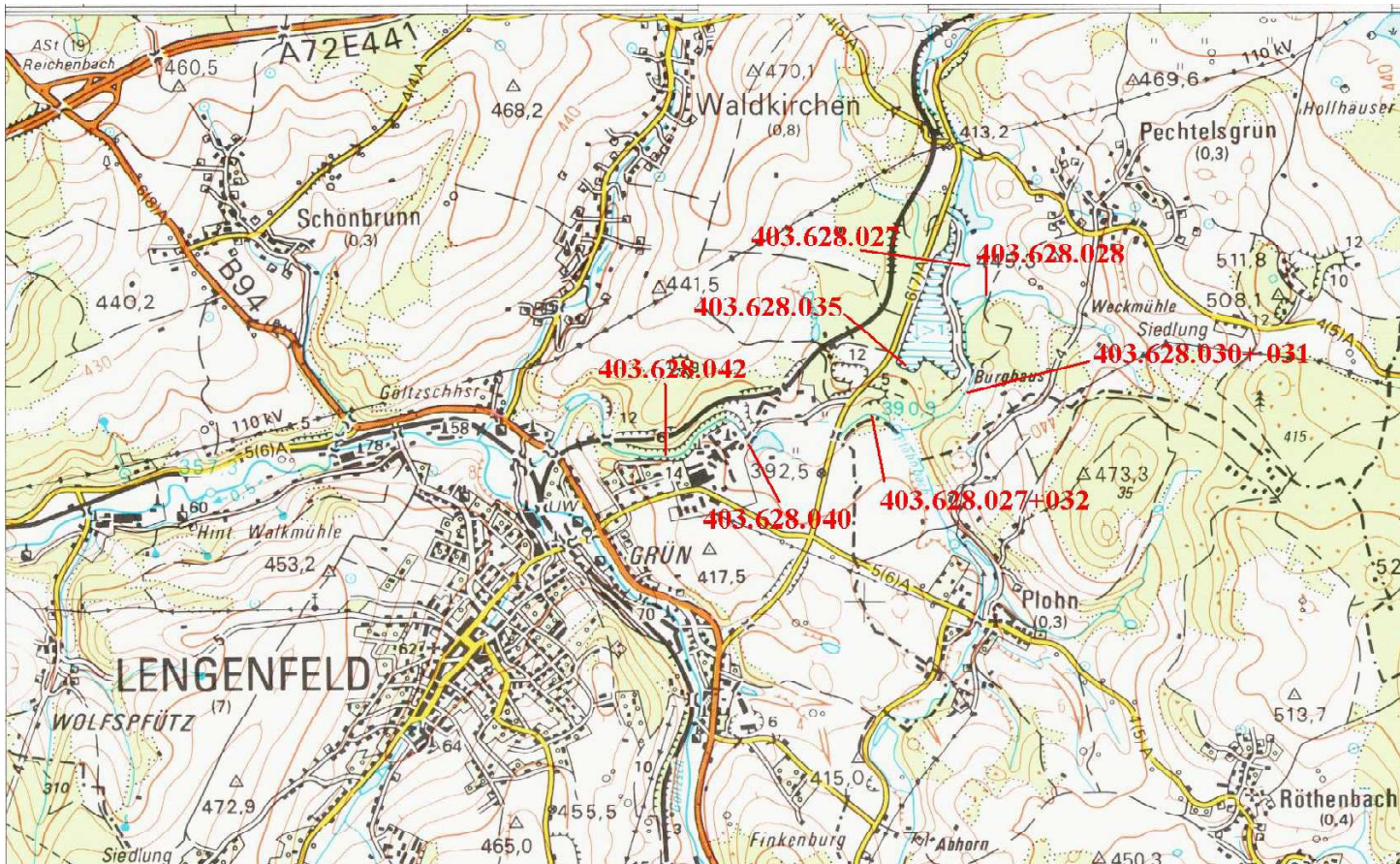


Abbildung 6-5: Probenahmeorte der Sedimentproben 403.628.027-.042^[75]

7. Analytik von Sedimenten

7.1. Probenvorbereitung

Die Homogenisierung der Probe ist der erste Schritt der Probenvorbereitung, der insbesondere bei Feststoffproben eine bedeutsame Fehlerquelle darstellt. Sedimentproben, die im Prinzip als Feststoffproben anzusehen sind, werden zur Homogenisierung auf eine definierte Korngröße gesiebt.^[76] Man erhält dadurch eine repräsentative Probe, in der der Analyt gleichmäßig verteilt vorliegt.^[77] Die in dieser Arbeit untersuchten Feuchtsedimente (Mulde) wurden zuvor auf die konventionelle Korngröße von 2 mm gesiebt.

Die Wahl des Lösungsmittels hat mit Sorgfalt zu erfolgen, um die Inhaltsstoffe der Probe vollständig zu erfassen. Prinzipiell bedeutet die Verwendung ausgewählter Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische auch gleichzeitig eine Festlegung auf mit diesen extrahierbare Substanzen entsprechender Polarität und bewirkt somit eine Einschränkung. Dieser kann jedoch durch mehrfache Extraktion mit unterschiedlichen Lösungsmitteln begegnet werden. Alle diese Gesichtspunkte müssen Berücksichtigung finden für den Nachweis mutagener Substanzen.^[78]

In diversen systematischen Untersuchungen wurden die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Extraktionsmethoden^[79,80,81] herausgearbeitet. Zur Isolierung potenziell genotoxisch wirksamer Sedimentinhaltsstoffe wurden, in Anlehnung an Biselli^[82] und Schwarzbauer^[35], in dieser Arbeit die Sedimente sequentiell im Soxhlet mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität extrahiert. Abweichend davon wurde zur Gewinnung eines Primärextrakts der Feuchtsedimente ein Aceton-Hexan-Gemisch 1:1 (v/v) verwendet. Der Primärextrakt des getrockneten chinesischen Sediments wurde dagegen durch Extraktion mit Dichlormethan gewonnen.

Der Sekundärextrakt wurde durch Verwendung von Ethylacetat bzw. Ethanol erhalten, um auch polarere Substanzen zu erfassen. Wie auch schon andere Arbeiten zeigten^[78,83,84], konnte bei Verwendung von Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität ein signifikanter Unterschied in der mutagenen Wirkung der Extrakte gefunden werden. Darüber hinaus konnten ebenfalls Unterschiede in der Induktionsstärke im EROD-Test aufgezeigt werden.

Die Reinigung (sog. Clean-up) des gewonnenen Extraktes hat zum Ziel, die Detektion störende Matrixbestandteile wie z.B. Chlorophylle oder Huminsäuren weitestgehend vom Analyten abzutrennen. Als Methode, die eine nahezu verlustfreie und unveränderte Abtrennung der Analyten von der Matrix gestattet, wurde die Größenausschlusschromatographie (GPC = Gel Permeations Chromatographie^a) als zweckmäßig erachtet. Die GPC beruht auf der Trennung von Molekülen aufgrund ihrer unterschiedlichen hydrodynamischen Radien und unterliegt (in erster Näherung) im Gegensatz zu den übrigen Methoden der Flüssigchromatographie keinen physikalischen Wechselwirkungen mit der stationären Phase. Mittels GPC wird neben der Abtrennung der oben genannten Matrixbestandteile auch eine Entschwefelung der Probe erzielt. Untersuchungen mit dem Leuchtbakterientest ergaben, dass der Einfluss des Schwefelgehaltes für die Untersuchung der Toxizität der Proben relevant ist.^[85] Einen Einfluss auf die Induktionsrate im Arabinoseresistenz-Test wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben.

Für die GPC-Fraktionierung wurde eine Glassäule mit einer BioBeads[®]-Phase (im Folgenden als Säulenbett bezeichnet) und höhenverstellbaren Anschlüssen, zwischen denen das Säulenbett eingespannt war, verwendet. Wie sich nach längerer Benutzung der Säule zeigte, musste eine Nachjustierung der Anschlüsse an das Säulenbett vorgenommen werden, da dieses nach längerem Gebrauch zusammensackte.

^a Auch SEC, von Size Exclusion Chromatography, genannt

Die Nachjustierung erfolgte durch Angleichen der Stempel mit der neuen Oberfläche des Säulenbetts. In Folge dessen kam es zu einer Verkürzung der Verweilzeiten des Chlorophylls auf der Säule. Die Fraktionierung orientierte sich an der Verweilzeit des Chlorophylls auf der Säule, die mit Hilfe eines Chlorophyllstandards kalibriert wurde.

Die Fraktionierung aller Sedimentextrakte lieferte stets drei Fraktionen:

- Die VORFRAKTION enthält Komponenten, die vor dem Chlorophyll von der Säule eluieren (=hochmolekular).
- Die HAUPTFRAKTION enthält Chlorophylle und Huminstoffe
- Die NACHFRAKTION enthält Komponenten, die eine längere Verweilzeit als das Chlorophyll aufweisen (=niedermolekular).
- Die Nachfraktion wurde in einigen Fällen weiter unterteilt (s. 8.3.1.)

7.2. Identifizierung von Einzelsubstanzen

In dieser Arbeit wurden zur qualitativen Untersuchung der Extraktzusammensetzung hauptsächlich leichtflüchtige Komponenten untersucht. Der Grund für diese Beschränkung lag vor allem im Vorliegen einer umfangreichen Massenspektrenbibliothek. Eine Identifizierung mit Hilfe von Fragmentierungsmustern sowie Retentionszeiten war damit gegeben. Voraussetzung für die Gaschromatographie (und damit ebenso für die GC/MS) ist, dass die Probe, gegebenenfalls nach Derivatisierung, unzersetzt verdampfbar ist. Artefaktbildungen, wie sie z.B. durch hohe Temperaturen am Injektionsport entstehen können, sind jedoch nicht ausgeschlossen.

Die Massenspektren der Analyten wurden mit der Massenspektrendatenbank MassLib^[86] verglichen und als bekannt bzw. unbekannt zugeordnet.

Darüber hinaus erfolgte die Identifizierung der Inhaltsstoffe durch den Vergleich der Retentionszeiten mit denen von authentischen Referenzsubstanzen.^[87,88,89] Als identisch zu einer authentischen Referenzsubstanz erachtet wird eine Substanz, wenn ihr Massenspektrum identisch ist mit dem der Referenzsubstanz und beide Substanzen identische Retentionszeiten (Co-Injektion) an unterschiedlichen GC-Phasen aufweisen. Lässt sich dem Analyten kein Referenzspektrum aus der Spektrenbibliothek zuordnen, so muss dieser, basierend auf einem plausiblen Strukturvorschlag, synthetisiert und spektroskopisch charakterisiert werden.

7.3. Analytisch-toxikologische Qualitätsaspekte

Die Anforderungen an die Reinheit der Geräte sind für toxikologische Untersuchungen anders als bei analytisch-chemischen Arbeiten. Daraus ergeben sich auch Unterschiede in den Ansprüchen der Nachweisgrenzen, die durch biologische bzw. chemische Kontaminationen limitiert sind. Generell lässt sich jedoch festhalten, dass die Empfindlichkeit der instrumentellen Methoden für den chemischen Nachweis weitaus höher ist. In der Toxikologie dagegen ist die Einhaltung steriler Arbeitsbedingungen erforderlich, wobei dies von der Empfindlichkeit des Organismus abhängig ist. Bakterielle Testsysteme erfordern z.B. keine so aufwändigen Sterilisationsmaßnahmen wie Testsysteme auf Basis von Geweben oder Säugerzellen. Es wurde deshalb ein Kompromiss geschlossen, dem die Reinheit der verwendeten Geräte den Anforderungen für analytische und toxikologische Arbeiten gleichermaßen gerecht wurden (siehe Kapitel 15.1.).

Zur statistischen Absicherung der toxikologischen Ergebnisse wurden für jede eingesetzte Konzentrationsreihe mindestens drei Parallelversuche (Freiheitsgrad $n=3$), d.h. Wiederholungen unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

Bei nicht zu großer Abweichung der Messwerte (Zählungen) der Koloniezahlen, die als normalverteilt angenommen wurden, wurde das arithmetische Mittel nach

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n}$$

ermittelt und die Standardabweichung der Stichprobe, nach $s = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$

berechnet und als Fehlerbalken dargestellt. Prüfungen auf Ausreißer wurden nicht unternommen, sondern bei großen Abweichungen von Einzelmesswerten zu den übrigen der Messreihe, die Messung wiederholt. Die zur Extraktion verwendeten Lösungsmittel wurden im entsprechenden Experiment als Kontrolle mitgeführt. Ebenfalls geprüft wurde das im Test eingesetzte Lösungsmittel.

7.4. Strategie toxizitätsgeleiteter Analytik

Aus den bislang genannten Gründen ergab sich als Anforderung an die zu wählende Probenvorbereitungsmethode, dass diese die unbekannt mutagenen Komponenten so unselektiv wie möglich aus dem Sediment anreichert und dass die zu wählende Auftrennungsmethode diese Komponenten unverändert belässt (Abbildung 7-1). Im Gegensatz zu den bislang veröffentlichten Arbeiten, in denen für das jeweils einzusetzende Biotestverfahren^[38,84] ein Lösungsmittelwechsel zu erfolgen hat, um daraus resultierende toxische Effekte zu unterbinden und die Matrix bzw. Testprobe an die jeweiligen Testbedingungen des Biotests zu adaptieren, wurde in dieser Arbeit von Beginn an der toxikologischen Testmethode der Vorrang derart gewährt, dass die Extrakte nach der Extraktion in einem für das biologische Testsystem kompatiblen Lösungsmittel gelöst wurden. Dazu wurden die Proben zur Trockne eingedampft und in einem definierten Volumen Ethanol, das für das Testsystem ein tolerables Lösungsmittel darstellt, gelöst.

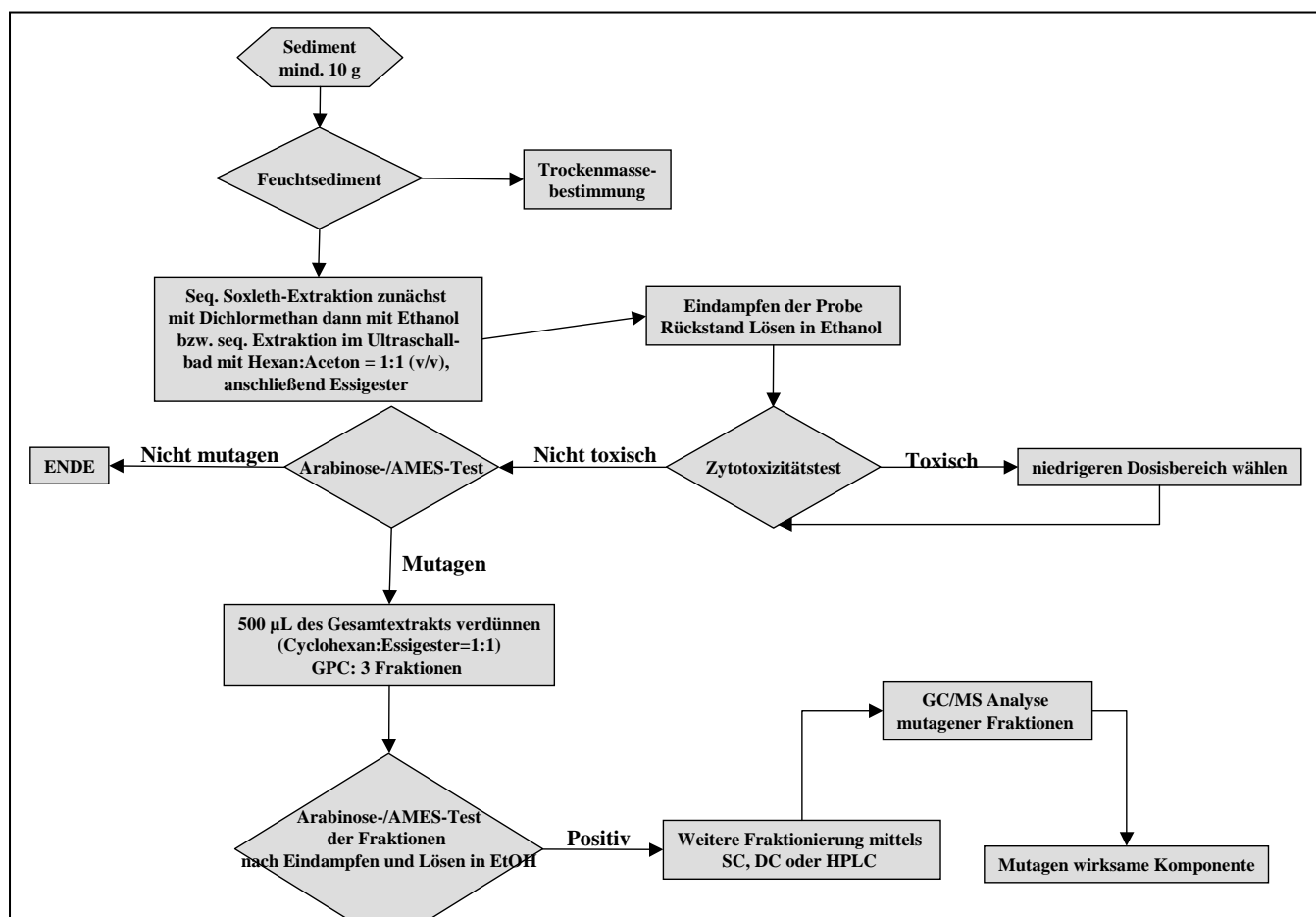


Abbildung 7-1 Arbeitsmethode zur toxizitätsgeleiteten Analytik von Sedimentinhaltsstoffen

8. Untersuchung von Taihusedimenten

Um die Belastung des Taihus abschätzen zu können, wurden Sedimentproben mit unterschiedlichen toxikologischen Methoden untersucht. Die Extrakte wurden als ethanolische Lösungen im Bakterienmutagenesetest auf Mutagenität und auf die Fähigkeit zur Induktion von CYP-450 1A1 im EROD-Test untersucht. Im Folgenden werden die Unterschiede der Toxizität bzw. Mutagenität hervorgehoben, die nach Verwendung von Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität erhalten wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden dann im Zusammenhang mit den Ergebnissen der GC/MS Untersuchungen im Kapitel 8.3 betrachtet.

8.1. Toxizität und Mutagenität (Ara-Test) in Bakterien

Bakterientoxizität der Extrakte

Zunächst wurde der Dosisbereich für die Gesamttoxizität und damit der zulässige Dosis-Wirkungsbereich für den Mutagenesetest ermittelt. Die Einwaagen der getrockneten Sedimente betragen im Mittel 10g (vgl. Kapitel 15.6., Tabelle 15-3), die dann z.B. mit Dichlormethan extrahiert wurden. Die Extrakte wurden anschließend zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit 1mL Ethanol aufgenommen (\Rightarrow 10g/mL Endkonzentration). Für die Untersuchungen wurden 10-30 μ L dieser Lösung eingesetzt, die nach Zugabe weiterer Zusätze (z.B. Pufferlösungen; Genauerer zur Zusammensetzung vgl. Kap. 15.7.2.) auf ein Endvolumen von 2 mL verdünnt wurde. Für die Negativkontrolle wurde Ethanol, in dem die Extrakte gelöst vorlagen, und für die Positivkontrolle wurde das N-Methyl-N'-nitronitrosoguanidin (MNNG) bzw. das 2-Aminoanthracen (2-AA) für Untersuchungen mit dem Rattenleberhomogenat (S9) verwendet. Eine vergleichende Übersicht über die Aktivitäten der Proben #0, #1 und #6 geben die D/W-Kurven der Abbildung 8-1 wieder.

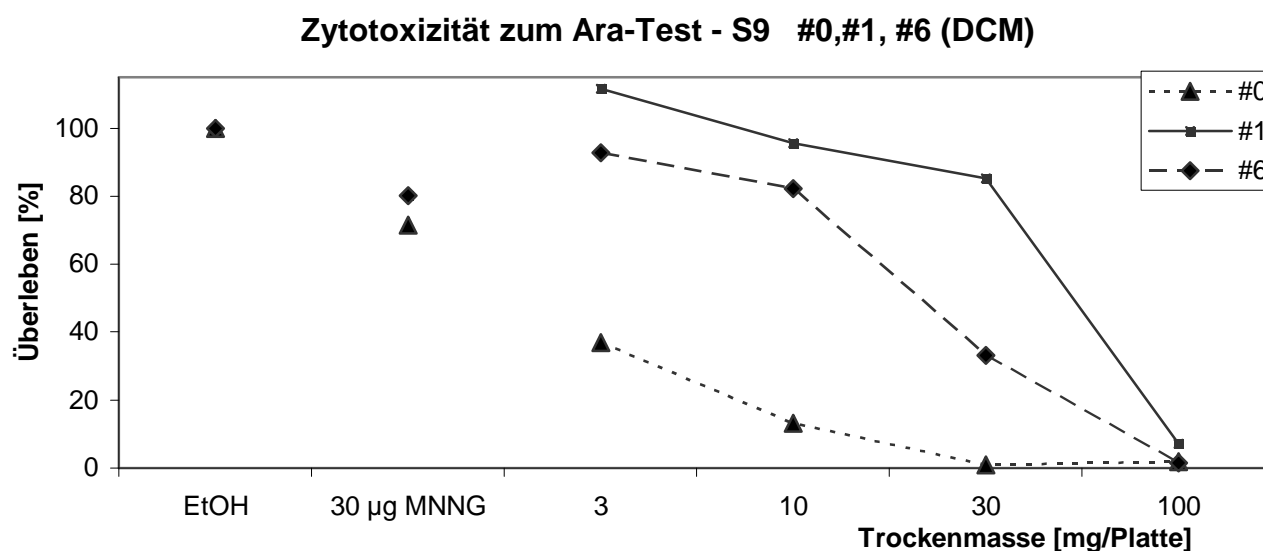


Abbildung 8-1 Vergleichende Übersicht der D/W-Kurven der Proben #0,#1 und #6 (Dichlormethan)
MNNG: N-Methyl-N'-nitronitrosoguanidin

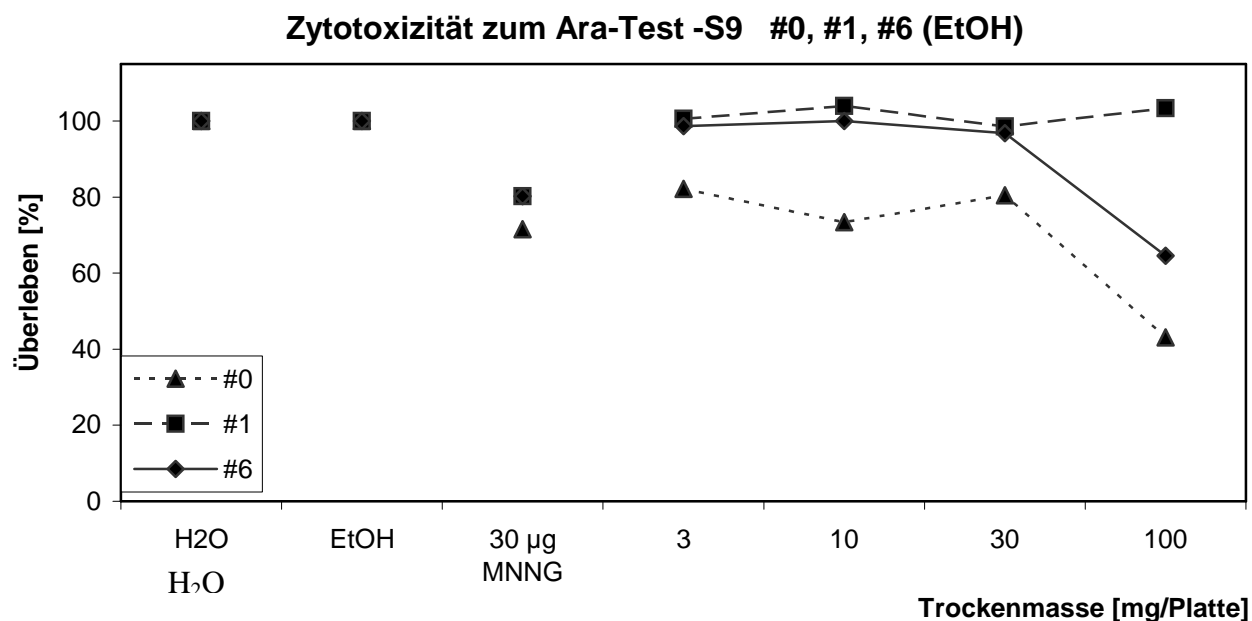


Abbildung 8-1 (Forts.) Vergleichende Übersicht der D/W-Kurven der Proben #0,#1 und #6 (EtOH, unten)
MNNG: N-Methyl-N'-nitronitrosoguanidin

Es zeigt sich, dass der Extrakt #0 im untersuchten Dosis-Wirkungsbereich unabhängig vom Extraktionsmittel die höchste Toxizität aufweist. Dies drückt sich ebenfalls in den ermittelten LD₅₀-Werten des Dichlormethan-Extraktes aus, der für Probe #0 unter 3 mg Trockenmasse-Äquivalente (TMÄ)^a liegt. Die LD₅₀-Werte der Proben #1 und #6 liegen etwa bei 60 mg TMÄ bzw. unter 30 mg TMÄ.

Der LD₅₀-Wert der Probe #0 des ethanolschen Extrakts liegt knapp unter 100 mg TMÄ. Die anderen Proben unterscheiden sich nicht wesentlich von diesem Wert. Erstaunlich ist dagegen die Tatsache, dass die Probe #1 eine relativ geringe Toxizität aufweist, obschon die Probenahmestelle nicht sehr weit entfernt von derjenigen der Probe #0 liegt. Aus den D/W-Kurven ergibt sich, dass die ethanolschen Extrakte gegenüber den Dichlormethan-Extrakten eine wesentlich niedrigere Gesamttoxizität aufweisen und somit die Toxizität von dem zur Extraktion verwendeten Lösungsmittel offensichtlich abhängig ist. Die stärker toxisch wirksamen Dichlormethan-Extrakte weisen somit auf starke Lipophilie der Sedimentinhaltsstoffe hin.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die D/W-Kurven für die entsprechenden Proben eine Abhängigkeit der Toxizität von der Lokalität der Probenahmestelle widerspiegeln. Die stark toxische Wirkung der Sedimentprobe #0, deren Probenahmestelle sich in der Nähe des großen Ballungsraumes Wuxi und dessen Industrien befindet (Abbildung 6-2, S.40), gibt die vor Ort bestehende Belastung des Sediments mit Umweltchemikalien wieder.

Mutagenität im Bakterientest – (Ara-Test)

Ausgehend von den Ergebnissen zur Zytotoxizität wurde der Dosisbereich für den Ara-Test so gewählt, dass mutagene Effekte eindeutig erkannt werden konnten. Mit Ausnahme der Probe #0 lag dieser Dosisbereich für alle Proben zwischen 3 und 100 mg an Trockenmasse-Äquivalenten (TMÄ). Experimente ohne metabolische Aktivierung zeigten im oben genannten Dosisbereich keine Mutagenität, was darauf hinweist, dass im Extrakt keine „direct acting mutagens“ wie z.B. methylierende Substanzen zugegen sind.

^a Trockenmasseäquivalent: ethanolsche Lösungen definierter mit Massenkonzentration, so dass 1 mL Lösung = 10 g Sediment entspricht

Es werden deshalb nur die Ergebnisse aus den Experimenten mit metabolischer Aktivierung diskutiert. Insgesamt ergab sich, ähnlich wie in den Experimenten zur Bakterientoxizität, ein entsprechender Unterschied in der Stärke der Mutagenität zwischen den Dichlormethan- respektive den Ethanol-Extrakten. Dabei zeichneten sich die ethanolischen Extrakte durch deutlich niedrigere Induktionsraten gegenüber den Dichlormethan-Extrakten aus, wie aus Abbildung 8-3 und 8-5 (S.53) ersichtlich ist. Der Grund dürfte in der unterschiedlichen Polarität der verwendeten Lösungsmittel und somit der Fähigkeit, die Sedimentinhaltsstoffe zu extrahieren, liegen (Hantzsch logP-Parameter).

Dichlormethan-Extrakte

Die D/W-Kurven der Proben #0 und #1 (Abbildung 8-2) zeigen tendenziell einen unterschiedlichen Verlauf, wobei letztere (#1) eine leichte dosisabhängige Zytotoxizität aufweist. Die Induktionswerte der Proben #0 und #1 für 10 mg Trockenmasse sind vergleichbar.

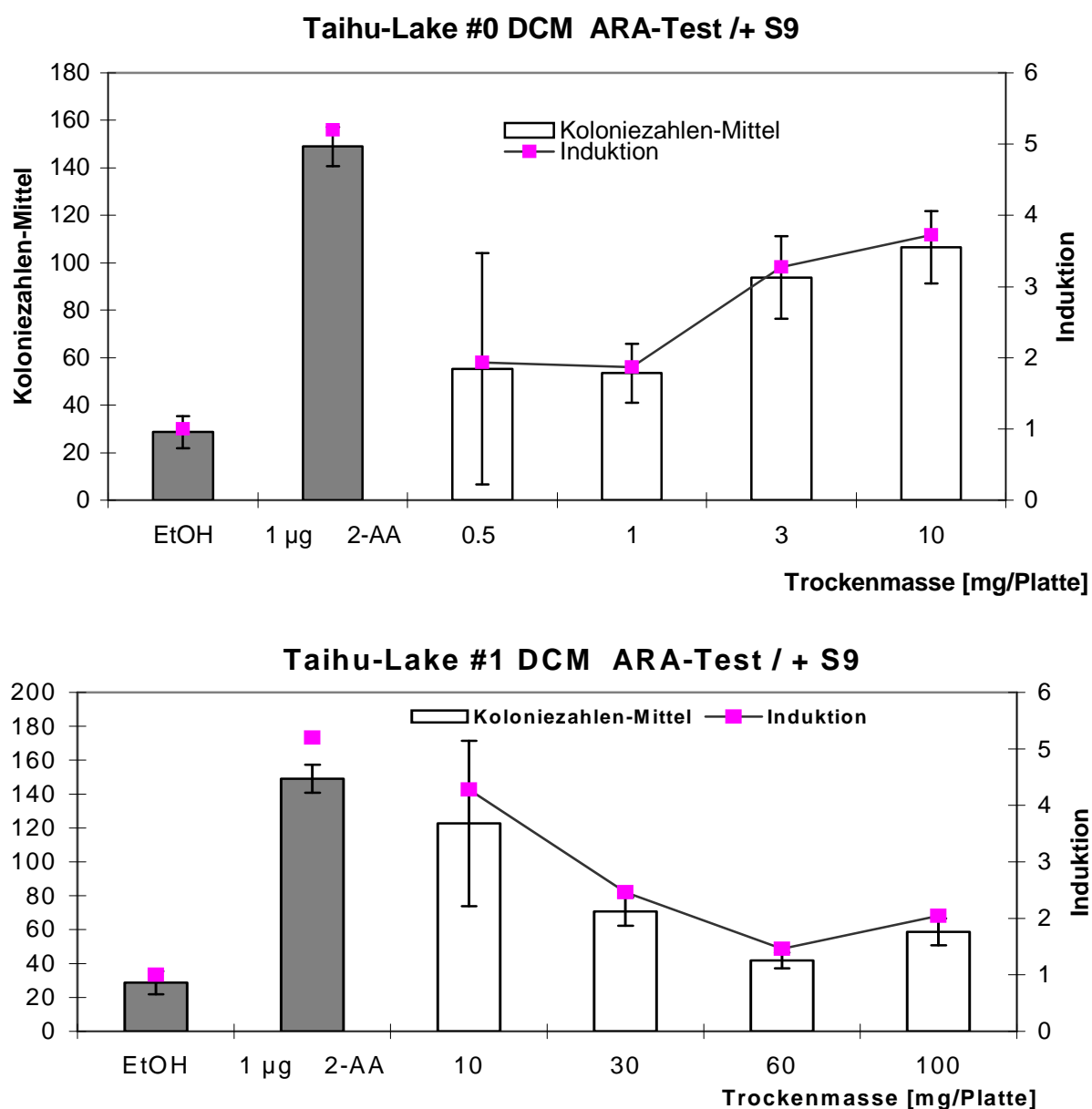


Abbildung 8-2 Ara-Test der Extrakte #0 und #1 (Dichlormethan), 2-AA: 2-Aminoanthracen; Standardabweichung s (vgl. Kapitel 3.3.) der Stichprobe (n=3), als normalverteilt angenommen und als Fehlerbalken dargestellt

Der geringe Unterschied in der Mutagenität der Proben #0 und #1 steht in engem Zusammenhang mit der räumlichen Nähe der jeweiligen Probenahmestellen (Abbildung 6-2, S.40). Wie aus diesen D/W-Kurven weiter hervorgeht, werden für die Proben #0 und #1 die höchsten Induktionswerte gefunden. Die übrigen Sedimentproben wiesen keine mutagenen Effekte (Abbildung 8-3 bzw. Abbildung 8-5, S.53) auf, was jedoch nicht zu dem Schluss führen darf, es würde sich hierbei um unbelastete, d.h. unbedenkliche Proben handeln.

Vergleich der Ara-Test +S9 für #1,#6,#9,#12 (DCM)

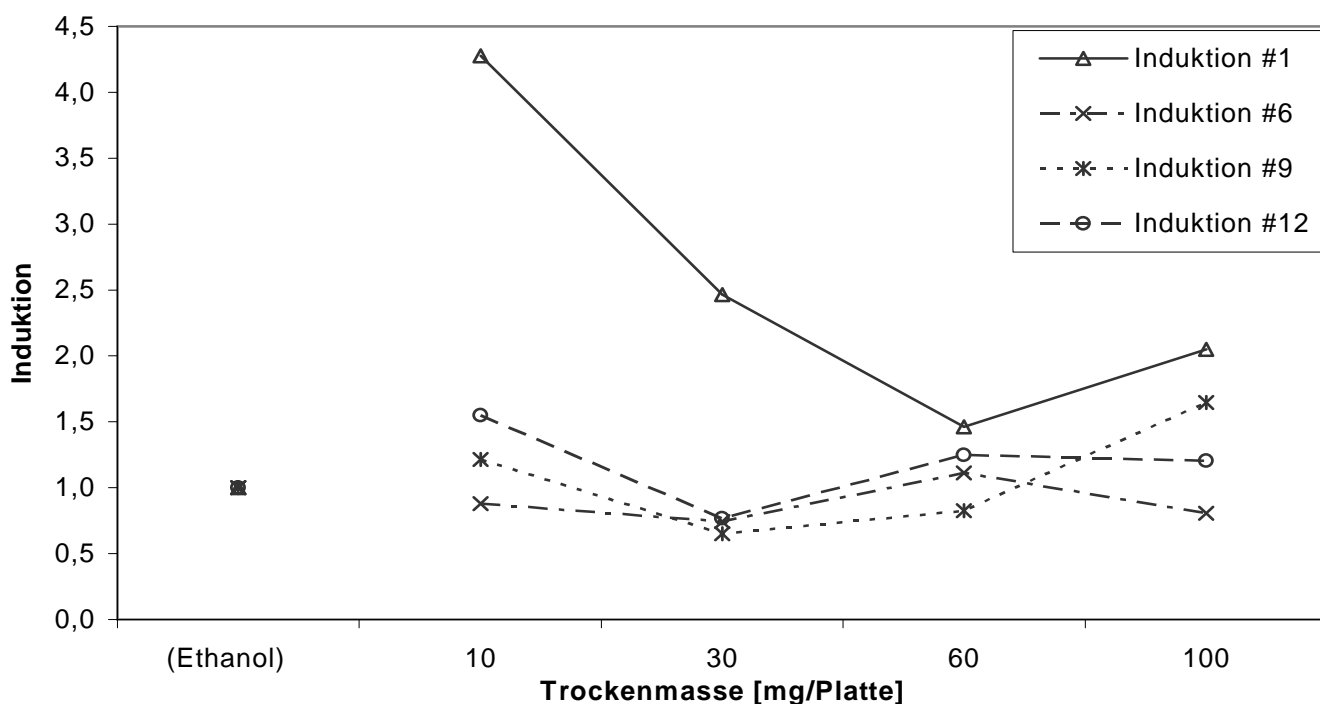


Abbildung 8-3 Zusammenfassender Überblick über die Ergebnisse der Mutagenität der Extrakte #1, #6, #9 und #12 (Dichlormethan)

t-Test	#1 Mittelwert	Std.-Abw.		
A. dest. 10	26,33 122,67	6,75 8,33		
Prüfgröße (PG)	11,01	t(1%)<PG< t(0.1%)? PG > t(0,1%)?	5,84(1%), 12,9 (0.1%) 12,9 (0.1%)	Ja Nein
A. dest. 30	26,33 70,67	6,75 4,65		
Prüfgröße (PG)	6,63	t(1%)<PG< t(0.1%)? PG > t(0,1%)?	5,84(1%), 12,9 (0.1%)	Ja Nein
A. dest. 60	#1 26,33 41,83	6,75 7,94		
Prüfgröße (PG)	1,82	t(1%)<PG< t(0.1%)? PG > t(0,1%)?	5,84(1%), 12,9 (0.1%)	Nein Nein

Tabelle 8-1 Prüfung der Signifikanz der Induktionswerte aus der Reihe der Probe #1 mit dem Student t-Test; A. dest = destilliertes Wasser

Die Untersuchung der Induktionswerte der Probe #1 auf signifikante Abweichung von der ermittelten Schwankungsbreite der Blindwerte mittels dem Student t-Test bei einer Wahrscheinlichkeit von $p=99\%$ ergab eine signifikante Abweichung dieser.

Dieses Ergebnis zeigt also, dass die gefundenen Induktionswerte der Probe #1 (vgl. Abbildung 8-3) tatsächlich signifikant sind und somit nicht innerhalb der ermittelten Fehlergrenze liegen.

Ethanolische Extrakte

Die ethanolischen Extrakte der Proben #0 und #1 zeigen im untersuchten Dosisbereich eine mutagene Wirkung, wobei der über den Dosisbereich gemittelte Induktionswert für Probe #1 gegenüber der Probe #0 deutlich höher liegt. Im Gegensatz zum Dichlormethan-Extrakt der Probe #1 (Abbildung 8-2 bzw. Abbildung 8-3), kann aus der D/W-Kurve des ethanolischen Extraktes (Abbildung 8-4) eine dosisabhängige Zunahme der Induktionswerte gefunden werden. Dies entspricht einem entgegengesetzten tendenziellen Verlauf der Kurve zu der des Dichlormethan-Extraktes. Dieser Verlauf der Kurve ist so zu deuten, dass die Extraktinhaltsstoffe des Dichlormethan-Extraktes #1 mit zunehmender Dosis eine toxische Wirkung auf die Bakterienzellen ausüben, so dass eine weitere Zellteilung unterbunden wird und daher eine Mutation nicht mehr detektiert werden kann.

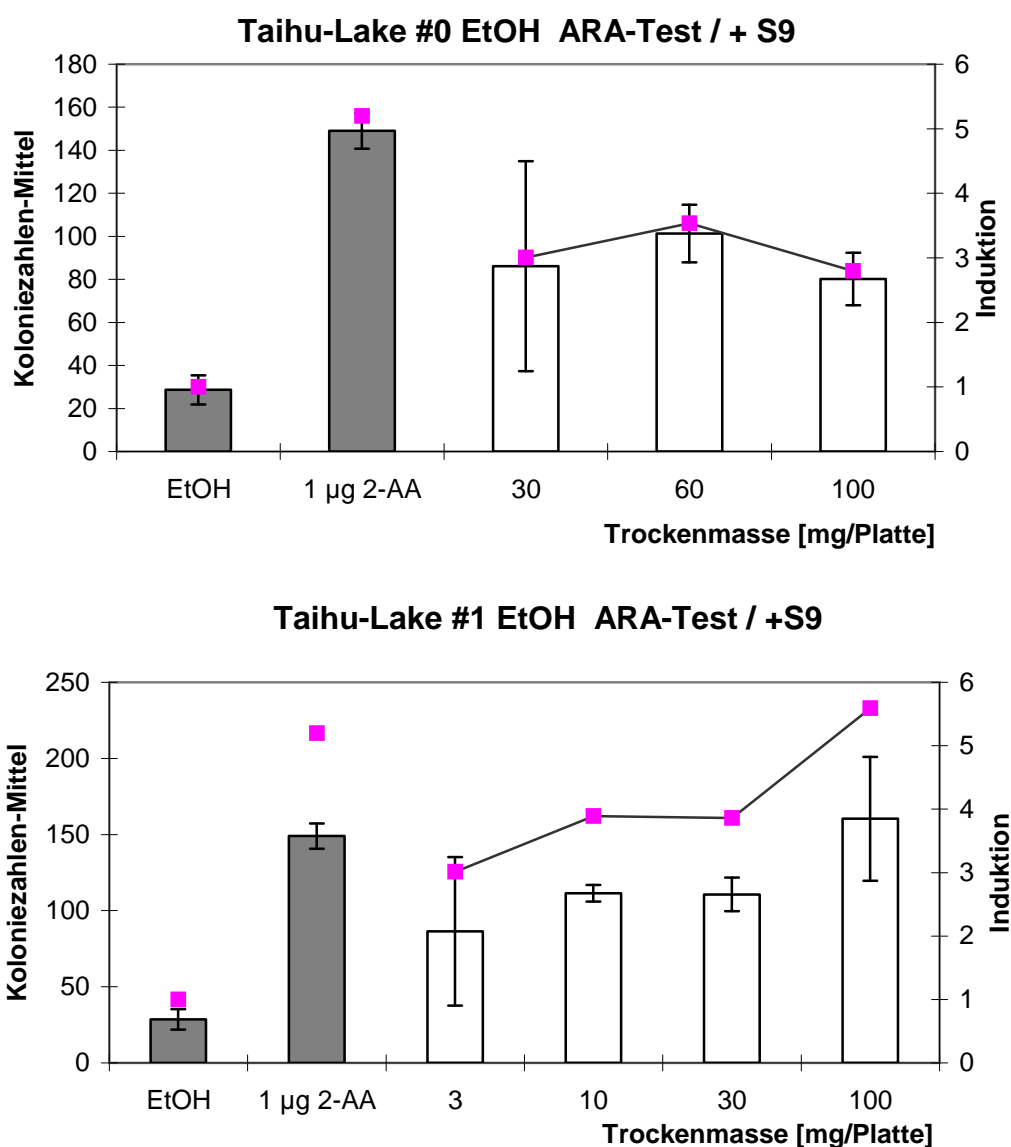


Abbildung 8-4 Ara-Test der ethanolischen Extrakte #0 (oben) und #1 (unten), 2-AA: 2-Aminoanthracen; Standardabweichung s (vgl. Kapitel 3.3.) der Stichprobe ($n=3$), als normalverteilt angenommen und als Fehlerbalken dargestellt

Zwar konnte für den Dichlormethan-Extrakt der Probe #6 (Abbildung 8-3) kein Hinweis auf eine mutagene Wirkung gefunden werden, der ethanolische Extrakt zeigt jedoch ein anderes Bild (Abbildung 8-5). Aus dem Vergleich der Induktionswerte der Proben #1 und #6 (Abbildung 8-4 bzw. Abbildung 8-5), bezogen auf 100 mg Trockenmasse Sediment, findet man für Probe #6 eine Induktion von c.a. 3.0 gegenüber 6.0 für Probe #1. Dies muss vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass die Probe #6 aus einer relativ wenig belasteten Region des Taihus stammt.

Ara Test (+S9) für #6,#9,#12 (EtOH)

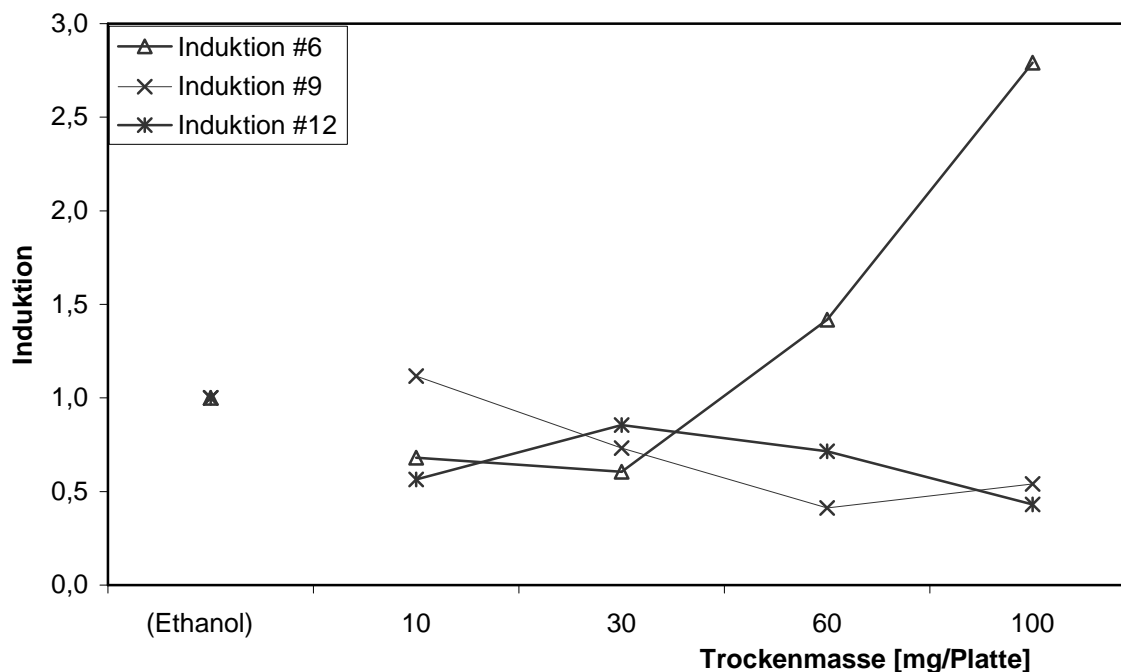


Abbildung 8-5 Zusammenfassender Überblick über die Ergebnisse der Mutagenität der Extrakte #6, #9 und #12 (EtOH)

In der Abbildung 8-6 sind die Maximalwerte der Induktion für die einzelnen Extrakte in Abhängigkeit von der Trockenmasse und des Lösungsmittels miteinander verglichen. Die gestrichelte, horizontale Linie stellt den Schwellenwert für die Induktion dar, der in der Toxikologie definiert ist, und oberhalb derer von Mutagenität gesprochen wird. Hierbei stellte sich heraus, dass die Probe #1 deutlich stärker mutagen wirkt als Probe #0. Die Erklärung dafür ist, dass in der Probe #0 eine Zytotoxizität überlagert ist und die Bakterien absterben bevor sie mutieren. Eine entsprechende Tendenz ergibt auch der Vergleich der D/W-Kurven für die Zytotoxizität der beiden Extrakte sowie der niedrigeren Dosen, die für Probe #0 getestet wurden. Probe #0 kann also aufgrund der stärkeren Belastung der Region als stark zytotoxisch eingestuft werden, was jedoch wenig über die Mutagenität der Inhaltsstoffe aussagt. Diese Aussage gilt unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel, da in beiden Fällen die Zytotoxizitäts-Kurven die gleiche Tendenz aufweisen.

Spezieller Teil

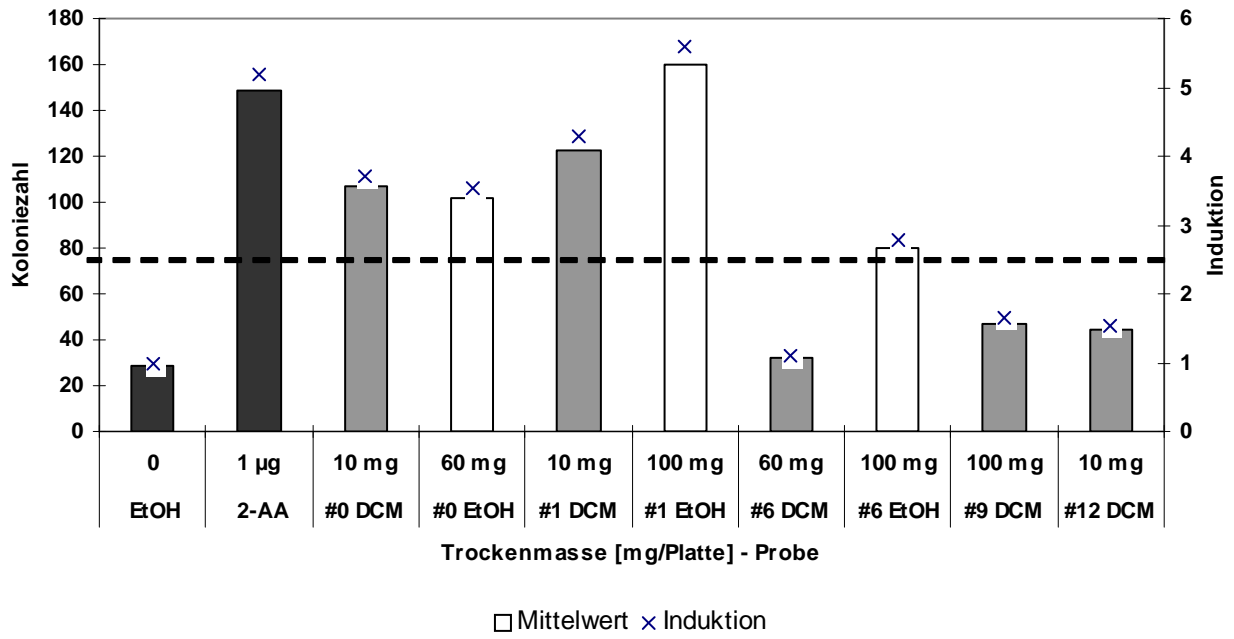


Abbildung 8-6 Vergleichende Übersicht ü. Maximalwerte der Induktion

8.2 Ergebnisse des EROD-Tests

Ergänzend zu den Untersuchungen an bakteriellen Testsystemen wurden die Wirkungen der Sedimentextrakte auch an primären Rattenhepatozyten untersucht. Die Stärke der Induktion des CYP-450 1A1 (durch den jeweiligen Extrakt) im EROD-Test für die ethanolischen und Dichlormethan-Extrakte der jeweiligen Probenahmestelle, bezogen auf jeweils 45 mg Trockenmasse, zeigt die Abbildung 8-7.

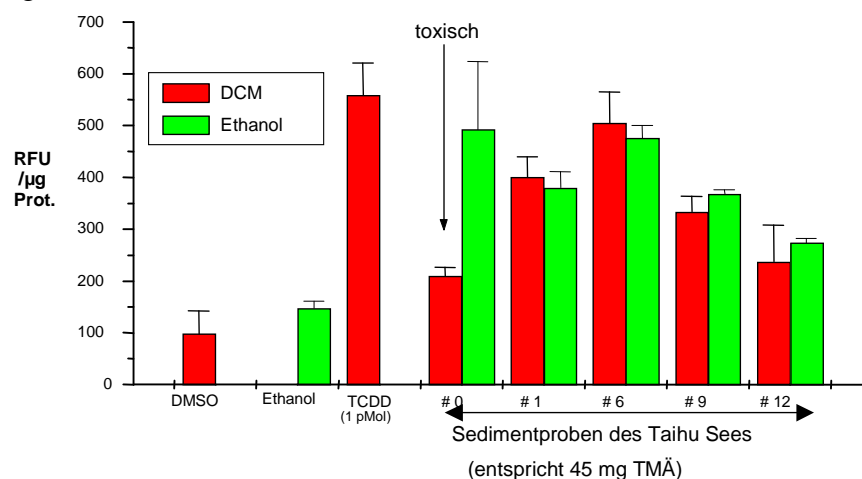


Abbildung 8-7 EROD-Test der Sedimentextrakte

Wie sich aus der Abbildung 8-7 ergibt, zeigen mit Ausnahme der Probe #0 (Dichlormethan) alle übrigen Proben Effekte, die in der Größenordnung der Positivkontrolle, dem 2,3,7,8-TCDD, liegen. Der ethanolische Extrakt der Probe #0 zeigt von allen untersuchten Proben die stärkste Induktion überhaupt. Eine vergleichbare Induktion ist nur noch durch den Extrakt der Probe #6 gegeben. Ähnlich wie im Bakterientoxizitätstest findet man für den Dichlormethan-Extrakt der Probe #0 eine zytotoxische Wirkung, und eine Induktion bleibt aus. Weiterhin ist der Abbildung zu entnehmen, dass die ethanolischen Extrakte, mit Ausnahme der Proben #1 und #6, gegenüber den Dichlormethan-Extrakten eine stärkere Induktion bewirken, demnach eine gegensätzliche Tendenz in der biologischen Wirkung zeigen, wie dies im Ara-Test beschrieben wurde.

Probe	Zytotox-Test	Ara-Test +S9	EROD-Test
#0 (DCM/EtOH)	(+++ / ++)	(+++ / +)	(o / ++)
#1 (DCM/EtOH)	(+ / o)	(+++ / ++)	(+ / +)
#6 (DCM/EtOH)	(++ / +)	(o / +)	(++ / ++)
#9 (DCM/EtOH)	N.N.	(o / o)	(+ / +)
#12 (DCM/EtOH)	N.N.	(o / o)	(+ / +)

Tabelle 8-2 Zusammenfassung der toxikologischen Ergebnisse: +++ = stark, ++ = mittel, + = schwach, o = toxisch bzw. ohne Effekt, N.N. = nicht dargestellt

8.3. Zusammensetzung mutagener Sedimentproben

Im Folgenden soll exemplarisch die chemische Zusammensetzung der Proben #0 und #9 (vgl. Tabelle 8-2, S. 62 und Tabelle 8-4, S. 99 ff.) aufgezeigt und deren Zusammensetzung mit Hinblick auf die unterschiedlichen Extraktionsmittel verglichen werden. Diese Resultate sollen unter Berücksichtigung der im Abschnitt 8.2 und 8.1. präsentierten Ergebnisse dargestellt werden.

Im Gegensatz zu Probe #0 steht die Probe #9, die aus einer Region mit geringerer Belastung stammt. Wie sich herausstellte, gestaltete sich die Deutung der in den Abschnitten 8.1. und 8.2. vorgestellten toxikologischen Effekte, basierend auf der chemischen Zusammensetzung der Sedimente, aufgrund der komplexen Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen nicht einfach. Da sich die mutagenen bzw. cytochrominduzierenden Effekte nicht auf eine einzelne Stoffklasse zurückführen lassen, wird korrekter Weise nur die Zusammensetzung dieser Fraktionen angegeben. In Konsequenz dessen sind antagonistische oder synergistische Wirkungen einzelner Komponenten in diesem Zusammenhang nur schwierig einzustufen. Einzelne, eindeutig identifizierte Substanzen wurden auf deren mutagene Wirkung untersucht, und die Ergebnisse dienen als weitere Hinweise zur Interpretation der beobachteten Effekte.

8.3.1. Identifizierung einzelner Komponenten

Die Sedimentextrakte wurden mittels GPC fraktioniert, wobei der Dichlormethan-Extrakt der Sedimentprobe #0 fünf Fraktionen lieferte: Vor- und Haupt- sowie drei Nachfraktionen. Die Unterteilung der Nachfraktion in die Fraktion „farblos“, „rot“ und „gelb“ ergab sich aus deren Erscheinung auf dem Säulenbett. Im Folgenden werden die aufgrund ihrer Massenspektren und der Retentionsindices identifizierten Inhaltsstoffe vorgestellt. Eine zusammenfassende Übersicht der in den Sedimentproben identifizierten Substanzklassen, aufgeteilt nach GPC-Fraktionen, gibt Tabelle 8-3(s.u.).

Spezieller Teil

	#0 (VOR)	#0 (HAUPT)	#0 (NACH) (F, G, R)	#1 (VOR)	#1 (HAUPT)	#1 (NACH)	#6 (HAUPT)	#6 (NACH)	#9	#12
<i>Kohlenwasserstoffe</i>										
Nonan				x						
Decan	x	x								
Undecan		x								
Dodecan	x	x	x,		x	x				
Tridecan	x	x	x,			x				
Tetradecan	x	x	x,			x			x	x
Pentadecan	x	x	x,		x	x		x		
Hexadecan			x,			x			x	x
Heptadecan	x				x	x	x		x	x
Oktadecan	x				x		x	x	x	x
Nonadecan	x				x		x	x	x	
Eicosan						x				
Heneicosan	x								x	x
Docosan	x		x,			x	x	x	x	x
Tricosan	x						x			x
<i>Verzweigte Kohlenwasserstoffe</i>										
Tricyclen	x		x,							
Pristan	x	x								
Phytan	x	x							x	
1-Nonen					x					
1-Nonadecen	x									
Farnesan		x	x,							
<i>Alkylbenzole</i>										
5-Phenylundecan		x								
3-Phenylundecan					x					
6-Phenyldodecan		x							x	x
5-Phenyldodecan		x								
3-Phenyldodecan										x
2-Phenyldodecan		x								x
6-Phenyltridecan		x							x	x
5-Phenyltridecan		x								x

Spezieller Teil

	#0 (VOR)	#0 (HAUPT)	#0 (NACH)	#1 (VOR)	#1 (HAUPT)	#1 (NACH)	#6 (HAUPT)	#6 (NACH)	#9	#12
<i>PAKs</i>			(F , G , R)							
Naphtalin			, x , x							
Phenanthren			x ,							
Acenapthen			, x ,							
Anthracen			x ,							
Pyren			x ,					x		
Fluoren			, x ,							
Benzo(a)anthracen			x ,							
2-Methylnaphtalin			, x , x							x
1-Methylnaphtalin			, x ,							
Reten			, x , x							
Dibenzo[d,b]thiophen			x ,							
Benzothiazol			, x ,							
<i>Halogeniert</i>										
1,4-Dichlorbenzol			, x , x							
1,2-Dichlorbenzol			, x ,							
1,2,4-Trichlorbenzol			, x ,							
<i>Alkohole, Phenole</i>										
Artemisia alkohol	x		, , x							
2-Nonanol	x	x			x					
2-Decanol			, x ,							
2-Methyl-1-hexanol				x		x				
6-Methyl-2-heptanol			, x , x							
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol		x	, x , x		x				x	x
3,4-Dimethoxybenzylalkohol			, x ,							
Phenol		x	, x , x ,							
Benzylalkohol			, x ,							
p-Cresol		x								

Spezieller Teil

	#0 (VOR)	#0 (HAUPT)	#0 (NACH)	#1 (VOR)	#1 (HAUPT)	#1 (NACH)	#6 (HAUPT)	#6 (NACH)	#9	#12
<i>Aldehyde/Ketone</i>										
Benzaldehyd	x		x ,							x
Hexanal		x								
Octanal	x		x , x ,							
Nonanal	x	x	x ,							
Longicamphenilon	x									
6,10,14-Trimethylpentadecan-2-on	x									
Oxoisophoron		x	, x ,							x
5-Methylheptan-2,4-dion		x								
(E)-Zimtaldehyd		x								
3-Thujene-10-al						x				
<i>Carbonsäuren/-ester</i>										
Hexansäure		x								
Nonansäure		x								
Octansäure	x	x								
Hexadecansäure						x				
Octylacetat						x				
Methylpalmitat	x									
Dihydroactinidiolid										x
4-Methyl-2-buten-4-olid	x	x	, x , x	x						
δ-Hexanolid						x				
γ-Hexanolid			x ,							
γ-Octanolid			, x ,				x			
γ-Undecanolid		x		x	x					
Hexylacetat		x	x ,						x	
Benzoessäure		x	x ,							
<i>Diverse</i>										
N,N-Diethylacetamid	x	x	x , x , x		x					
1,3,5-Trimethyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion			, x , x							

Tabelle 8-3 Identifizierte Substanzen in den GPC-Fractionen der Dichlormethan-Extrakte

Probe #0, Dichlormethan-Extrakt, Vorfraktion

Wie sich aus der Zusammensetzung des Dichlormethan-Extraktes der Probe #0 zeigt (Abbildung 8-8), konnten neben einer Vielzahl aliphatischer Kohlenwasserstoffe mit vorwiegend ungeradzahligter Kettenlänge auch Fettsäuren sowie unterschiedlich oxygenierte aromatische Verbindungen und einige oxygenierte Terpene identifiziert werden, wie z.B. das Dihydroactinolid (Abbildung 8-32, S. 91). Häufig vertreten waren ungesättigte und gesättigte Lactone.

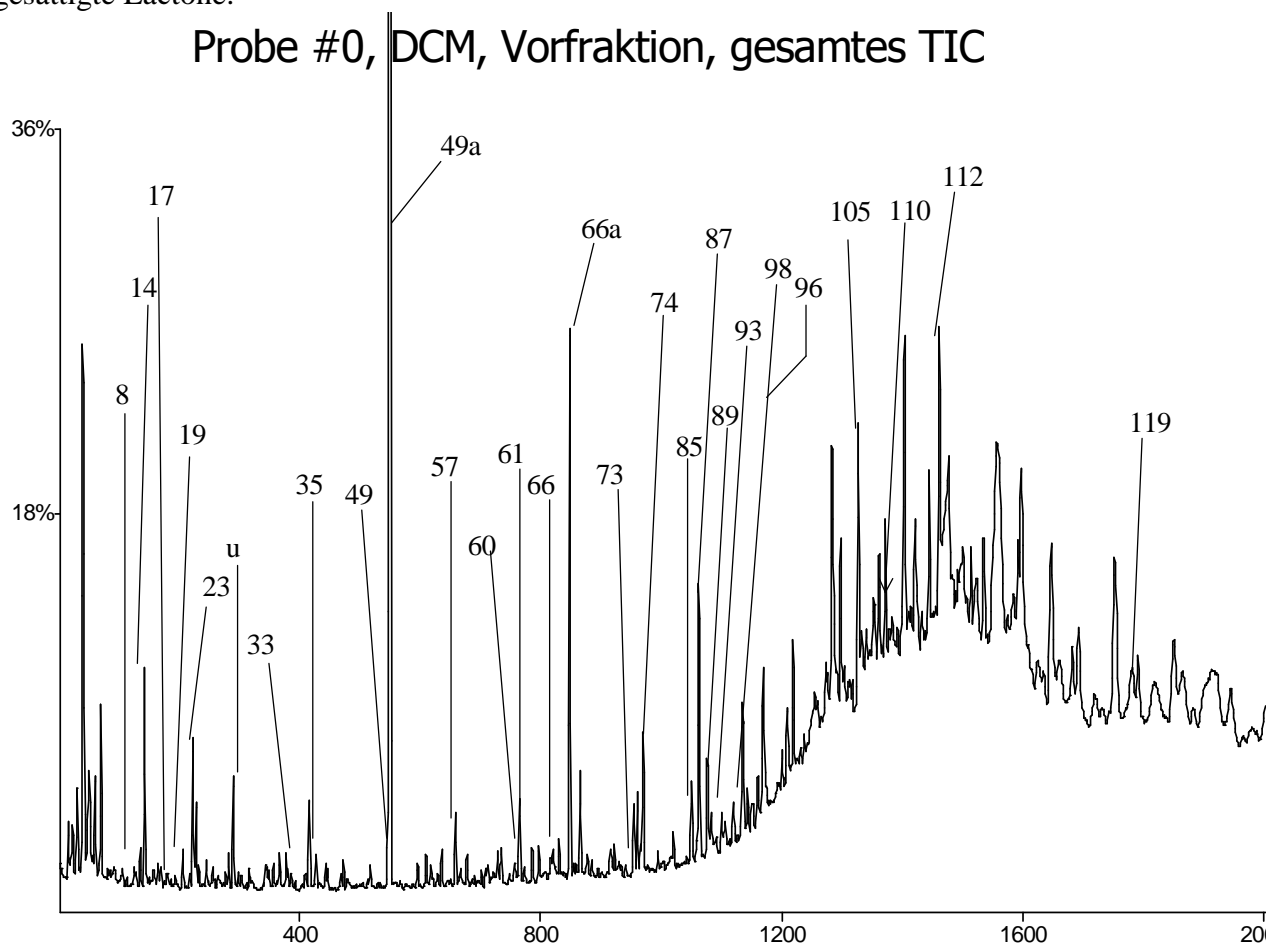


Abbildung 8-8: TIC der GPC-Vorfraktion der Probe #0 (Dichlormethan), 8: Tricyclen; 14: N,N-Diethylacetamid; 17: Octanal; 19: Decan; 23: Acetophenon; 33: Oktansäure; 35: Dodecan; 49: Tridecan; 49a Bicyclohexan (MS); 57: Tetradecan; 60: Dihydroactinolid; 61: Pentadecan; 66: Longicamphenilon; 66a: 2,2,4-trimethyl-1,3-pentandioldiisobutyrat (MS;TxiB^a); 73: Heptadecan; 74: Pristan; 85: Octadecan; 87: Phytan; 90: 6,10,14-Trimethylpentadecan-2-on; 95: 1-Nonadecen; 96: Nonadecan; 98: Methylpalmitat; 105: Heneicosan; 110: Docosan; 112: Tricosan; 119: Heptacosan

Probe #0, Dichlormethan-Extrakt, Hauptfraktion

Eine etwas andere Zusammensetzung zeigt dagegen die Hauptfraktion (vgl. Abbildung 8-9, S.68f.). Neben aliphatischen Kohlenwasserstoffen und Fettsäuren, die in Sedimenten ubiquitär vorkommen^[90], konnten anhand eines technischen Gemisches langkettiger Alkylbenzole als Referenzstandard eine Reihe unterschiedlicher Alkylbenzole identifiziert werden. Überwiegend konnten Kohlenwasserstoffe ungeradzahligter Kettenlänge identifiziert werden.

Der Wert des Verhältnisses geradzahligter zu ungeradzahligter Kohlenwasserstoffe (Gleichung 8-1) ist ein Maß für den anthropogenen Eintrag. Bei einem Sediment welches überwiegend mit Kohlenwasserstoffen aus Mineralölen belastet ist, liegt das Verhältnis deutlich unter 1.

^a TxiB = Handelsname für den genannten Weichmacher

Sind die Kohlenwasserstoffe biotisch liegt der Wert deutlich über 1. Diese (dimensionslose) Maßzahl kann ebenso für die Beschreibung von Einträgen mit Fettsäuren verwendet werden.

$$\frac{C_{2n}}{C_{2n+1}} = C$$

(Gleichung 8-1)

Zu den natürlichen Quellen, die durch das Verhältnis (1) beschrieben werden, zählen z.B. pflanzliche oder auch tierische Fette. Insbesondere ist diese Kennzahl wiederum als ein Parameter für Einträge z.B. aus der Lebensmittel - oder Futterindustrie bedeutsam.^[91]

Die biologische Abbaubarkeit aliphatischer MKW mit gleicher Kohlenstoffzahl sinkt im Allgemeinen von den n-Alkanen über die iso-Alkane, den Alkenen bis zu den Cycloalkanen. Die n-Alkane werden allgemein als leicht abbaubar eingestuft, mit Ausnahme der Kurzkettigen. Sie werden nur von wenigen spezialisierten Bakterien angegriffen. Die mittel- bis langkettigen Verbindungen (ab Hexan) können dagegen die meisten Bakterien verwerten.^[92,93] Im Boden werden Alkane hauptsächlich aerob von Hefen, Bakterien und Pilzen abgebaut. Der Abbau erfolgt über den entsprechenden Alkohol und den Aldehyd zu Fettsäuren, welche dann in Lipide eingebaut werden. Die Abbauezeiten sind von der Kettenlänge und der Molekülstruktur abhängig. Eine direkte Beziehung zwischen Kohlenstoffzahl und Halbwertszeit besteht nicht.^[92] Der anaerobe Abbau von Aliphaten im Boden wurde bislang wenig untersucht. Alkene können durch verschiedene Mikroorganismen abgebaut werden.^[92,93]

a) Gesamtüberblick

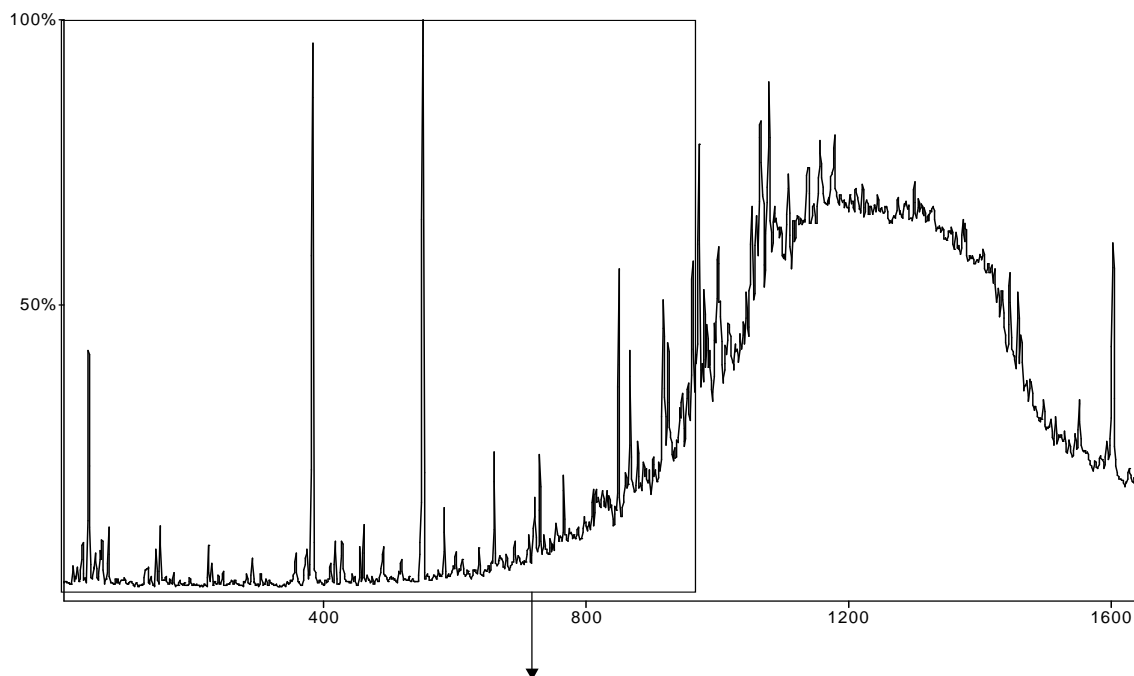
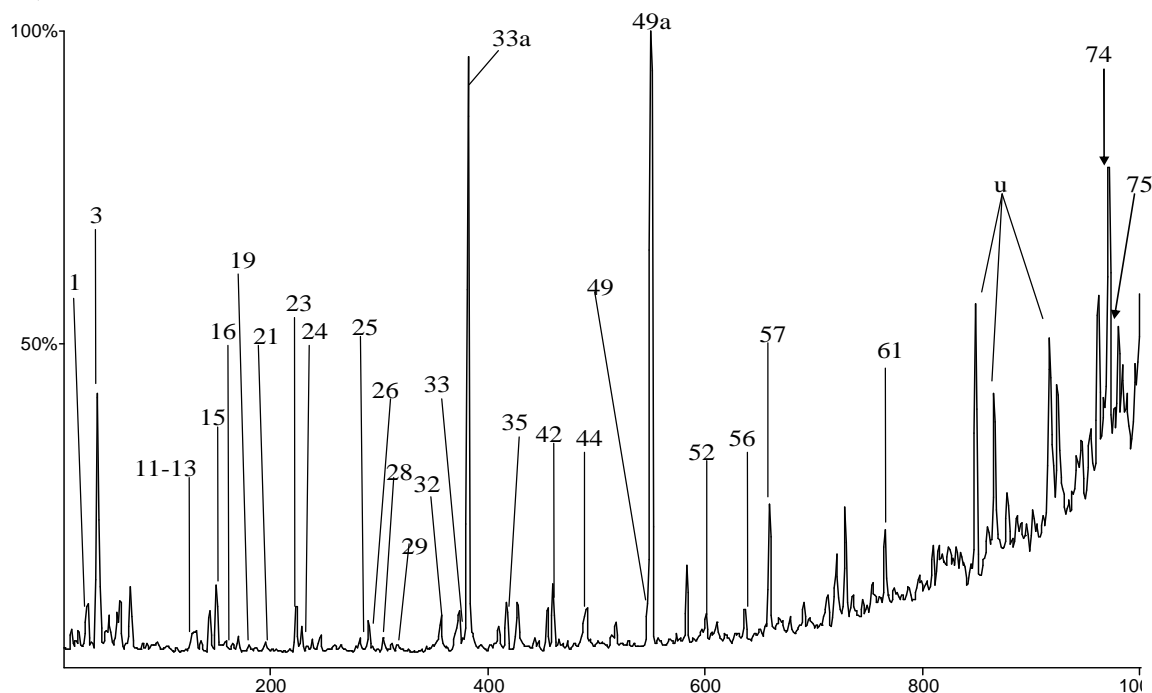


Abbildung 8-9 TIC der (GPC-) Hauptfraktion der Probe #0 (Dichlormethan); Gesamtüberblick

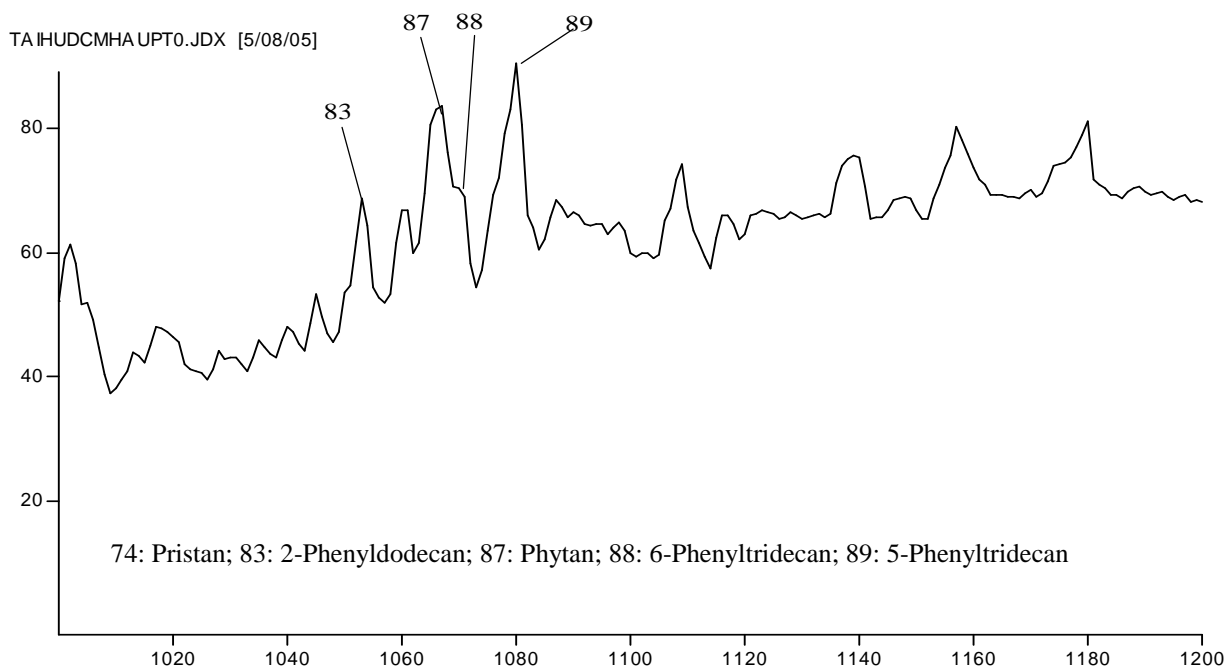
b) Bereich: Scan bis 1000



[b] 1: γ -Undecanolid; 3: 4-Methyl-2-butenolid; 11: Phenol; 12: Hexansäure; 13: Hexanal; 15: 2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol; 16: 5-Methylheptan-2,4-dion; 19: Decan; 21: Hexylacetat; 23: Acetophenon; 24: p-Cresol; 25: Nonanal; 26: 2-Nonanol; 28: Undecan; 29: Oxoisophoron; 32: Benzoesäure; 33: Octansäure; 33a: 1-(2-Butoxyethoxy)ethanol (MS); 35: Dodecan; 42: (E)-Zimtaldehyd; 44: Nonansäure; 49: Tridecan; 49a: Bicyclohexan (MS); 52: Undecansäure; 56: Farnesan; 57: Tetradecan; 61: Pentadecan; 74: Pristan; 75: 6-Phenyl-dodecan; u: unbekannt

Abbildung 8-9 (Forts.) TIC der (GPC-) Hauptfraktion der Probe #0 (Dichlormethan); Ausschnitt (Scanbereich-1000)

c) Restbereich: Scan 1000-1200



74: Pristan; 83: 2-Phenyl-dodecan; 87: Phytan; 88: 6-Phenyl-tridecan; 89: 5-Phenyl-tridecan

Abbildung 8-9 (Forts.) TIC der (GPC-) Hauptfraktion der Probe #0 (Dichlormethan); Scanbereich 1000-1200 (c)

Die Identifizierung der linearen Alkylbenzole (LABs) ergab sich aus dem Vergleich der Ionenspuren (Abbildung 8-12, S. 72 und Abbildung 8-13, S. 73) der Massen m/z 91 bzw. 105 mit denen der Standardreferenzsubstanz, wobei einzelne Isomere anhand der Retentionsindices unterschieden wurden. Das Fragmentierungsmuster der Massenspektren ermöglicht die Zuordnung der Position des Phenylrestes in der Kette. Prinzipiell muss nur zwischen einem 2-Phenylalkan unterschieden werden, das ein intensives Fragmentation der Masse m/z 105 ergibt, das wahrscheinlich die in Abbildung 8-10 angegebene Struktur haben könnte, sowie einem Phenylalkan, dessen Phenylrest an beliebiger Stelle in der Kette sitzt.

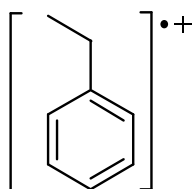


Abbildung 8-10 Struktur des Fragmentation der Masse m/z 105

Diese Phenylalkane ergeben nach Abspaltung eines Methylphenylradikals, das aus einer vorherigen Abspaltung der übrigen Alkylkette hervorgeht, das Fragmentation der Masse m/z 91 (vgl. Abbildung 8-12). Die Abbildungen 8-12 und 8-13 zeigen exemplarisch die Massenspektren des 5-Phenyldodecans sowie des 2-Phenyldodecans mit den charakteristischen Fragmentationen.

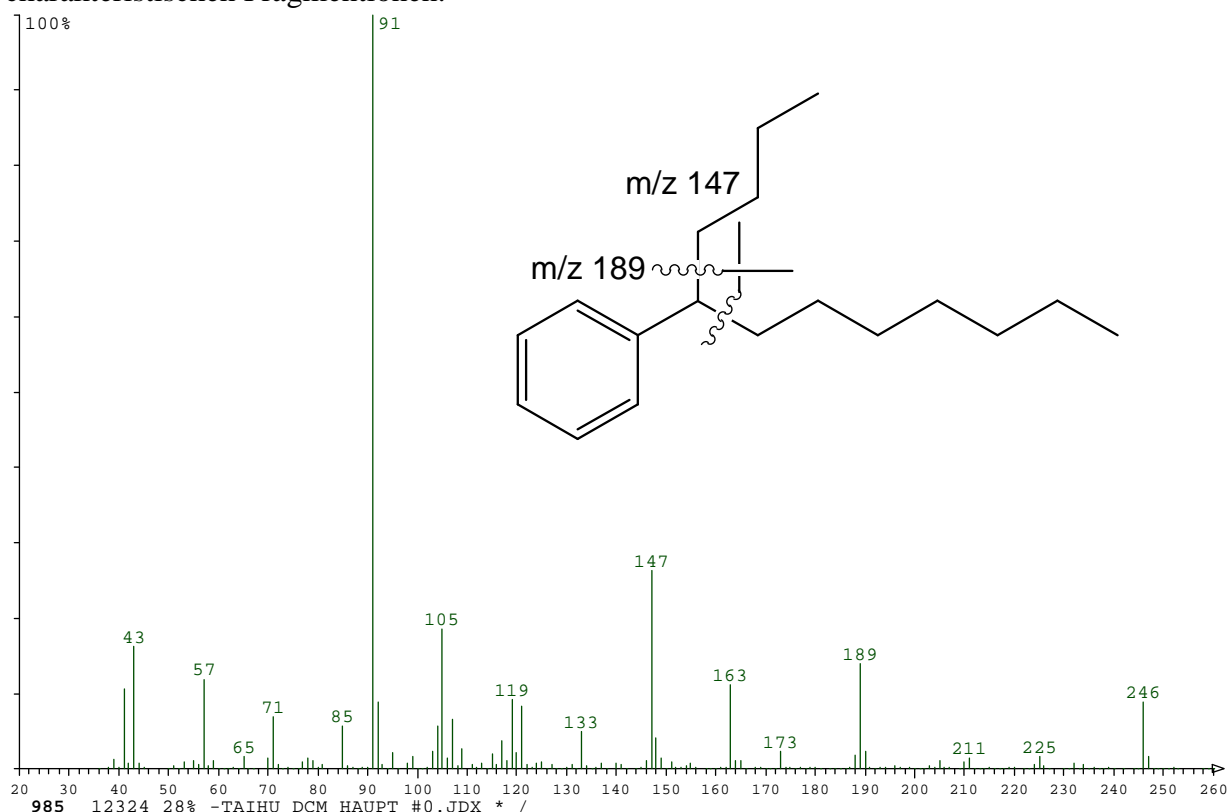


Abbildung 8-11: Massenspektrum von 5-Phenyldodecan und dessen Fragmentierung

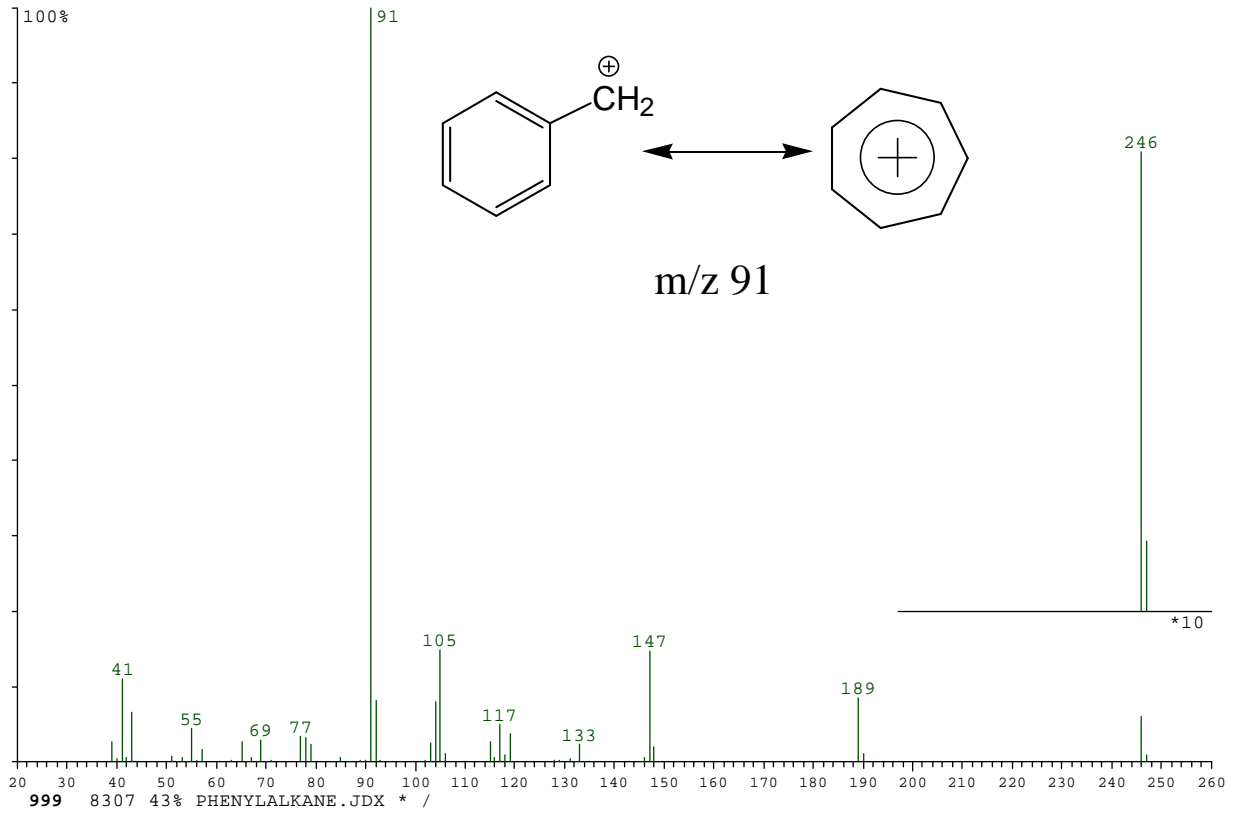


Abbildung 8-12 Massenspektren (m/z 91 und 246) von 5-Phenyldodecan in der Hauptfraktion der Probe #0

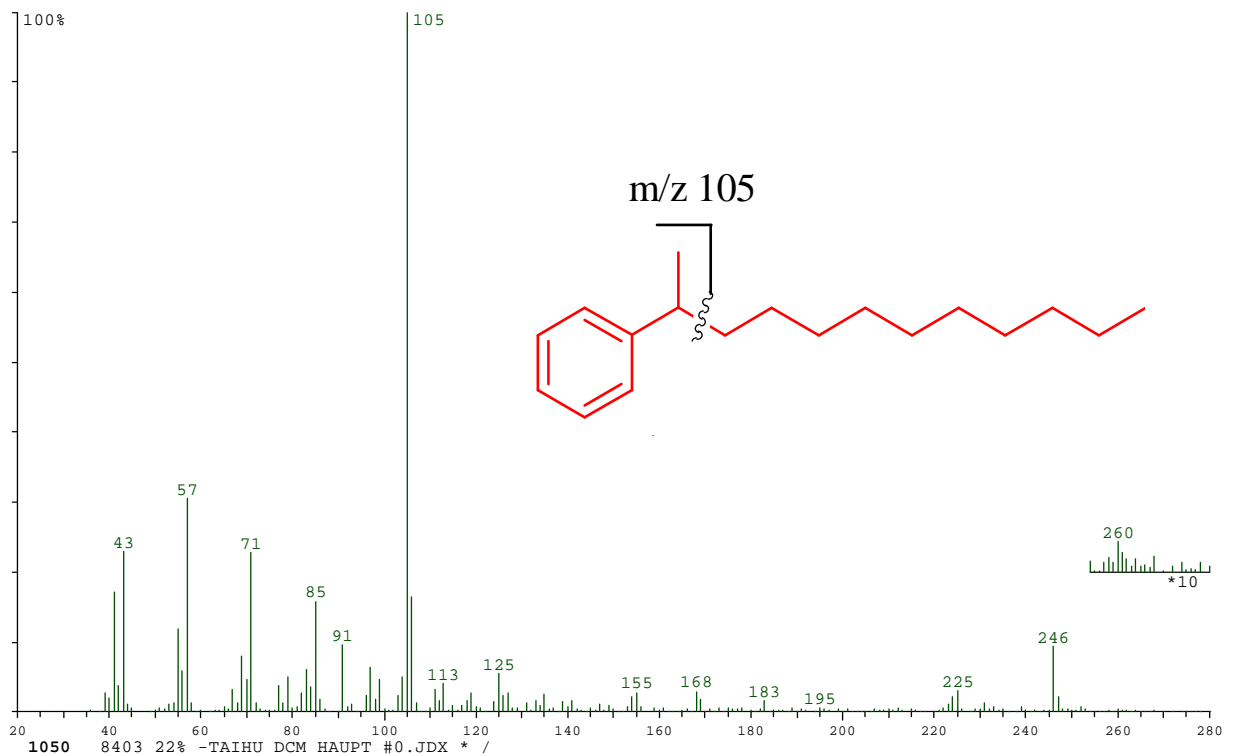


Abbildung 8-13 Massenspektren (m/z 105 und 260) von 2-Phenyldodecan aus der Hauptfraktion Probe #0

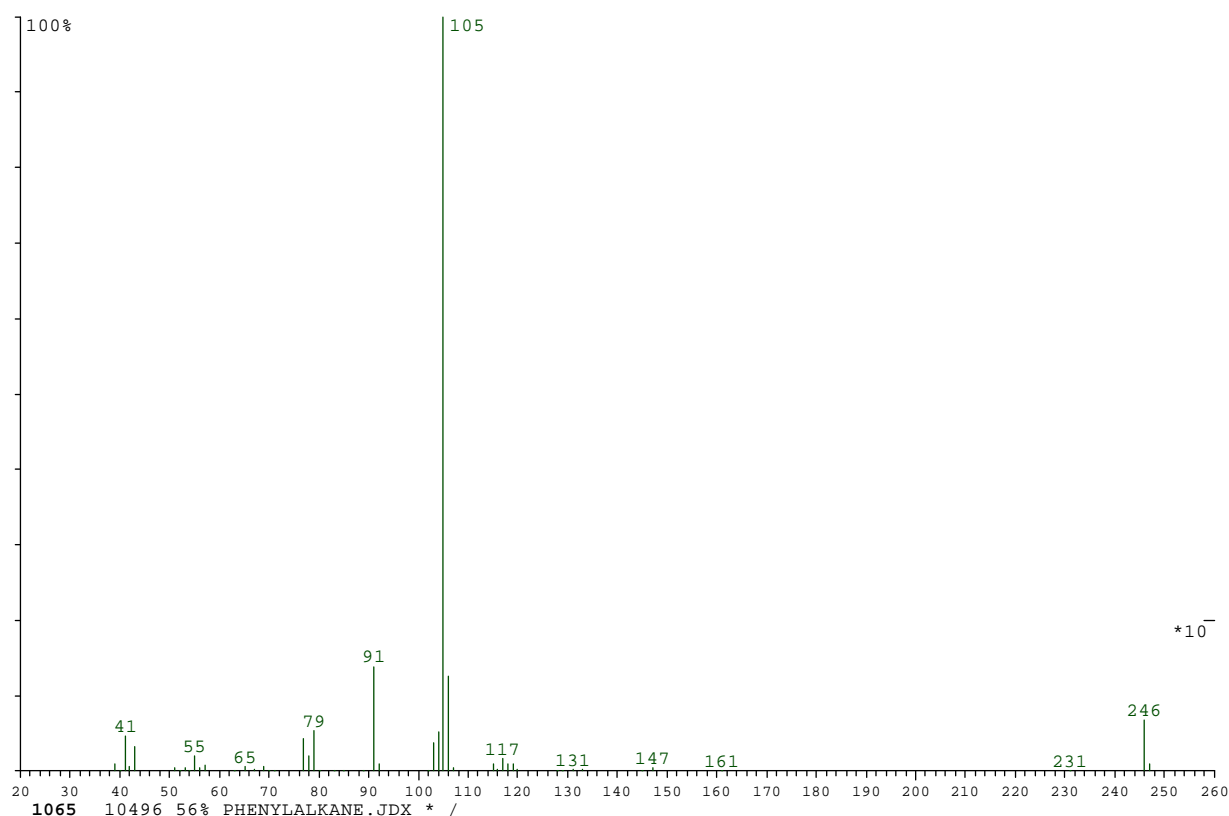


Abbildung 8-13 (Forts.) Massenspektren (m/z 105 und 260) von 2-Phenyldodecan des technischen Gemisches (m/z 91, 105 und 260)

In Tabelle 8-4 sind alle in der Hauptfraktion identifizierten langkettigen Alkylbenzole zusammengefasst.

Alkyaromat	R _I	Fraktion
5-Phenylundecan	1606	Hauptfraktion (+ #1)
6-Phenyldodecan	1699	Hauptfraktion
5-Phenyldodecan	1703	Hauptfraktion
6-Phenyltridecan	1798	Hauptfraktion
5-Phenyltridecan	1805	Hauptfraktion
4-Phenyltridecan	1817	Hauptfraktion
2-Phenyldodecan	1776	Hauptfraktion
2-Phenyltridecan	1892	Hauptfraktion

Tabelle 8-4 Im Dichlormethan-Extrakt der Sedimentprobe #0 identifizierte langkettige Alkylbenzole

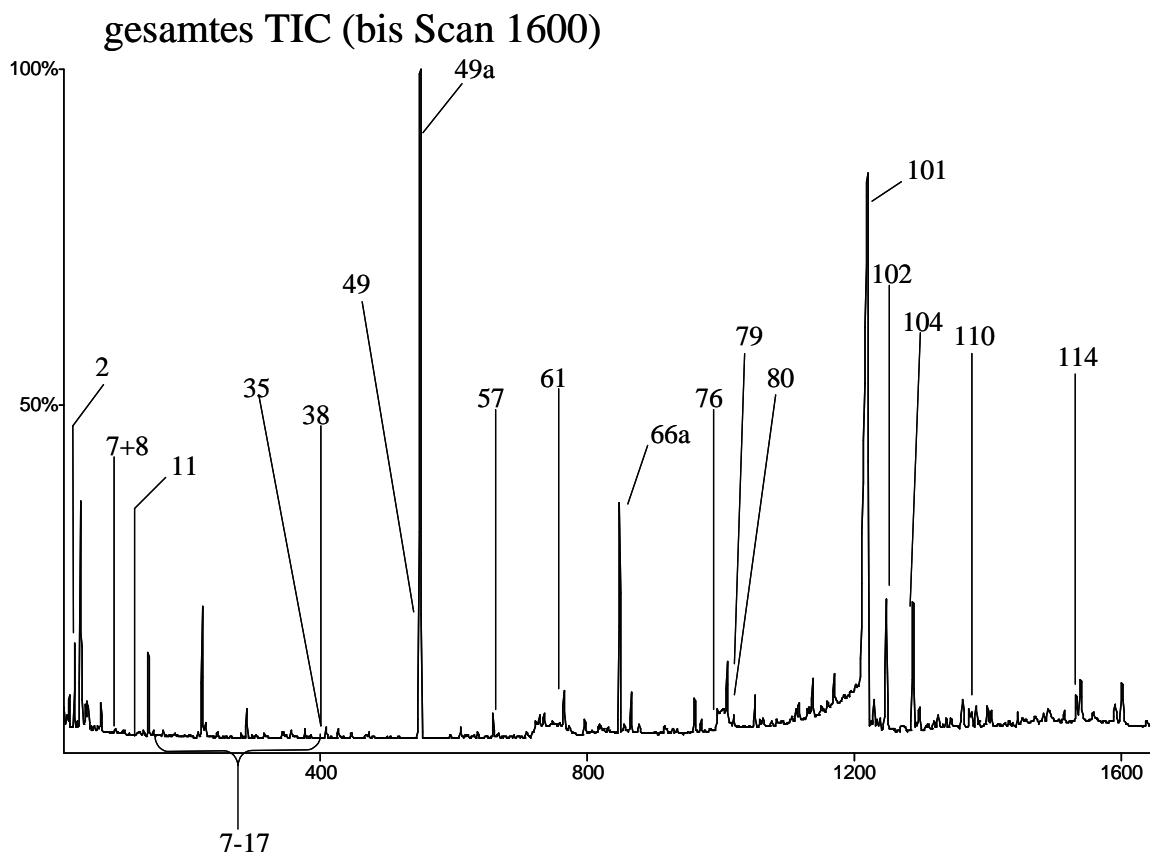
Die langkettigen Alkylbenzole repräsentieren eine Substanzklasse, die u.a. durch Eganhouse^[94] bzw. Schwarzbauer et al.^[95] als Kontaminanten in Sedimenten identifiziert wurden. Sie entstehen durch den mikrobiellen Abbau von Alkylbenzolsulfonaten und können so als ein Marker für häusliche Abwässer angesehen werden.^[94,95,96]

Unter aeroben Bedingungen werden die linearen Alkylbenzole auch zu den entsprechenden Säuren abgebaut. Alkylbenzolsulfonsäuren haben technische Bedeutung als Emulgatoren, Flotationsmittel und Detergenzien. Andererseits dienen die langkettigen Alkylbenzole auch als Ausgangsstoffe zur industriellen Produktion von Alkylbenzolsulfonaten.^[96]

Die Alkyaromaten traten hauptsächlich in der Probe #0 (Dichlormethan) auf, was als ein Indikator für die Belastung dieser Seeregion mit Haushaltsabwässern, die ungeklärt in den See eingeleitet wurden, angesehen werden kann. Es ist somit davon auszugehen, dass u.a. Detergenzien (Alkylbenzolsulfonate) an dieser Stelle in den See gelangen, für die mikrobielle Abbauprodukte im Sediment in Form der LABs identifiziert wurden^[97,98,99]

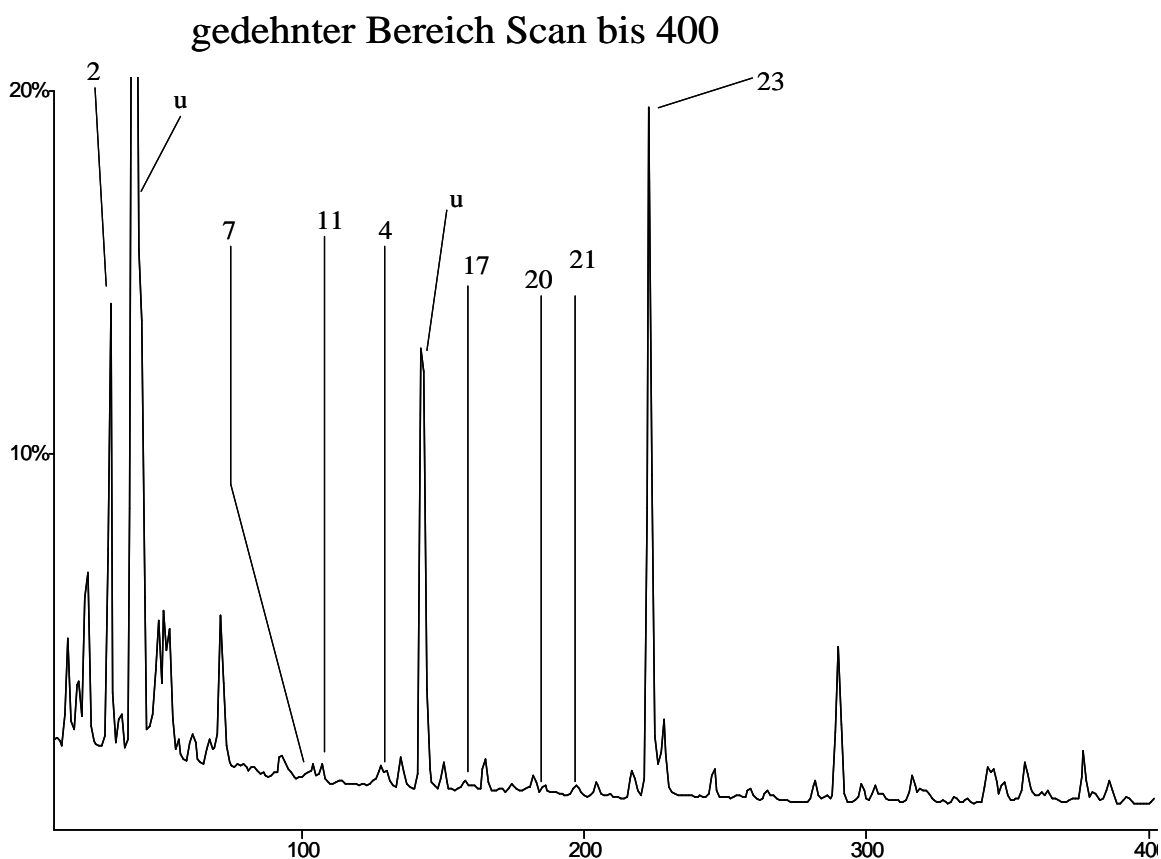
Probe #0, Dichlormethan-Extrakt, farblose Nachfraktion

In dieser Fraktion konnten eine Reihe von PAKs (Abbildung 8-14, oben) identifiziert als auch unterschiedlich alkylierte PAK "zugeordnet" werden, deren Massenspektren im Anhang, Kap.16.2., explizit aufgeführt sind. Es ist dabei davon auszugehen, dass erstere einen wesentlichen Beitrag zur vorliegenden Mutagenität und zur Induktion von CYP-450 1A1 im EROD leisten. Des weiteren konnten auch Hetero-PAK wie z.B. Dibenzo[d,b]thiophen (2) identifiziert werden.



[a] 2: γ -Hexanolid; 7: Benzaldehyd; 8: Tricyclen; 11: Phenol; 17: Octanal; 20: Benzylalkohol; 21: Hexylacetat; 23: Acetophenon; 35: Dodecan; 38: Decanal; 49: Tridecan; 49a: Bicyclohexan; 57: Tetradecan; 61: Pentadecan; 76: Dibenzo[d,b]thiophen; 66a: 2,2,4-trimethyl-1,3-pentandioldiisobutyrat (MS) 79: Phenanthren; 80: Anthracen; 101: S₈; 102: Fluoranthren; 104: Pyren; 110: Docosan; 114: Benzo[a]anthracen;

Abbildung 8-14 TIC der farblosen Nachfraktion der Probe #0 (Dichlormethan) (gesamt)



2: γ -Hexanolid; 7: Benzaldehyd; 8: Tricyclen; 11: Phenol; 17: Octanal; 20: Benzylalkohol; 21: Hexylacetat; 23: Acetophenon; u: unbekannt

Abbildung 8-14 (Forts.) TIC der farblosen Nachfraktion der Probe #0, vergrößerter Bereich bis Scan 400

Die Hauptkomponente dieser Fraktion ist elementarer Schwefel, S_8 , der sich mittels GPC nicht vollständig abtrennen ließ. Eine bessere, geeignetere Methode stellt die vorherige Behandlung mit elementarem, aktiviertem Kupfer nach Franke^[33] dar.

Alkylierte PAK

Wie sich aus dem Vergleich mit Massenspektren der Spektrenbibliothek ergab, konnten im Extrakt mehrere Isomere des Methylphenanthrens (RI 1847, 1853, 1867 bzw. 1871) gefunden werden, dessen Massenspektrum in Abbildung 8-15 exemplarisch gezeigt ist. Weiterhin ließen sich isomere Dimethylphenanthrene (RI 1988 und 1996) und Trimethylphenanthrene (RI 2099, 2108, 2125) ableiten. Höhere kondensierte Alkyl-PAK wie das Methylpyren (RI 2133, 2157, 2175, 2184, 2207, 2215) oder Dimethylpyren (RI 2278, 2306) waren ebenso vertreten.

Spezieller Teil

TAIHU DCM NACH 0 .dem
 MaxE2 SumE4
 RI 97042 32972
 192 2909 2390
 165 313 62
 95 640 498

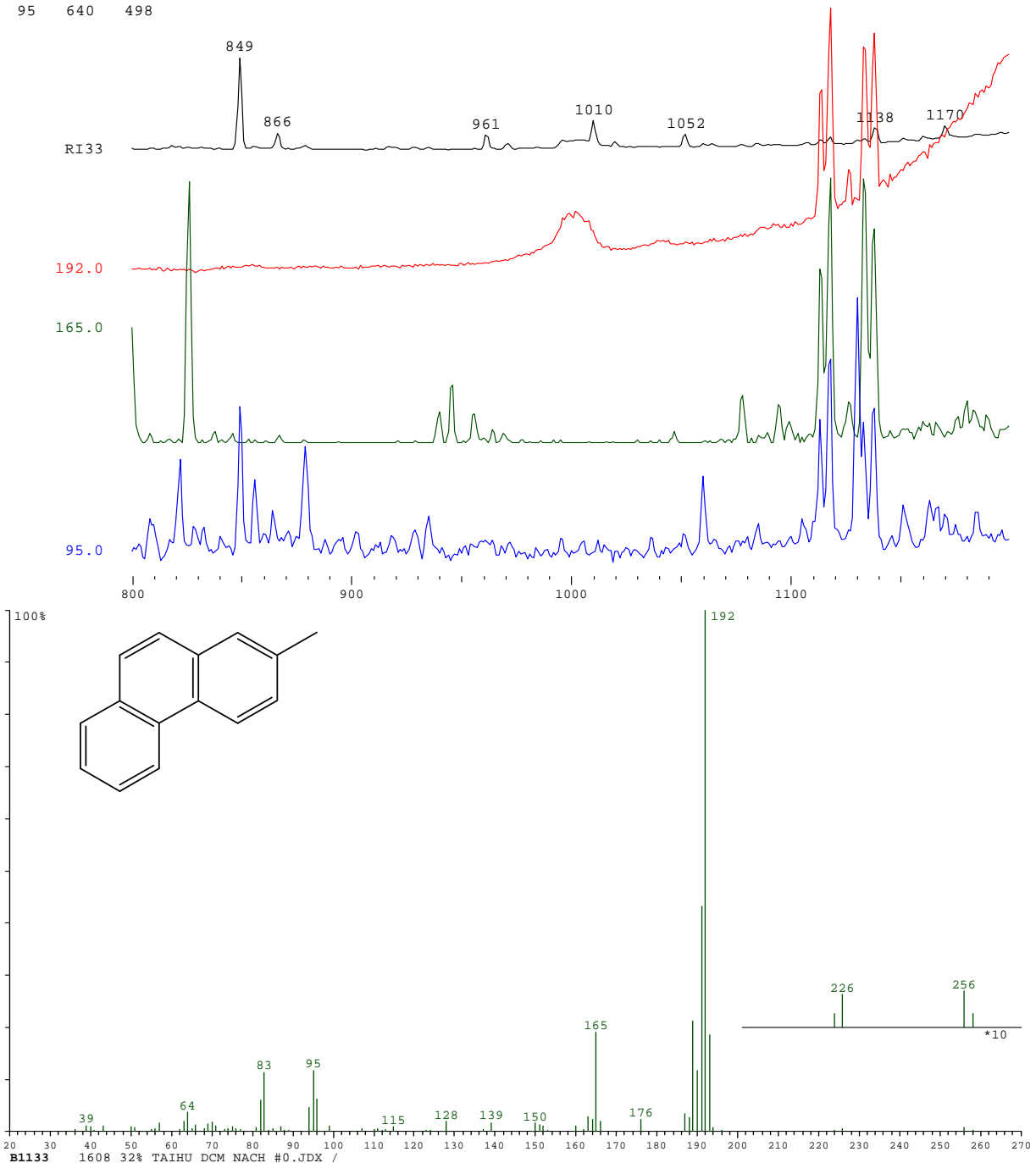


Abbildung 8-15 TIC der farblosen Nachfraktion der Probe #0 (Dichlormethan) sowie Ionenspuren der Massen m/z 192,165, 95; Scan-Nr. 1133 2-Methylphenanthren (oben) und Massenspektrum des 2-Methylphenanthrens der Probe

Als Hauptfragmentierungen erfolgten neben Dehydrierungen noch weiterhin die Abspaltung einer $C_2H_2^+$ -Einheit unter Ringöffnung. Methylsubstituierte PAK bilden Tropyliumkationen, die ein intensives Fragmentation geben. Das Molekülion dagegen erscheint mit geringerer Intensität.

Hetero-PAK

Neben PAKs und alkylierten PAKs wurden auch Hetero-PAK wie das Benzo[b]naphtho[2,3-d]furan (RI 2070) bzw. dessen Isomere (RI 2085, 2322) gefunden. Die Abbildung 8-16 zeigt die Ionenspur der Masse m/z 184 und das Massenspektrum des Dibenzo[d,b]thiophens, das neben zwei weiteren Hetero-PAK in dieser Fraktion auftrat. Der Vergleich der Fragmentierungsmuster der Massenspektren von der authentischen Referenzsubstanz und des Analyten sowie der Retentionsindices von Analyt- und Referenzsubstanz zeigen eine deutliche Übereinstimmung.

```
TAIHUDCMNACH0.JDX *
      MaxE2 SumE4
RI  97042 32935
184  742   22
152 1024   61
139  115   25
```

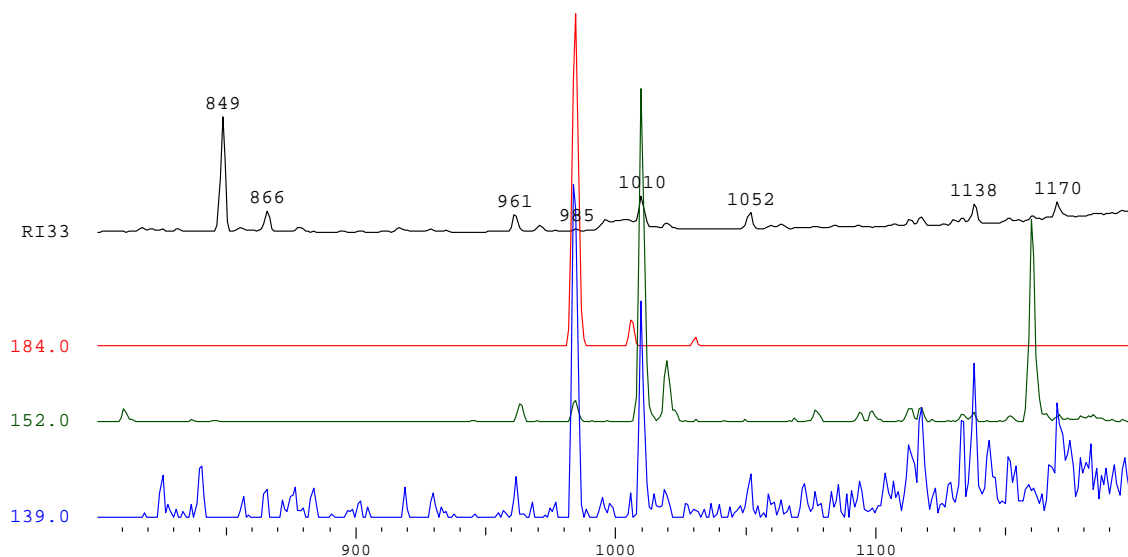


Abbildung 8-16 TIC der farblosen Nachfraktion der Probe #0 (Dichlormethan) sowie Ionenspuren der Massen m/z 184, 152 und 139; Scan-Nr. 985 Dibenzo[d,b]thiophen

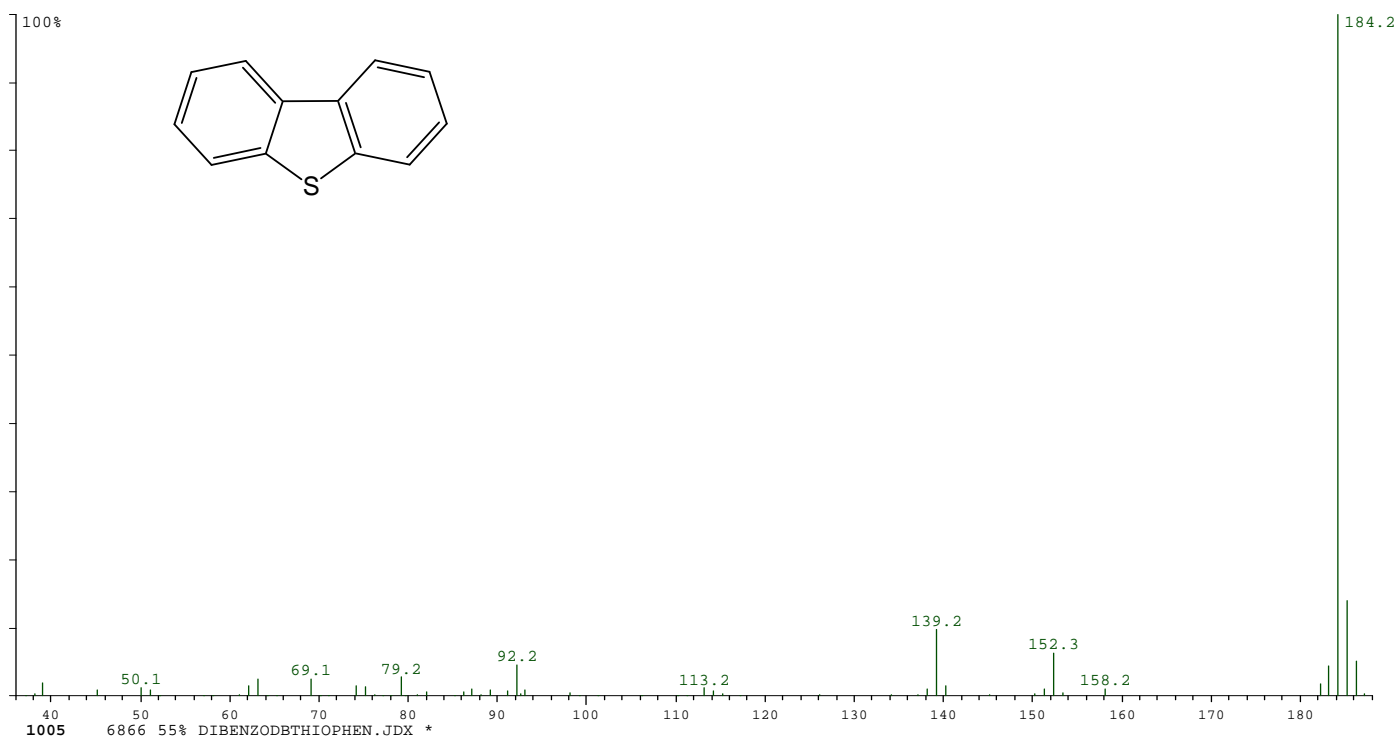
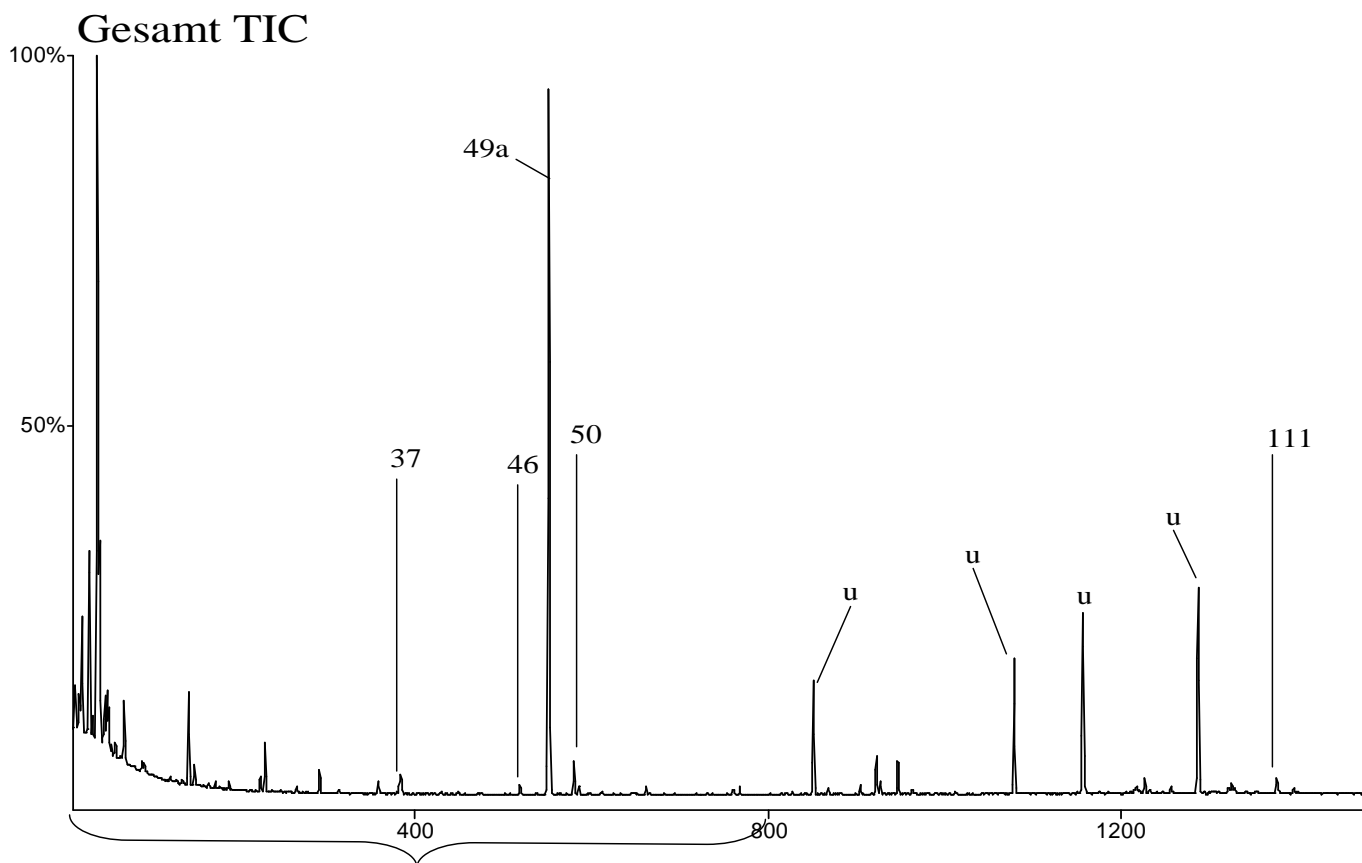


Abbildung 8-16 (Forts.) Massenspektrum des Dibenzodithiophens (Standardsubstanz, unten)

Das Auftreten von Dibenzodithiophen vor allem im marinen Ökosystem wird in der Literatur^[100] zum Teil auf natürliche Quellen zurückgeführt, die geologischen Ursprungs sind und letztlich Ausspülungen darstellen. Diese werden über physikalische Transportmechanismen verteilt und weisen dementsprechende Konzentrationsunterschiede in den einzelnen küstennahen Meeresregionen auf. Anthropogene Quellen sind die bei der Verarbeitung von schwefelhaltigem Rohöl in der petrochemischen Industrie anfallenden Dibenzodithiophen-Einträge. Aufgrund des Fehlens maritimer Einträge in den Taihu kann allerdings davon ausgegangen werden, dass das Dibenzodithiophen im Taihu anthropogenen Ursprungs ist.

Probe #0, Dichlormethan-Extrakt, rote Nachfraktion

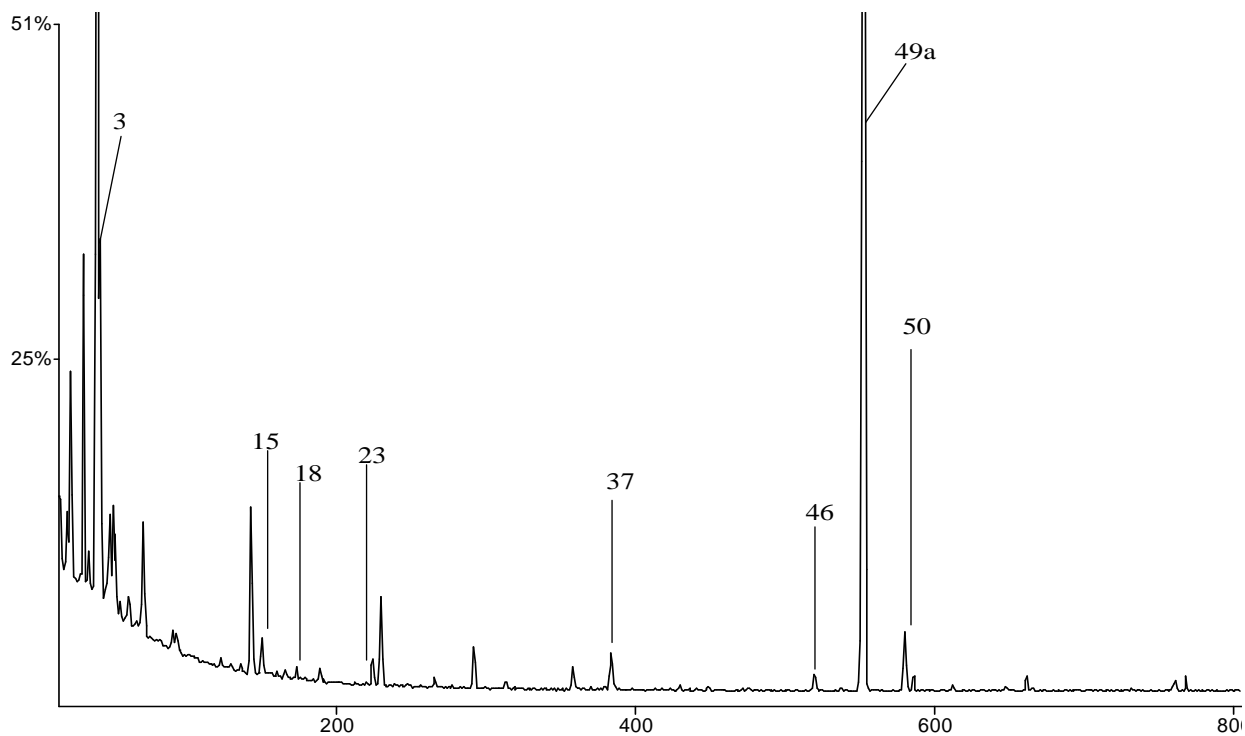
Neben 2-Methylnaphthalin konnte Reten und dessen Hydrierungsprodukte, aber auch das 1,3,5-Trimethyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion sowie 1,4-Dichlorbenzol identifiziert werden.



37: Naphthalin; 46: 2-Methylnaphthalin; 49a: Bicyclohexan (MS); 50: 1,3,5-Trimethyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion;
111: Reten; u: unbekannt

Abbildung 8-17 Gesamtes TIC der roten Nachfraktion

Bereich bis Scan 800

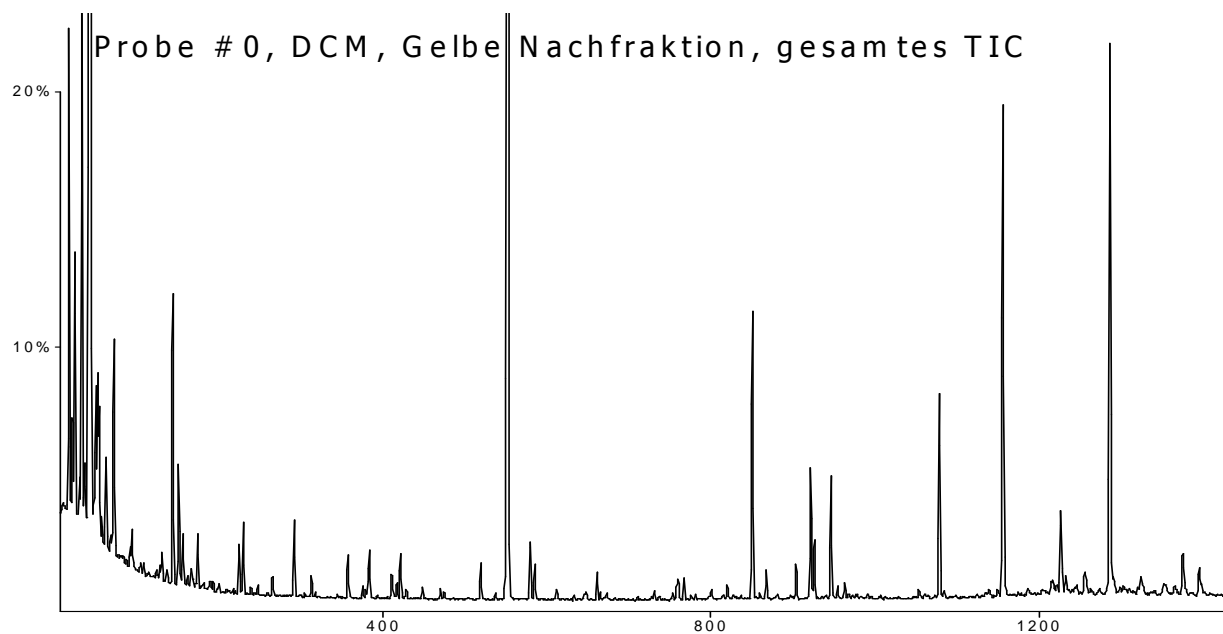


3: 4-Methyl-2-buten-4-olid; 15: 2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol; 18: 1,4-Dichlorbenzol; 23: Acetophenon; 37: Naphthalin; 46: 2-Methylnaphthalin; 49a: Bicyclohexan (MS); 50: 1,3,5-Trimethyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion

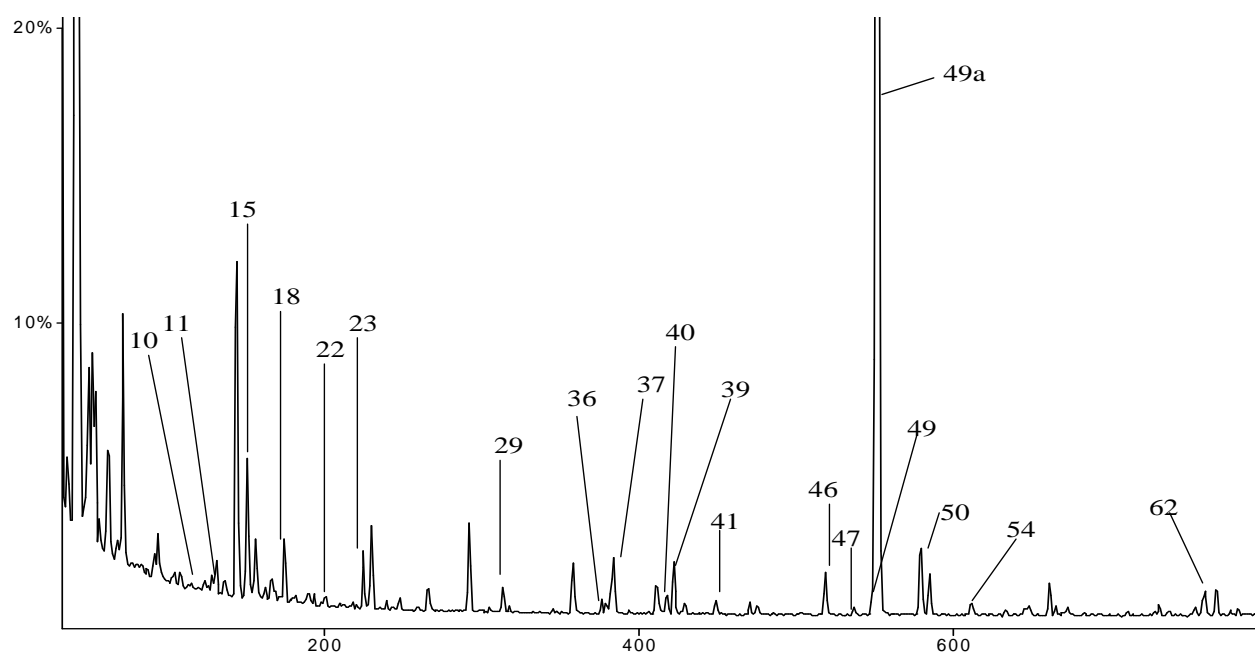
Abbildung 8-17 (Forts.) TIC der roten Nachfraktion; vergrößerter Ausschnitt (Scan bis 800)

Probe #0, Dichlormethan-Extrakt, gelbe Nachfraktion

In der gelben Fraktion konnten einige Komponenten identifiziert werden, die zuvor schon in der roten Fraktion identifiziert wurden. Neben Di- und Trichlorbenzole, finden sich hierin auch wieder einige PAK, sowie alkylierte Homologa. Ebenso zählt hierzu das Reten, dessen toxikologische Eigenschaften im folgenden Abschnitt eingehender diskutiert werden sollen. Daneben wurden auch Komponenten wie Benzothiazol oder das schon beschriebene Cyanursäurederivat 1,3,5-Trimethyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion gefunden.



TIC Scan bis 800

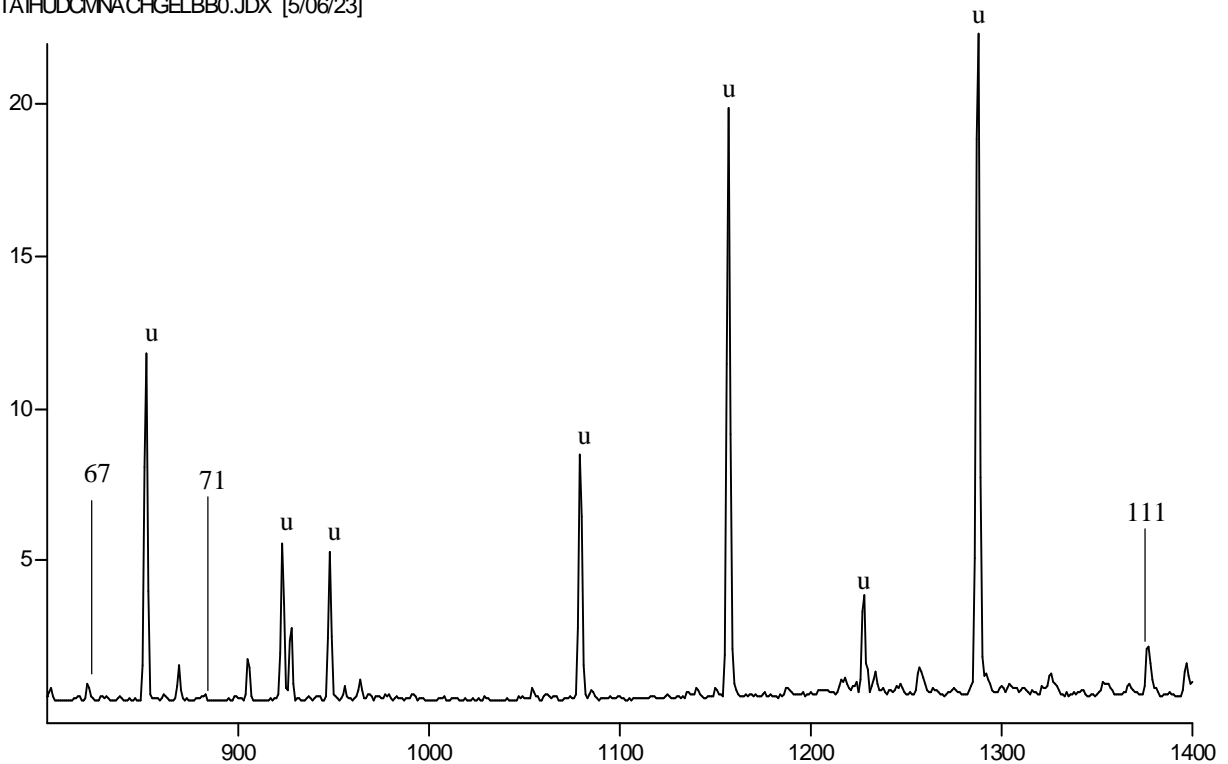


10: 6-Methyl-2-heptanol; 11: Phenol; 15: 2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol; 18: 1,4-Dichlorbenzol; 22: 1,2-Dichlorbenzol; 23: Acetophenon; 29: Oxoisophoron; 36: 1,2,4-Trichlorbenzol; 37: Naphtalin; 40: Benzothiazol; 39: 2-Decanol; 41: γ -Octanolid; 46: 2-Methylnaphtalin; 47: 1-Methylnaphtalin; 49: Tridecan; 49a: Bicyclohexan (MS); 50: 1,3,5-Trimethyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion; 54: Acenaphten; 62: 3,4-Dimethoxybenzylalkohol

Abbildung 8-18 TIC der gelben Nachfraktion; Scan bis 800

TIC Scan 800-1400

TAIHUOCMNACHGELBB0.JDX [5/06/23]



67: Fluoren ; 71: Syringa aldehyd; 111: Reten; u: unbekannt

Abbildung 8-18 (Forts.) TIC der gelben Nachfraktion; Scan 800-1400

Reten und dessen Homologa

Das Totalionenstromchromatogramm der gelben Nachfraktion (Abbildung 8-18) zeigt u.a. das Reten (RI 2177) (Abbildung 8-19). Die Ionenspuren der Massen m/z 234 und 219 wurden mit einer authentischen Referenzsubstanz verglichen.

Spezieller Teil

TAIHUDCMNACHGELBB0.JDX *
 MaxE1 SumE3
 RI 81364 11049
 234 1255 61
 219 1650 89
 204 388 18
 189 689 64

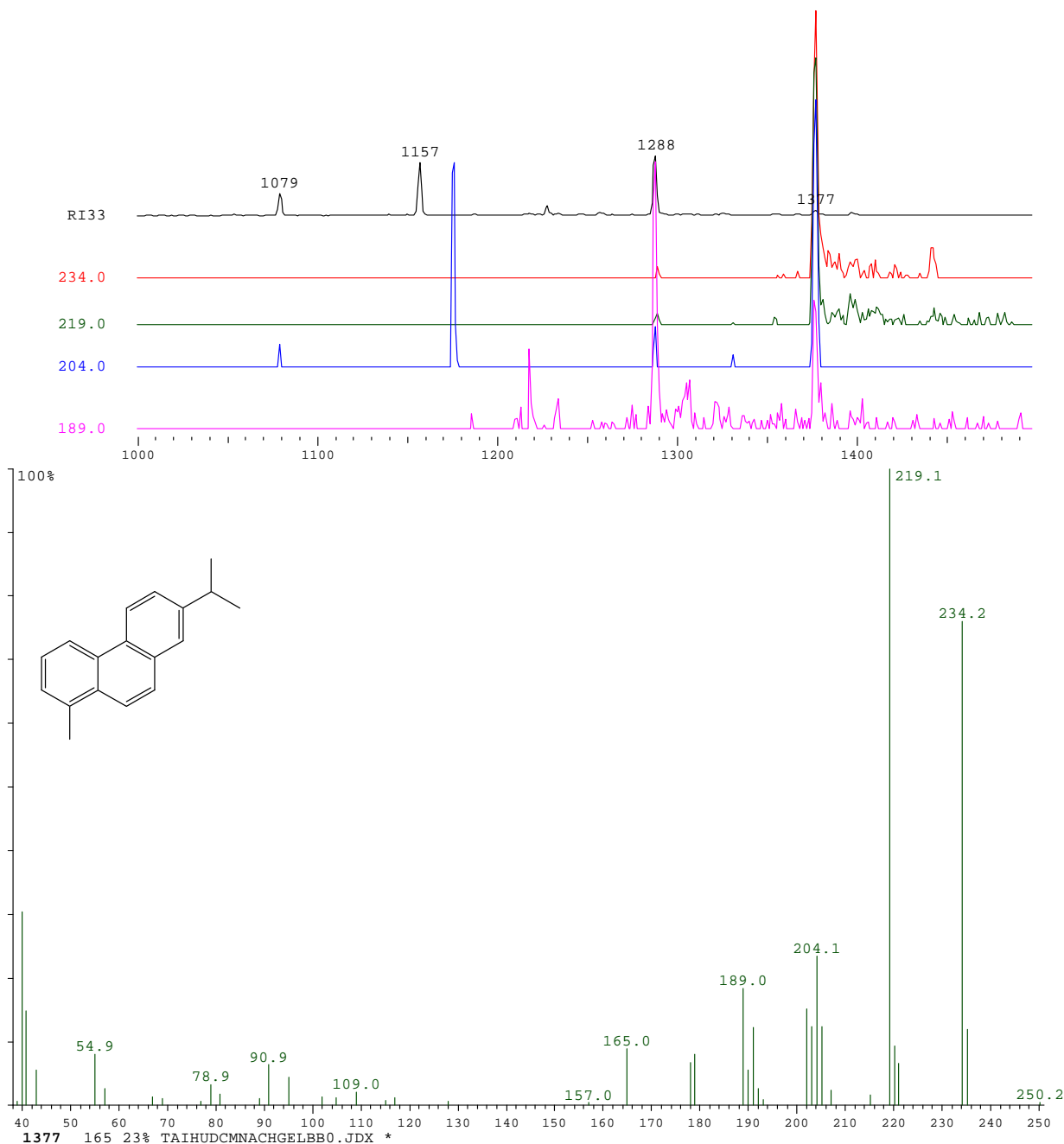


Abbildung 8-19 Vergleich des TIC der gelben Nachfraktion der Probe #0 (Dichlormethan) mit den Ionenspurten der Massen m/z 234, 219, 204 und 189, Scan-Nr. 1377 Reten, sowie Massenspektrum der Referenzsubstanz des Retens

Unter anderem konnte Tetrahydroreten sowie das Dehydroabietin, dessen Massenspektren in Abbildung 8-20 und 8-21 dargestellt sind, identifiziert werden. Das Massenspektrum eines weiteren Gerüsthomologen zeigt Abbildung 8-23. Die Analogie zur Fragmentierung des Retens ergibt sich für das Tetrahydroreten aus der Addition von 4 Massen zum Basis- und Molpeak, so dass die Ionen der Massen m/z 223 und 238 entsprechend resultieren.

Die den Fragmentierungen zugrunde liegenden Strukturen muss man sich durch sequentielle Abspaltung von Methylgruppen entstanden denken, so dass dem Fragmentation der Masse m/z 181 schließlich die Struktur des Tetrahydrophenanthrens entspricht.

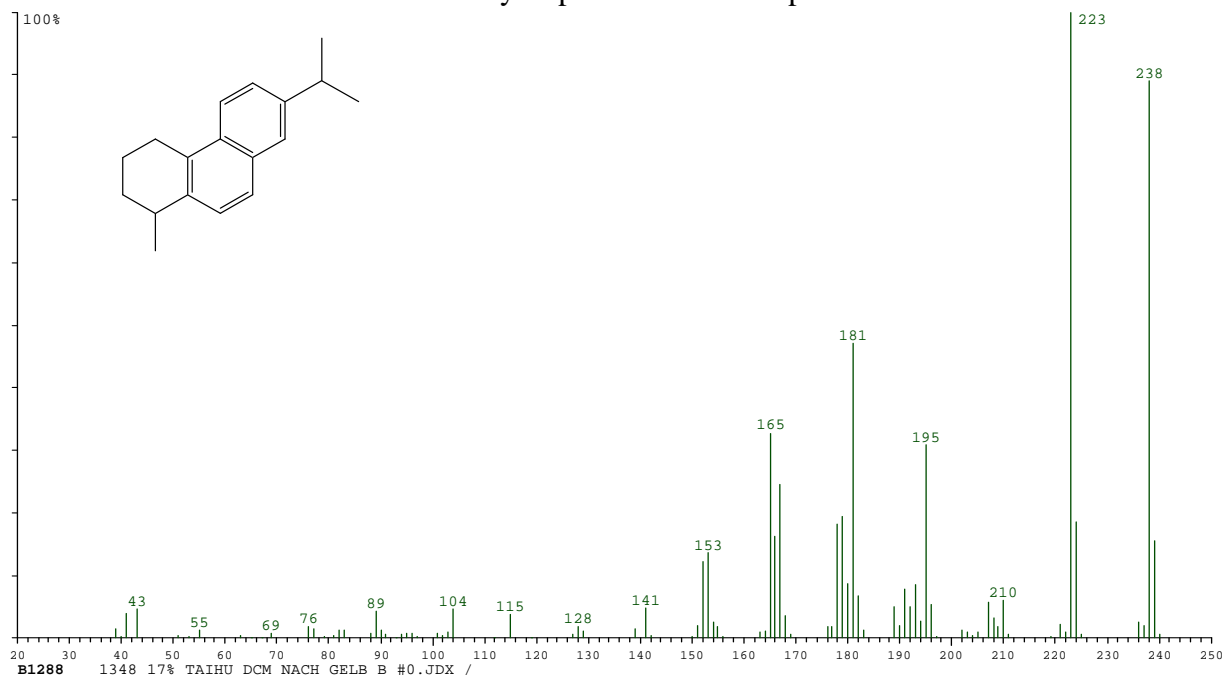


Abbildung 8-20 Massenspektrum des Tetrahydroretens in der gelben Nachfraktion (oben)

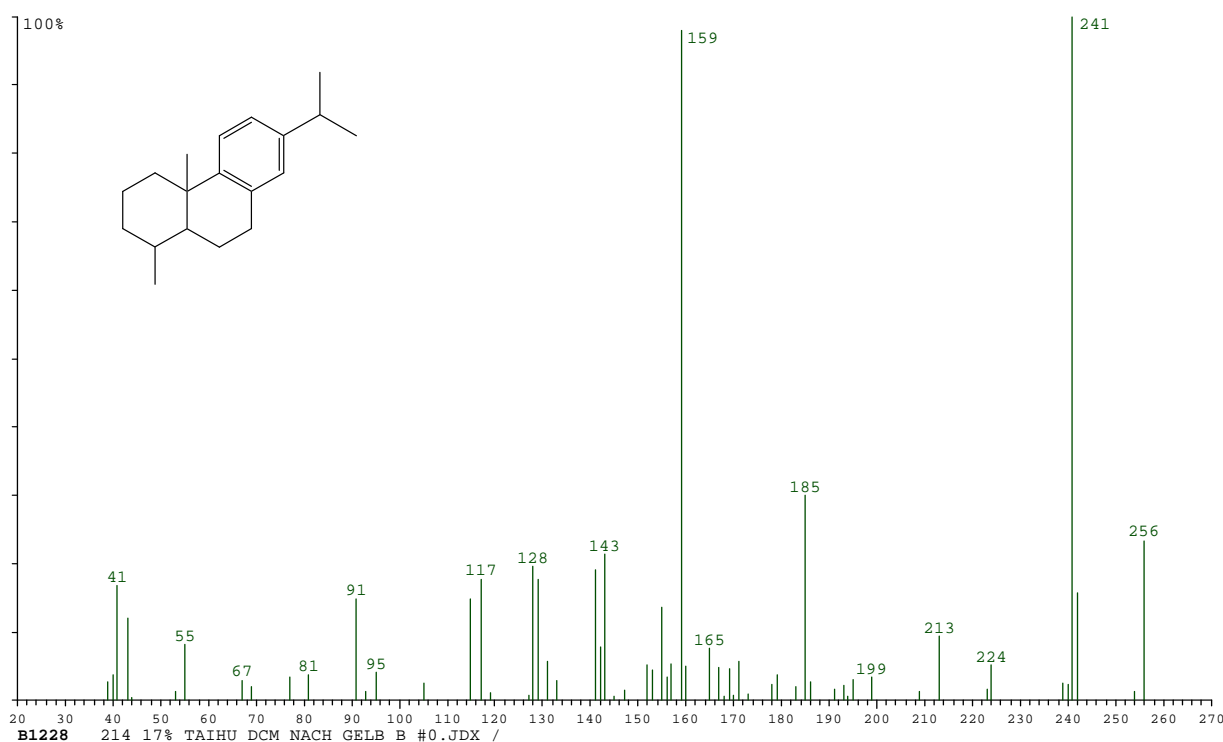


Abbildung 8-21 Massenspektrum des Dehydroabietins in der Fraktion

Im Unterschied zu den Fragmentierungsmustern des Retens bzw. Tetrahydroretens, zeigt das Fragmentierungsmuster des Dehydroabietins ein intensives Fragmentation der Masse m/z 159, welches in Abbildung 8-22 wiedergegeben ist.

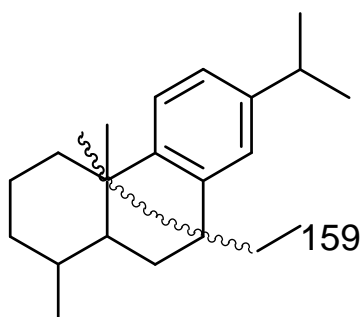


Abbildung 8-22 Struktur des Fragments der Masse m/z 159

Weitere Gerüstisomere lassen sich in der Fraktion finden, wenn man die Ionenspuren der Massen 210 und 195 des Tetrahydroretens untersucht. Man findet dabei die Isomere (905, 923, 928 und 948), die sich alle durch ein intensives Fragmentation der Masse m/z 195, das den Basispeak darstellt, auszeichnen.

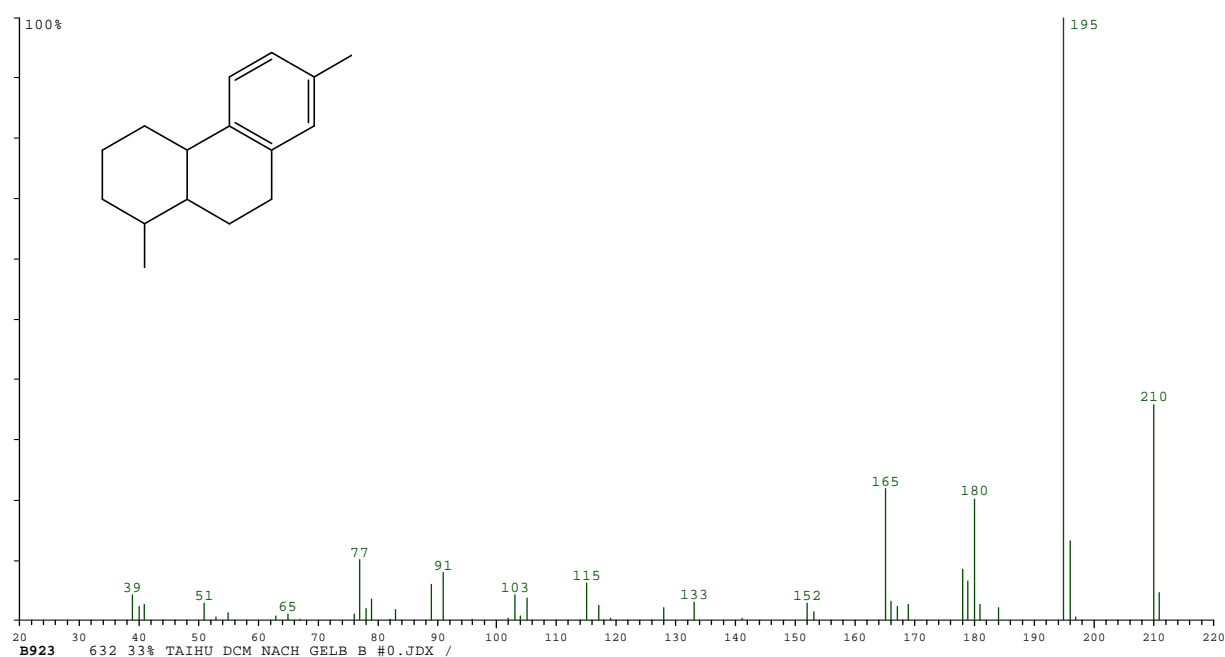


Abbildung 8-23 Massenspektrum eines Gerüstisomers/-homologs des Retens in der gelben Nachfraktion

Chlorbenzole

Als weitere umweltrelevante Xenobiotika konnten das 1,2- und 1,4-Dichlorbenzol sowie das 1,2,3-Trichlorbenzol identifiziert werden. Chlorbenzole haben aufgrund der bakteriziden Wirkung Bedeutung als Desinfektionsmittel, zeigen aber weder mutagene noch kanzerogene Wirkung im Säugerorganismus^[101] 1,4-Dichlorbenzol, das im Säugerorganismus zum 2,5-Dichlorphenol metabolisiert wird, zeigt ebenfalls keine mutagene Wirkung. Dies wurde zum einen mit einem Ames-Test (+/- S9-Aktivierung) gezeigt, als auch an Lymphozytenzellen von Mäusen.^[101] Untersuchungen zur akuten Toxizität wurden mit unterschiedlichen Expositionsarten und Zeitintervallen an Mäusen und Ratten durchgeführt. Eine einfache Bewertung ist zwar nicht möglich, jedoch zeigte sich einerseits, dass Mäuse wesentlich empfindlicher reagierten als Ratten und andererseits, dass eine einfache Abfolge in der Toxizität in Abhängigkeit vom Chlorierungsgrad nicht beobachtet werden kann.^[101]

Spezieller Teil

```

TAIHUDCMNACHGELBB0.JDX *
MaxEl SumE2
RI 20011 36786
146 2198 648
111 852 201
75 846 192
    
```

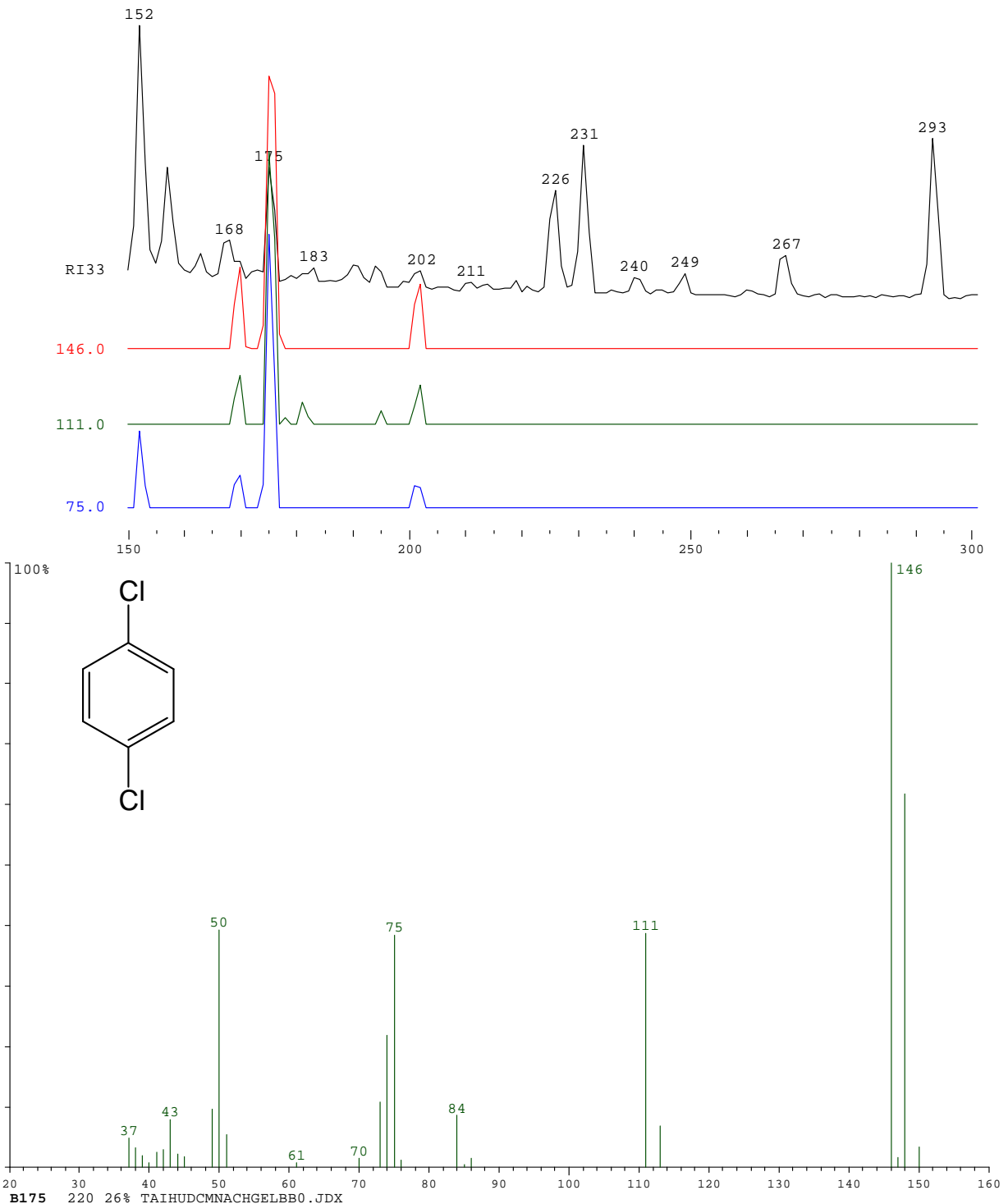


Abbildung 8-24 TIC der gelben Nachfraktion der Probe #0 (Dichlormethan, oben) und Ionenspur der Massen m/z 146, 111, 75; Nr. 175 1,4-Dichlorbenzol; Massenspektrum des 1,4-Dichlorbenzols (Referenzsubstanz)

Spezieller Teil

TAIHUDCMNACHGELBB0.JDX *
 MaxE0 SumE2
 RI 76221 20714
 180 6646 99
 145 681 7
 109 644 18

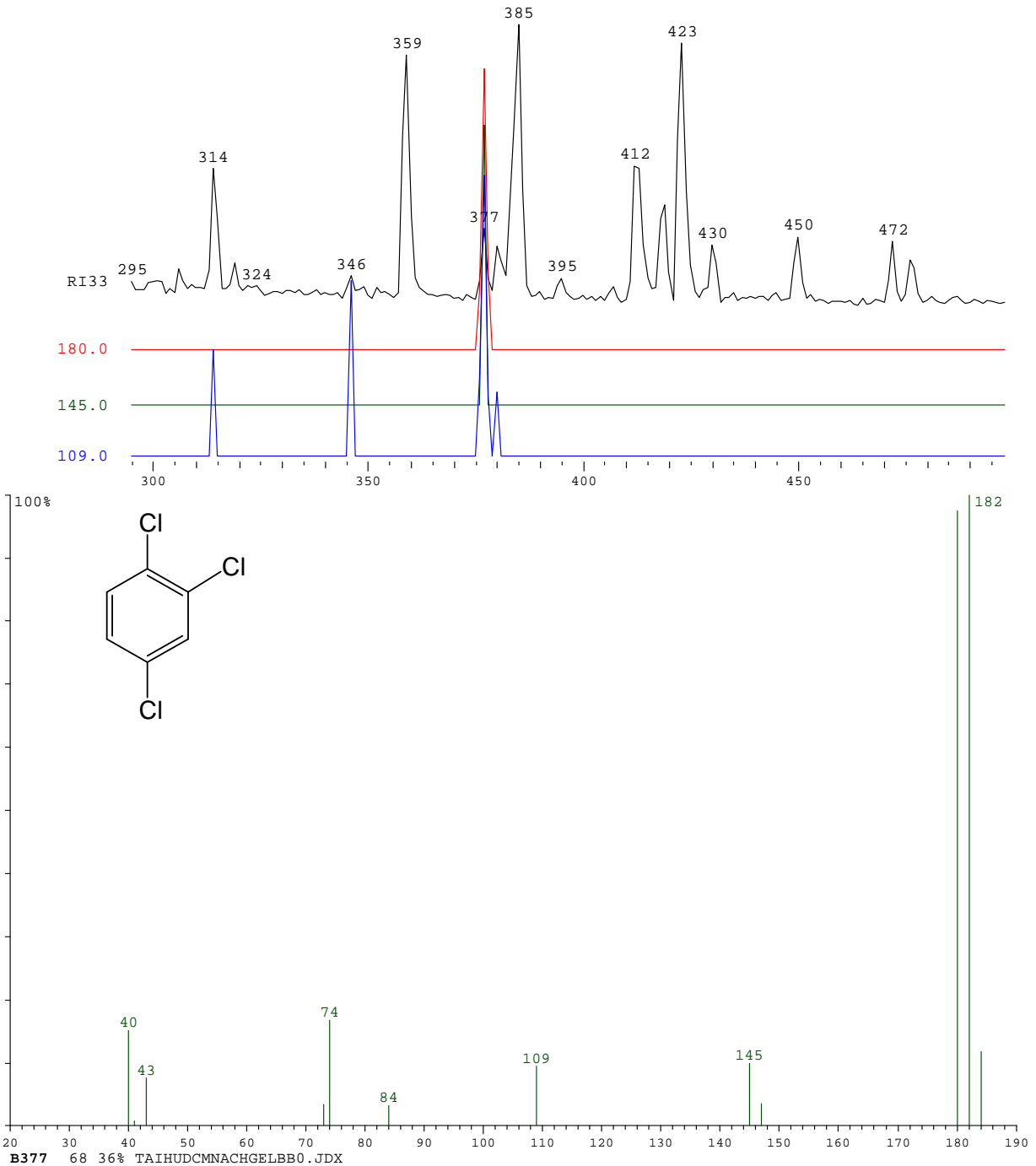


Abbildung 8-25 TIC der gelben Nachfraktion der Probe #0 (Dichlormethan, oben) und Ionenspurten der Massen m/z 146, 111,75; Scan-Nr. 377 1,2,4-Trichlorbenzol; Massenspektrum des 1,2,4-Trichlorbenzol (Referenzsubstanz)

Cyanursäurederivate ("Triazin"-Analoge)

Als ein Vertreter einer weiteren Verbindungsklasse konnte in der gelben Nachfraktion des Dichlormethan-Extraktes ein Cyanursäurederivat identifiziert werden, dessen Ionenspuren sowie zugeordnete Massenspektren in Abbildung 8-26 dargestellt sind.

TAIHUDCMNACHGELBBO.JDX *
 MaxE2 SumE3
 RI 25369 24216
 171 267 60
 143 78 38
 58 312 78

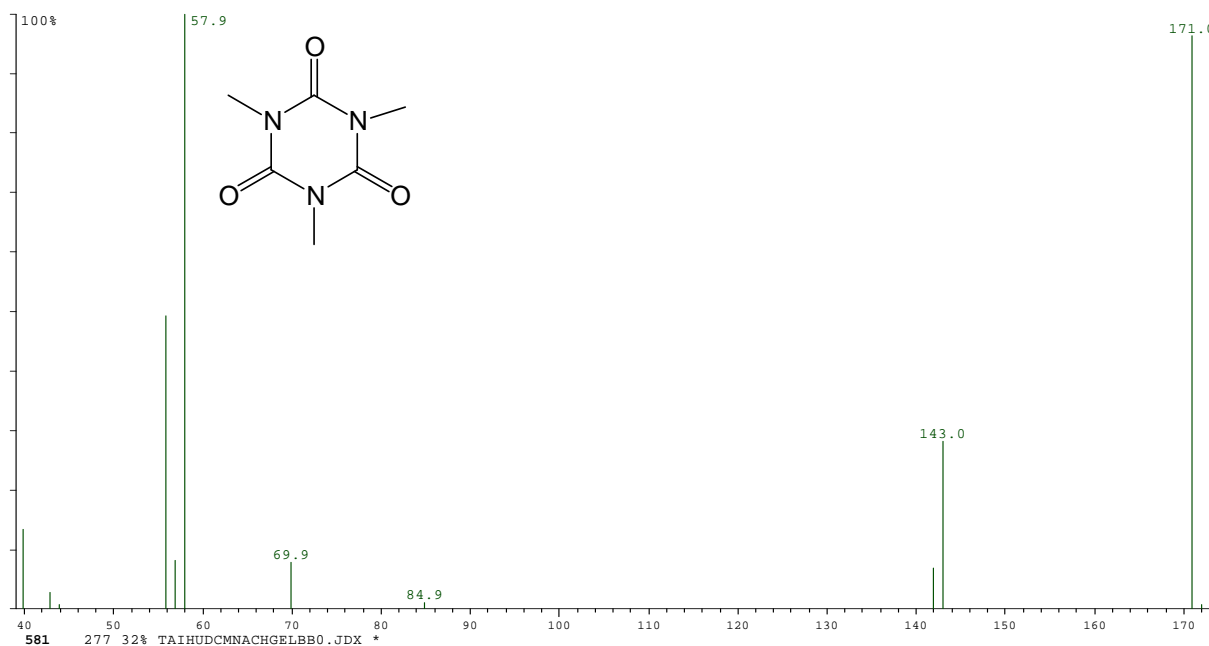
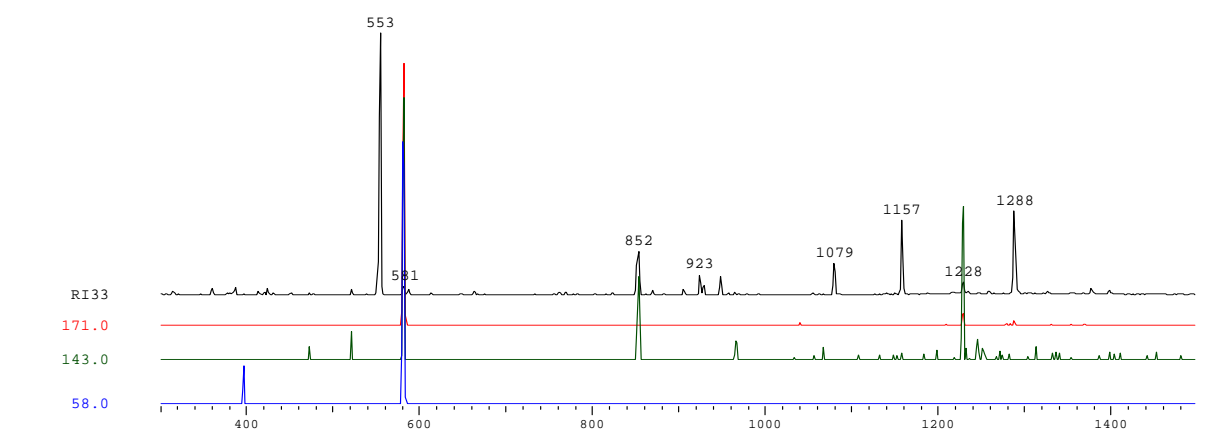
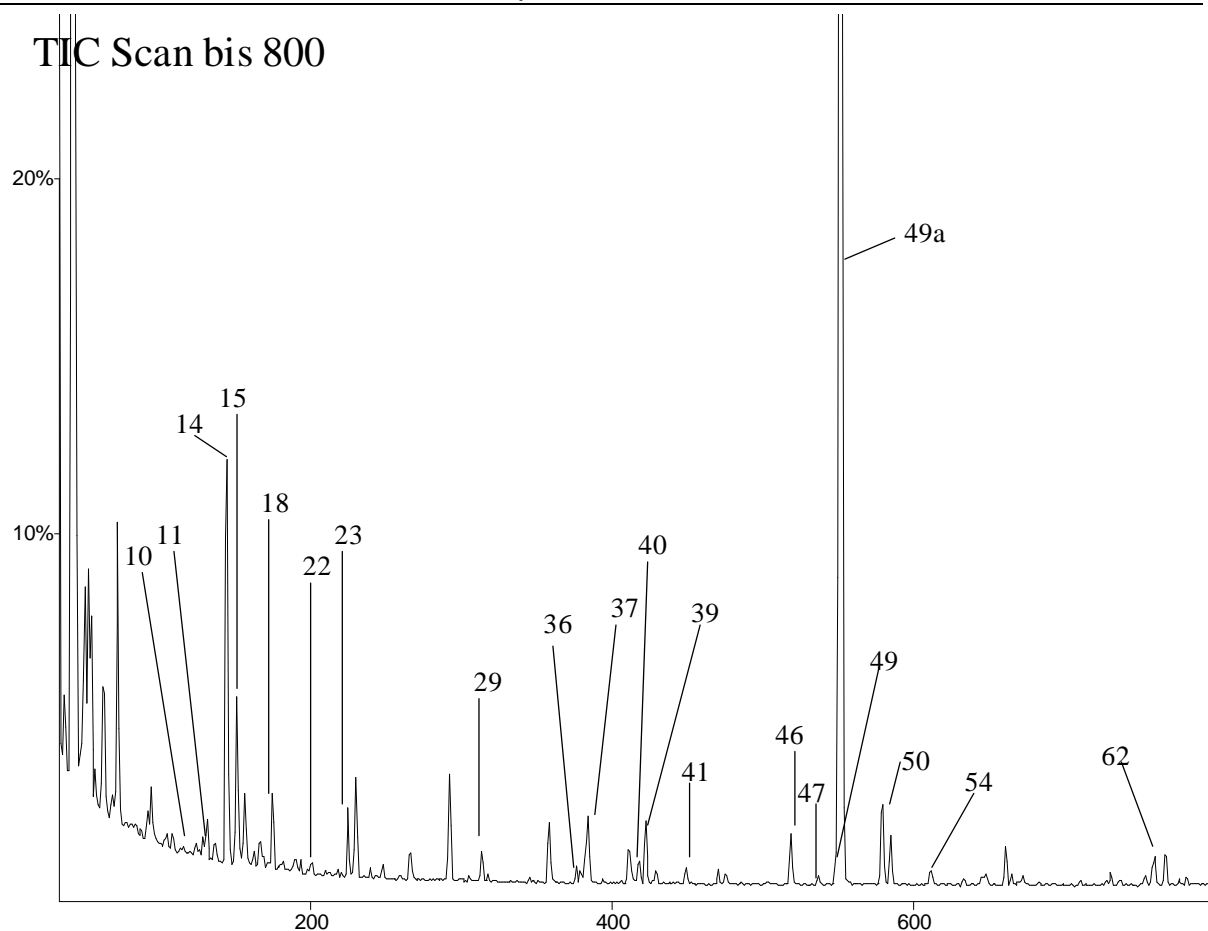


Abbildung 8-26 TIC der gelben Nachfraktion der Probe #0 (Dichlormethan, oben) und Ionenspuren der Massen m/z 171, 143,58; Scan-Nr. 581: 1,3,5-Triazin-2,4,6-trion (oben); Massenspektrum des 1,3,5-Trimethyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trions (Referenzsubstanz)

Benzothiazol

Benzothiazol wurde mehrfach in unterschiedlichen Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes identifiziert, wie z.B. in der gelben Nachfraktion des Dichlormethan-Extraktes der Probe #0 (vgl. Abbildung 8-27).



10: 6-Methyl-2-heptanol; 11: Phenol; 14: N,N-Diethylacetamid; 15: 2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol; 18: 1,4-Dichlorbenzol; 22: 1,2-Dichlorbenzol; 23: Acetophenon; 29: Oxoisophoron; 36: 1,2,4-Trichlorbenzol; 37: Naphthalin; **40: Benzothiazol**; 39: 2-Decanol; 41: γ -Octanolid; 46: 2-Methylnaphthalin; 47: 1-Methylnaphthalin; 49: Tridecan; 49a: Bicyclohexan (MS); 50: 1,3,5-Trimethyl-1,3,5-triazin-2,4,6-trion; 54: Acenaphthen; 62: 3,4-Dimethoxybenzylalkohol

Abbildung 8-27 Ausschnitt des TIC der gelben Nachfraktion

(RI 1193, M 135, BP 135) Benzothiazol

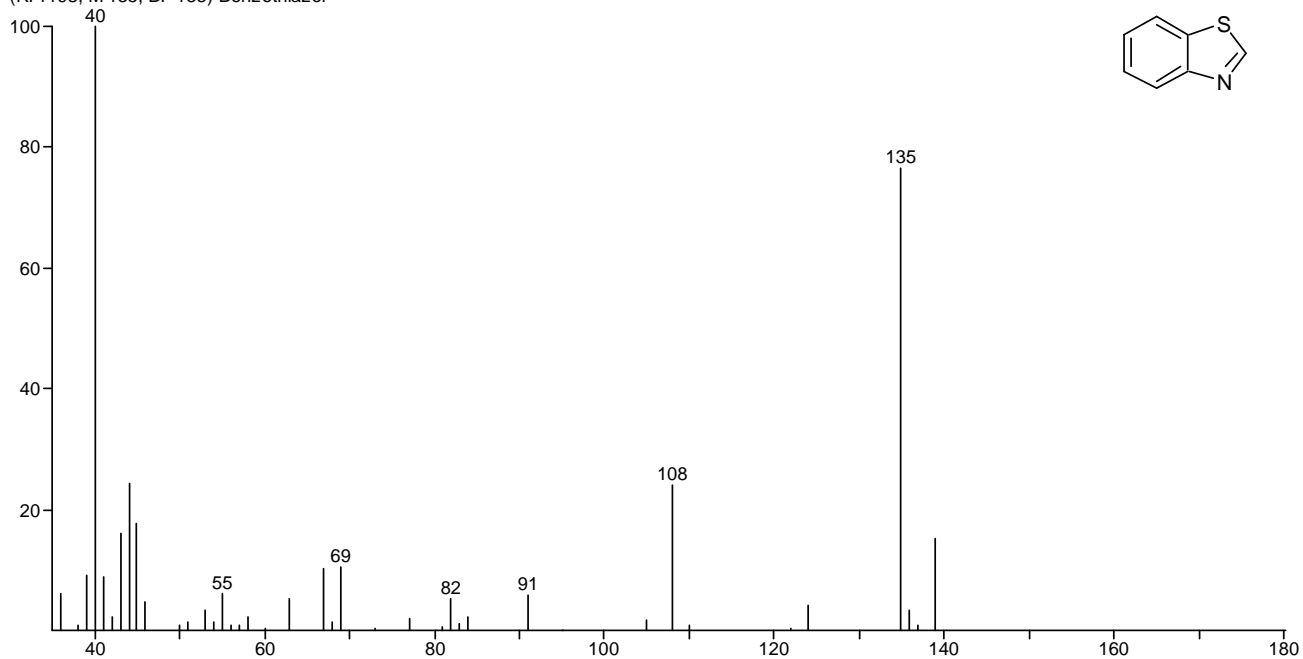


Abbildung 8-28 Massenspektrum des Benzothiazols aus der gelben Nachfraktion

Benzothiazol gilt als Abbauprodukt des 2-(Thiocyanomethylthio)benzothiazols (TCMTB, **1**, Abbildung 8-29), das in der Lederwarenindustrie, sowie in der Papierindustrie und (Ab)-Wasseraufbereitungsanlagen als Biozid Verwendung findet. Gemäß Abbildung 8-29 wird Benzothiazol durch Photolyse des TCMTBs gebildet.^[102, 103]

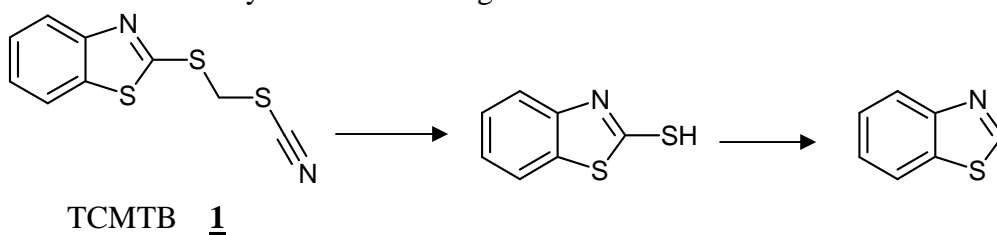


Abbildung 8-29 Vorgeschlagener Mechanismus zur Bildung von Benzothiazol aus TCMTB^[102,103]

Terpenoide Inhaltsstoffe

In Sedimenten sind ebenfalls häufig auch terpenoide Verbindungen anzutreffen, die entweder im Zuge anthropogener Einträge in das aquatische Ökosystem gelangen oder durch diagenetische Prozesse, z.B. mikrobielle Abbaureaktionen, aus Vorläufersubstanzen hervorgehen.

Hierzu zu zählen die in der Vorfraktion des Dichlormethan-Extraktes, Probe #0 identifizierten Substanzen wie Dihydroactinolid oder Longicamphenilon (vgl. Abbildung 8-32) und der synthetische Geruchstoff Oxoisophoron (vgl. Abbildung 8-33, S. 94).

Dihydroactinolid (Abbildung 8-33), das in der Vorfraktion des Dichlormethan-Extraktes vorkommt, stellt ein oxidatives Abbauprodukt von Carotin dar.^[104] Als Sedimentinhaltsstoff kommt Carotin im Plankton vor und wird durch Cyanobakterien im Verlauf von oxidativen Abbaureaktionen des Carotins metabolisiert^[105]. Dihydroactinolid gehört also der Klasse von leichtflüchtigen Sediment- bzw. Wasserinhaltsstoffen (VOC's)^a an und ist neben anderen terpenoiden Komponenten wie z.B. Geosmin, β -Ionon im Duftbouquet aquatischer Systeme anzutreffen.^[104] Der vorgeschlagene Abbaumechanismus wird in Abbildung 8-31 veranschaulicht.^[105]

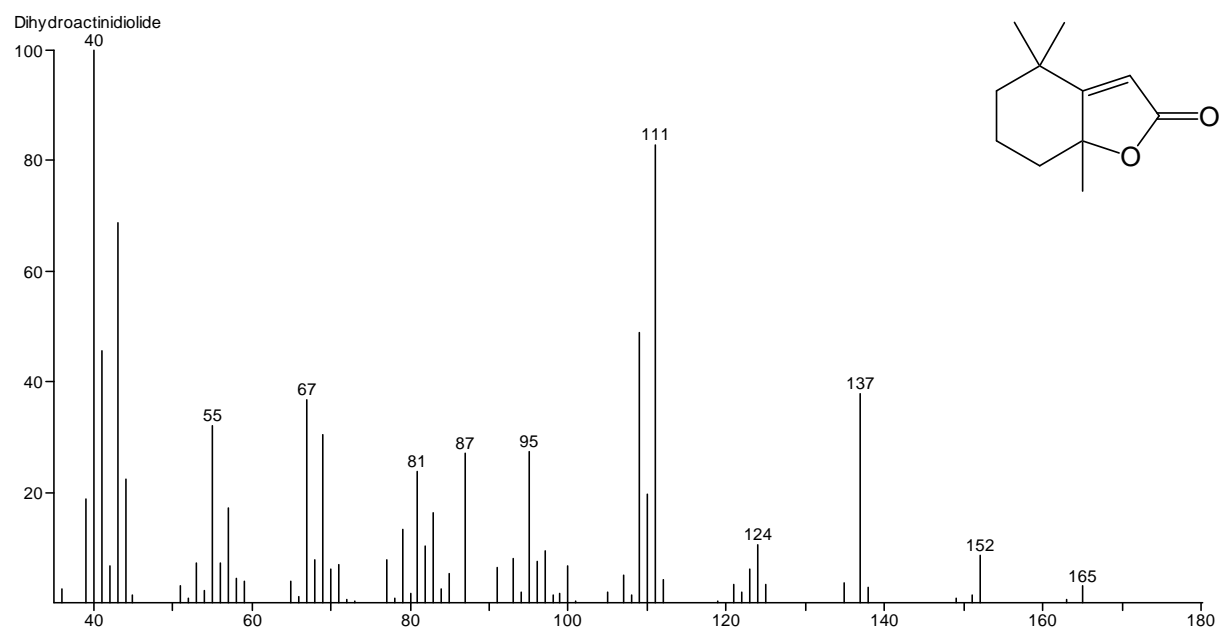


Abbildung 8-30 Massenspektrum von Dihydroactinidiolide aus der gelben Nachfraktion (vgl. Abbildung 8-8, S.67)

^a Volatile Organic Compounds

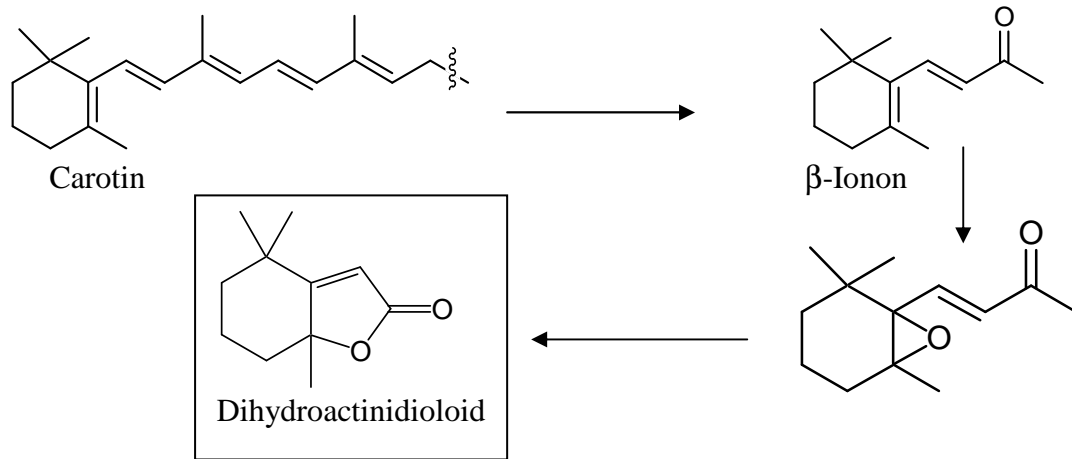


Abbildung 8-31 Vorgeschlagener Mechanismus der Diagenese von Carotin zur Bildung von Dihydroactinidiol^[105]

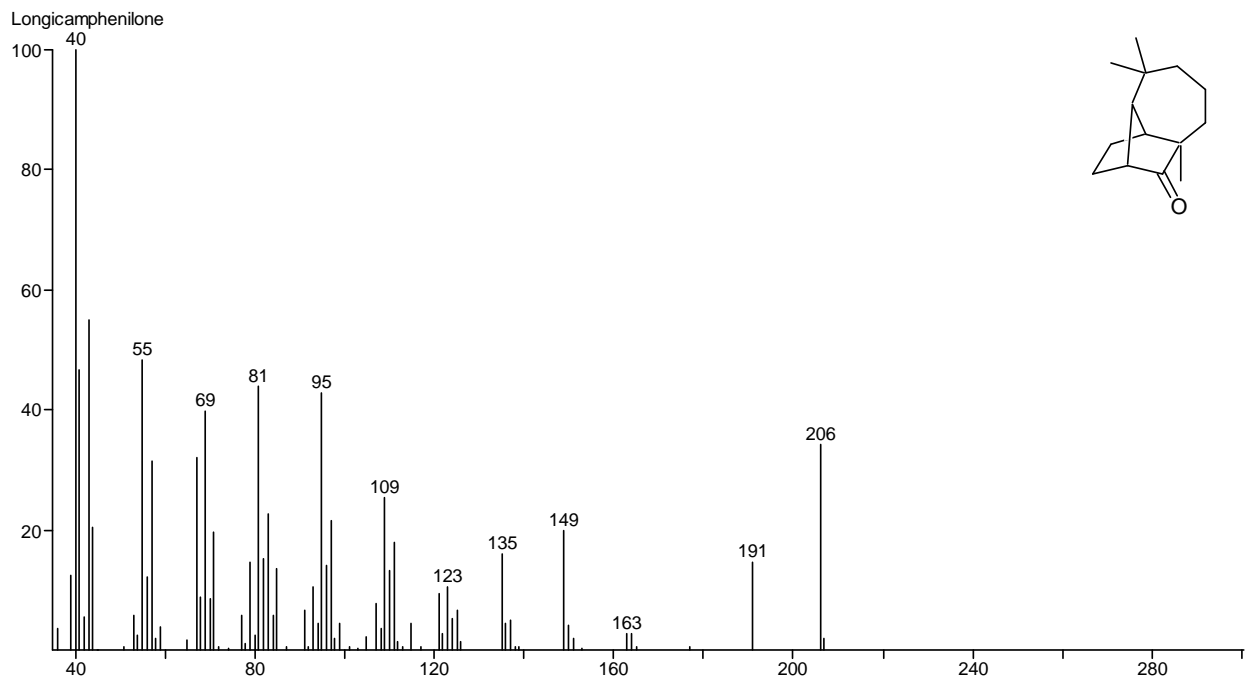


Abbildung 8-32 Massenspektrum des Longicamphenilons aus der Vorfraktion des Dichlormethan-Extrakts (vgl. Abbildung 8-8, S.67)

Oxoisophoron tritt z.B. in der gelben Nachfraktion des Dichlormethan-Extraktes (vgl. Abbildung 8-28, S. 91) auf. Ebenso wie z.B. das Tonalid oder Galaxolid gehört es zur Klasse der synthetischen Geruchstoffe. Diese werden häufig mit den häuslichen Abwässern in die Umwelt eingetragen, da sie in Reinigungsmitteln enthalten sind.

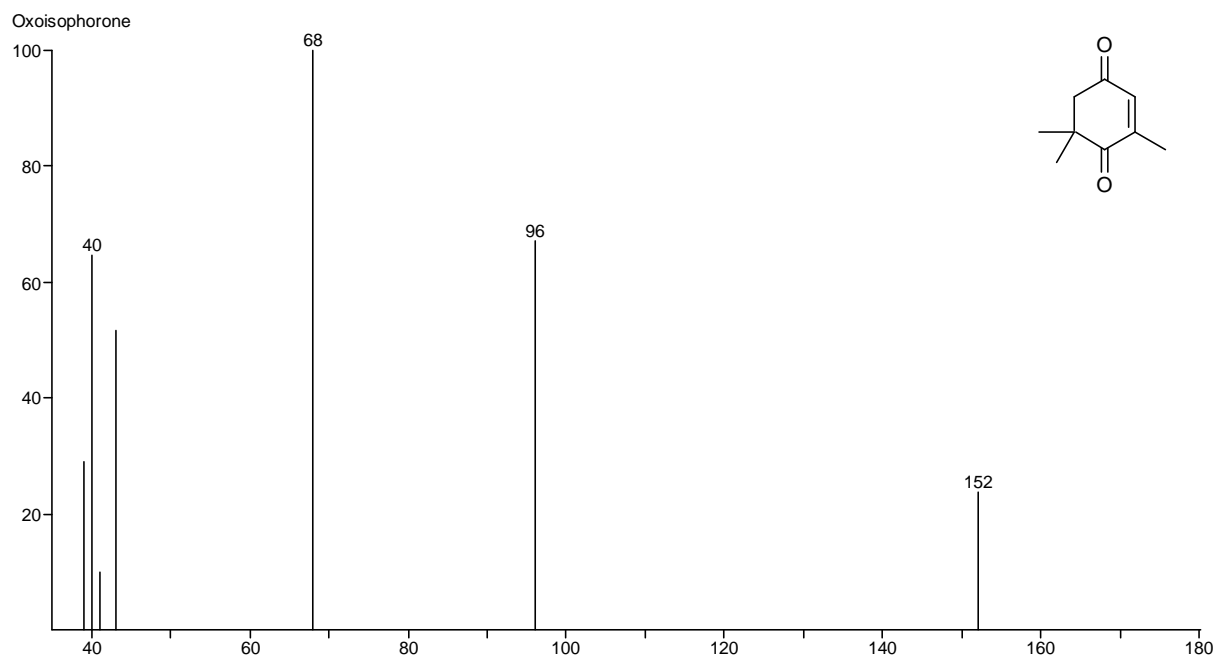


Abbildung 8-33 Massenspektrum des Oxoisophorons aus der gelben Nachfraktion des Dichlormethan-Extraktes (vgl. Abbildung 8-8, S. 67)

Auch aus dem Bereich der Naturstoffchemie sind mutagen wirksame Verbindungen bekannt. Beispiele hierfür sind u.a. die Aflatoxine oder die Stoffwechselprodukte Sterigmatocystin und Actinomycin. Zu den typischen Strukturmerkmalen, die eine Vorhersage der mutagenen Wirksamkeit erlauben, zählen z.B. α,β -ungesättigte Carbonylfunktionen. Diese können in einer Michael-Addition als Elektrophil mit einem nucleophilen Zentrum (z.B. Guanin-N⁷) reagieren.

Darüber hinaus wurde z.B. für ungesättigte Sesquiterpenlactone auch eine allergene Wirkung beschrieben. So konnte die allergene Wirkung (Kontaktdermatitis) von *Frullania tamarisci* auf darin enthaltene ungesättigte Sesquiterpenlactone zurückgeführt werden.^[106]

8.3.2. Identifizierung einzelner Komponenten im ethanolischen Sedimentextrakt

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Untersuchungen ethanolischer Sedimentextrakte dargestellt, die in der Tabelle 8-5 zusammengefasst sind.

Spezieller Teil

	#0 (VOR)	#0 (HAUPT)	#0 (NACH)	#1 (HAUPT)	#1 (NACH)	#6 (HAUPT)	#6 (NACH)	#9	#12
<i>Kohlenwasserstoffe</i>									
Nonan					x				
Decan									
Undecan									
Dodecan									
Tridecan									
Tetradecan									
Pentadecan	x	x	x	x					
Hexadecan		x							
Heptadecan	x		x						
Oktadecan	x		x						
Nonadecan	x		x	x					
Eicosan				x					
Heneicosan	x		x						
Docosan	x		x						
Tricosan									
Tetracosan	x		x						
Pentacosan	x		x						
<i>Verzweigte Kohlenwasserstoffe</i>									
Tricyclen									
Pristan	x		x						
Phytan			x						
1-Nonen									
1-Nonadecen	x								
Farnesan	x								
7,11-Dimethylheptadecan	x								
<i>Alkylbenzole</i>									
5-Phenylundecan									
3-Phenylundecan									
6-Phenyldodecan									
5-Phenyldodecan									
3-Phenyldodecan									

Spezieller Teil

	#0 (VOR)	#0 (HAUPT)	#0 (NACH)	#1 (HAUPT)	#1 (NACH)	#6 (HAUPT)	#6 (NACH)	#9	#12
<i>Carbonsäuren/-ester</i>									
Hexansäure									
Nonansäure									
Octansäure									
Decansäure	x								
Tetradecansäure	x		x						
Pentadecansäure	x		x						
Hexadecansäure	x		x						
Methyl 2-methyldodecanoat		x							
Methyl 2-methyltetradecanoat			x						
Tetradecylacetat	x								
Hexadecylacetat			x						
Methylpalmitat									
Methyloleat	x		x						
4-Methyl-2-buten-4-olid	x	x	x		x				
γ -Octanolid					x				
δ -Tridecanolid				x					
γ -Undecanolid									
Hexylacetat									
Benzoessäure	x		x						
4-Benzoylbuttersäure			x						
<i>Diverse</i>									
N,N-Diethylacetamid	x								
N-Methylimidazol	x								
2,2-Dimethyl-7-isobutyl-2H,5H-pyrano[4.3b]pyran-5-on			x						

Tabelle 8-5: chemische Zusammensetzung der ethanolischen Sedimentextrakt

Probe #0, Ethanolischer Extrakt, Vorfraction

Das TIC der Vorfraction zeigt neben einer Reihe der homologen Alkane hauptsächlich Fettsäuren sowie einige Komponenten, die ebenfalls schon im Dichlormethan-Extrakt auftraten, wie z.B. das Benzothiazol oder das 2-Phenyltridecan. Insgesamt ist der Anteil der langkettigen Alkylbenzole eher gering, so dass das Auftreten vereinzelter Alkylbenzole im ethanolischen Extrakt wohl als "Artefakt" zu deuten ist. Die Dichlormethanreste der vorherigen Extraktion wirkten somit als Lösungsvermittler. Mit der Folge, dass Reste von Alkylbenzolen aus dem Rückstand mit in den ethanolischen Extrakt gelangt sind.

Probe #0, EtOH, VOR, gesamtes TIC

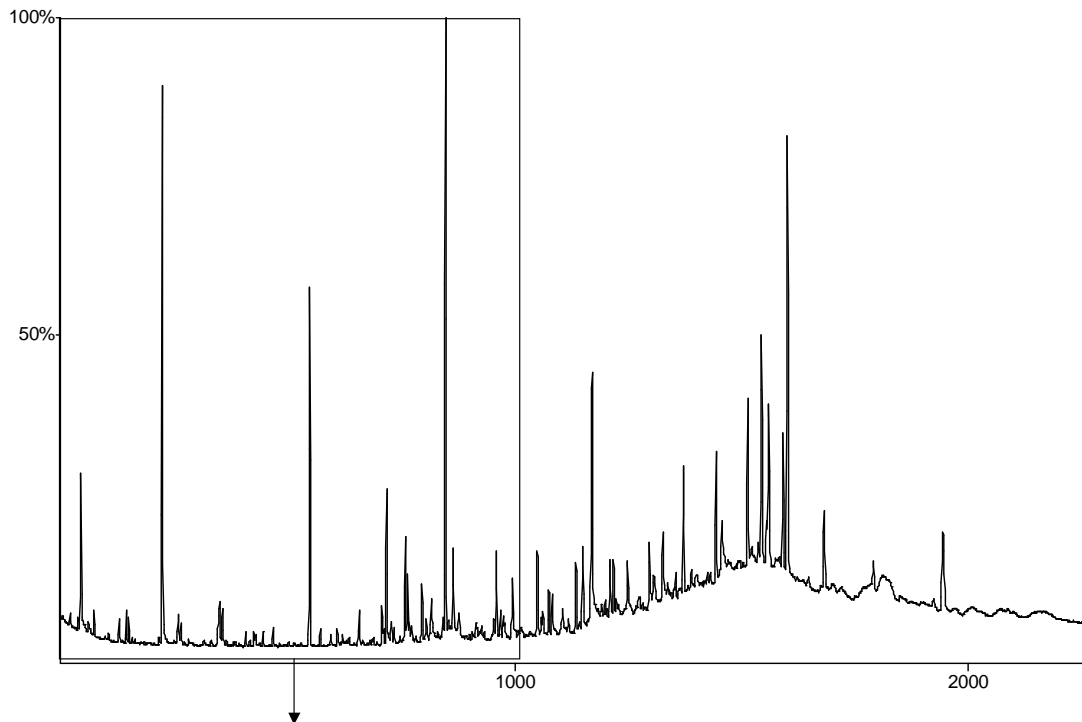
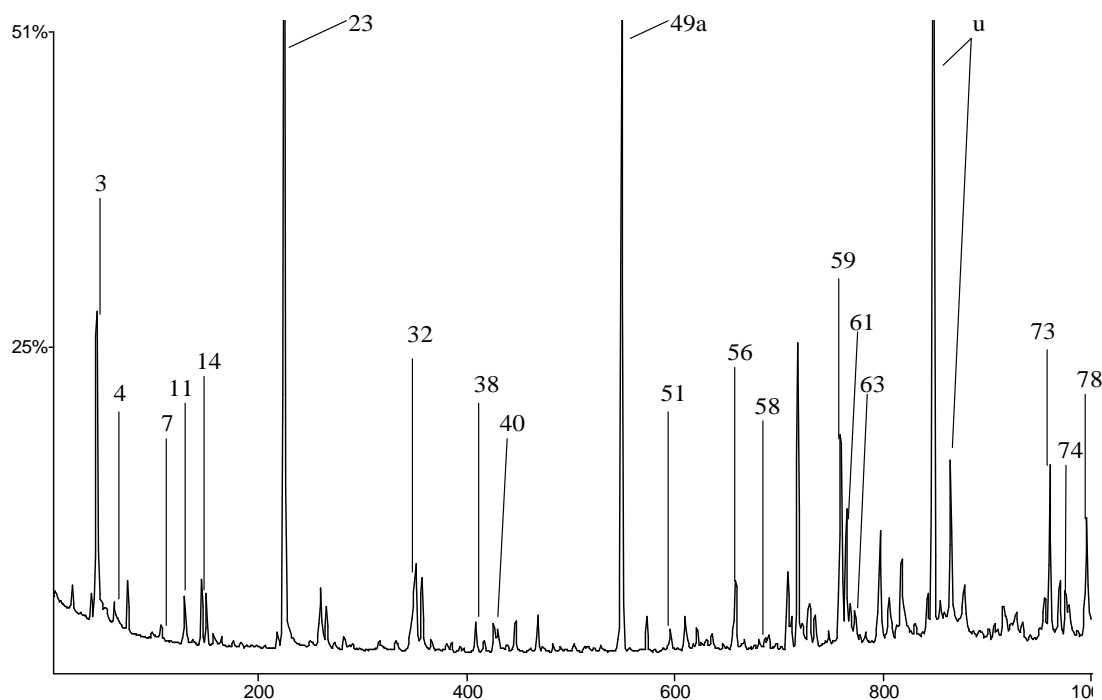


Abbildung 8-34 TIC der Vorfraction zur des ethanolischen Extraktes der Probe #0

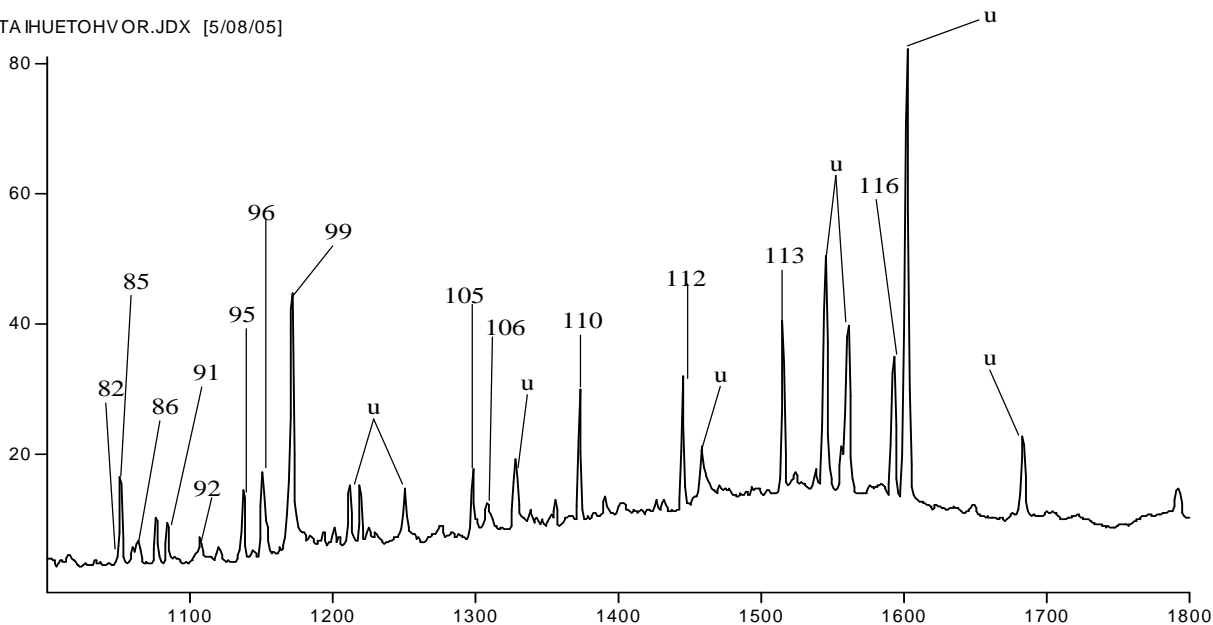
TIC Scan bis 1000



3: 4-Methyl-2-buten-4-olid; 4: N-Methylimidazol; 7: Benzaldehyd; 11: Phenol; 14: N,N-Diethylacetamid; 23: Acetophenon; 32: Benzoesäure; 38: Decanal; 40: Benzothiazol; 49a: Bicyclohexan (MS); 51: Decansäure; 56: Farnesan; 58: Nerylaceton; 59: 2,6-Di-tert.-butyl-methylphenol; 61: Pentadecan; 63: 2-Tridecanol; 73: Heptadecan; 74: Pristan; 78: Tetradecansäure; u: unbekannt

TIC Scan 1000-1800

TAIHUETOHVOR.JDX [5/08/05]



74: Pristan; 78: Tetradecansäure; 82: Tetradecylacetat; 85: Octadecan; 86: 7,11-Dimethylheptadecan; 91: Pentadecansäure; 92: 2-Phenyltridecan; 95: 1-Nonadecen; 96: Nonadecan; 99: Hexadecansäure; 105: Heneicosan; 106: Methyloleat; 110: Docosan; 112: Tricosan; 113: Tetracosan; 116: Pentacosan; u: unbekannt

Abbildung 8-34 (Forts.) TIC der Vorfraktion zur des ethanolischen Extrakts der Probe #0

Probe #0, ethanolischer Extrakt, Hauptfraktion

In der Hauptfraktion ließen sich nur wenige Inhaltsstoffe eindeutig charakterisieren, wie einige Kohlenwasserstoffe, Fettsäureester sowie Alkohole (Abbildung 8-35).

Probe #0, EtOH, Hauptfraktion, gesamtes TIC

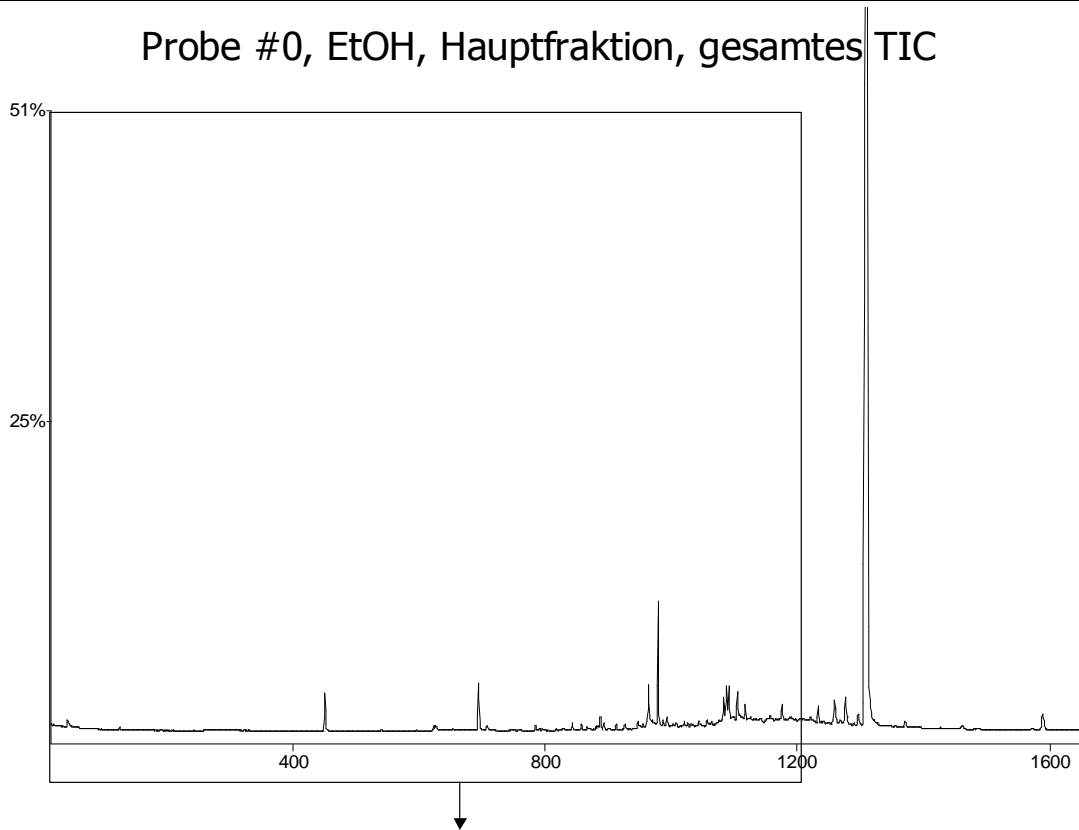
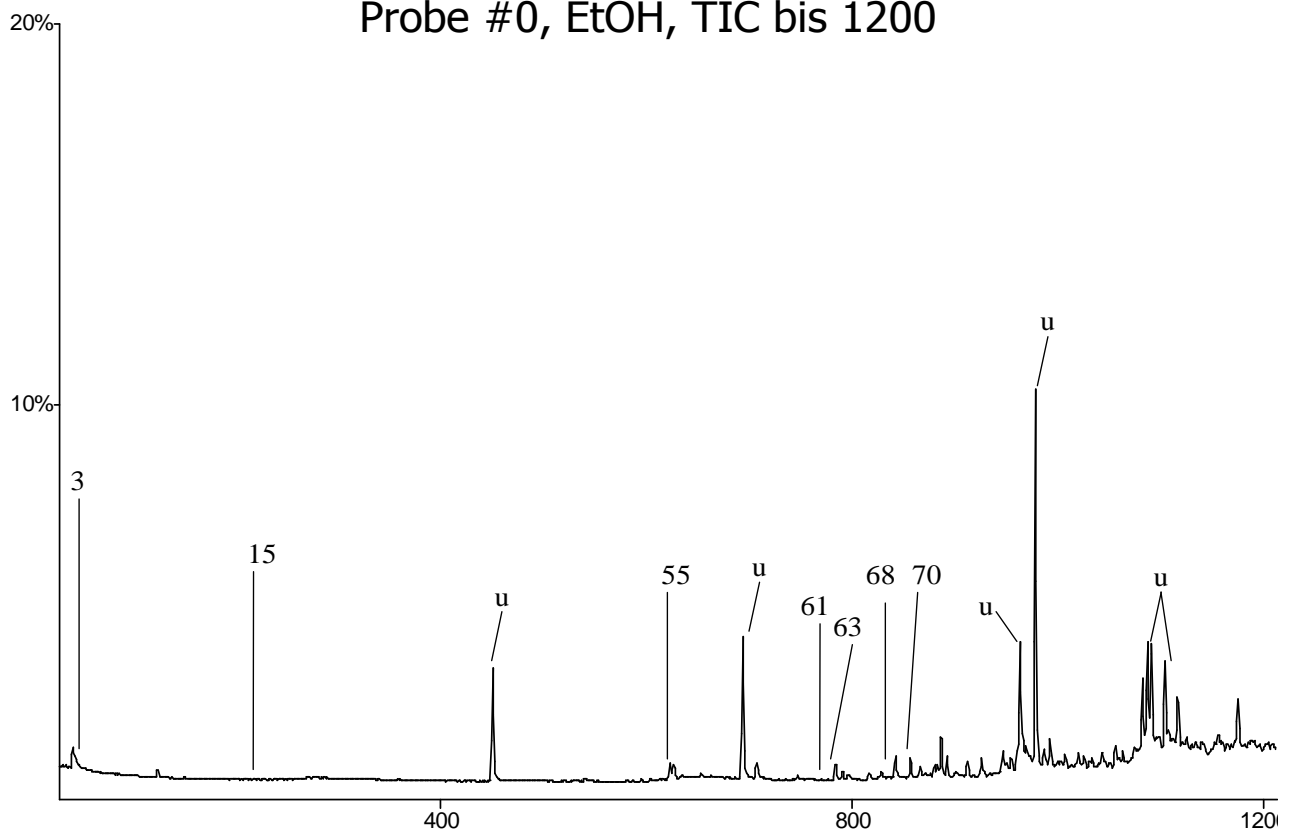


Abbildung 8-35 TIC der Hauptfraktion des ethanologischen Extraktes der Probe #0

Probe #0, EtOH, TIC bis 1200



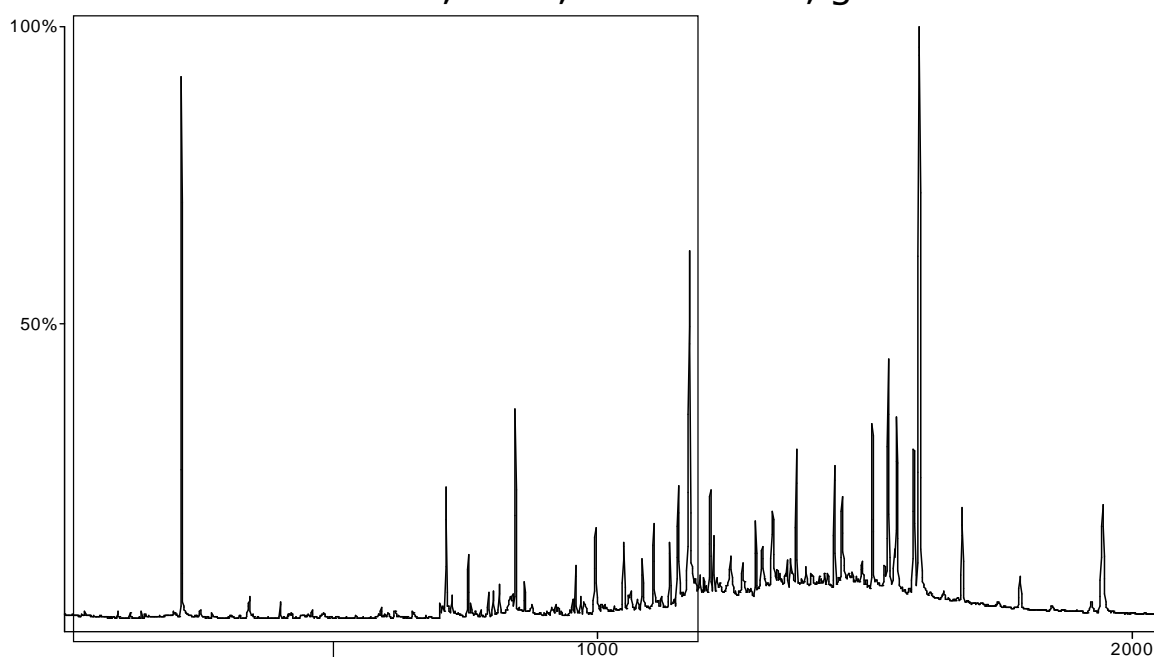
3: 4-Methyl-2-buten-4-olid; 15: 2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol; 55: 2,6-Di-tert.-Butylhydroxyanisol (BHT); 61: Pentadecan; 63: 2-Tridecanol; 68: Methyl 2-methyldodecanoat; 70: Hexadecan; u: unbekannt

Abbildung 8-35 (Forts.) TIC der Hauptfraktion des ethanologischen Extraktes der Probe #0

Probe #0, ethanolischer Extrakt, Nachfraktion

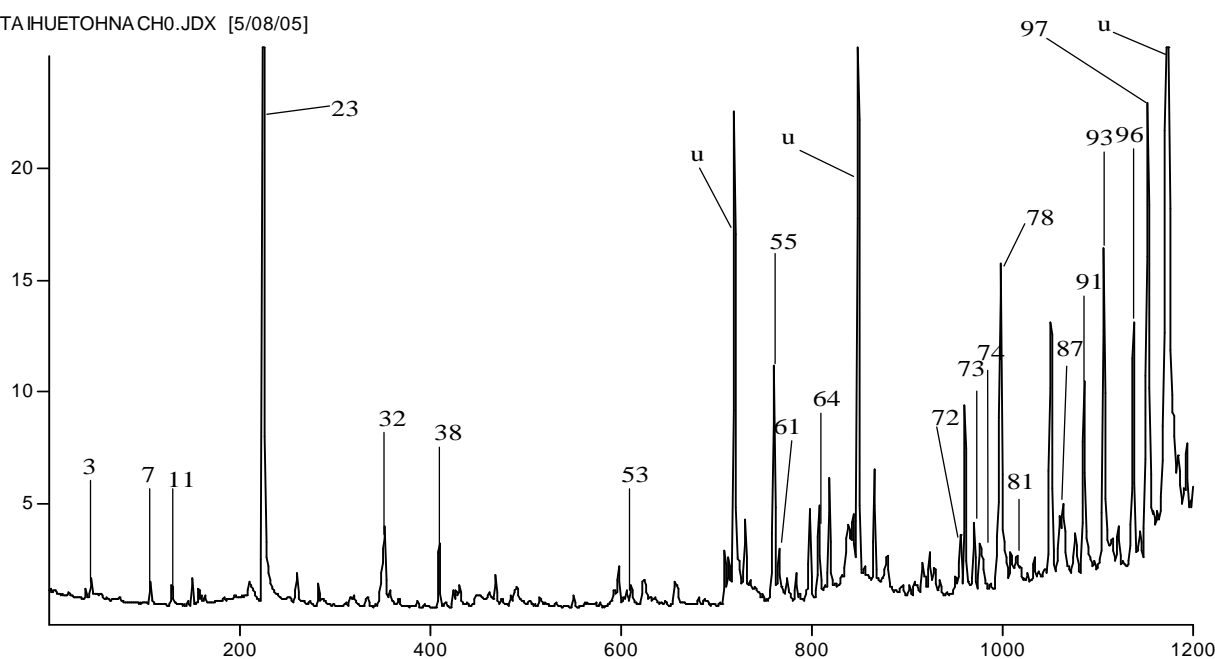
Wie in der Vorfraktion, so konnten auch in dieser Fraktion neben Fettsäuren und deren Estern hauptsächlich Kohlenwasserstoffe identifiziert werden, so dass der Anteil an gefundenen umweltrelevanten Komponenten eher gering ist. Anhand der GC/MS-Analysen ließen sich keine bisher bekannten toxikologisch relevanten Inhaltsstoffe angeben, so dass sich die Deutung der Mutagenität im Ara-Test als auch der positiven Induktionsraten im EROD-Test schwierig gestaltete.

Probe #0, EtOH, Nachfraktion, gesamtes TIC



TIC Scan bis 1200

TAIHUETOHNA.CH0.JDX [5/08/05]

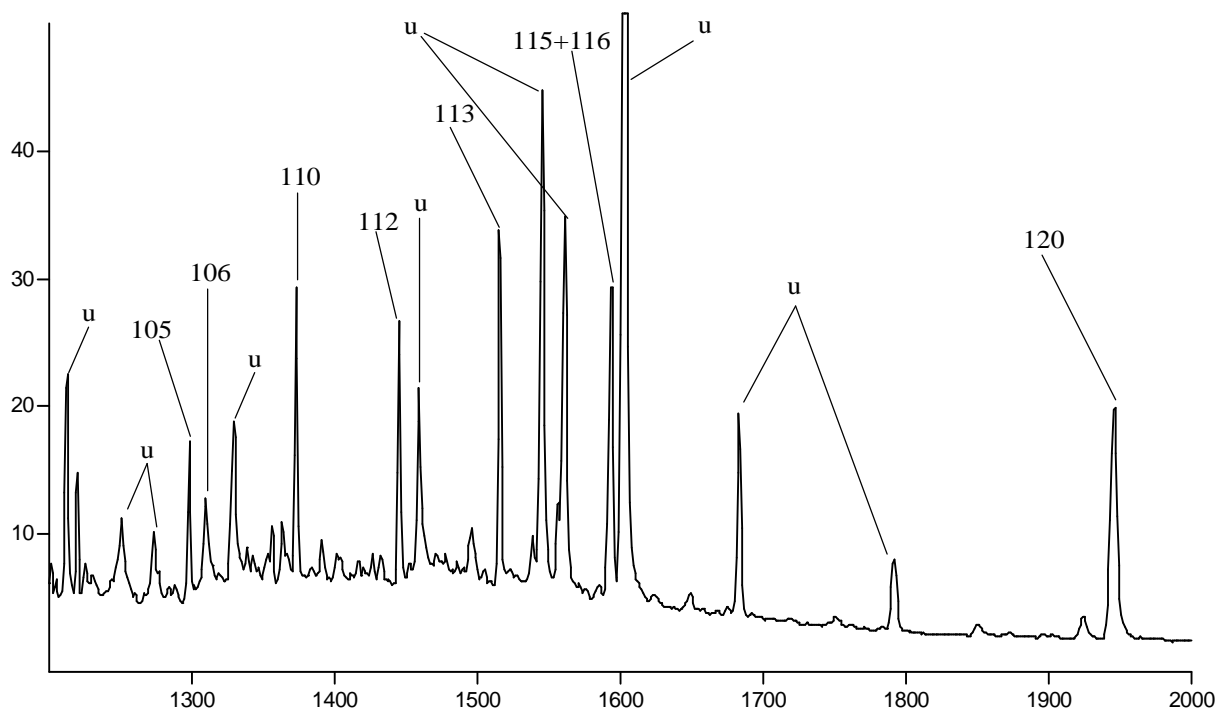


3: 4-Methyl-2-buten-4-olid; 7: Benzaldehyd; 11: Phenol; 23: Acetophenon; 32: Benzoesäure; 38: Decanal; 53: Vanillin; 55: 2,6-Di-tert.-butyl-4-methylphenol (BHT); 61: Pentadecan; 64: Dodecansäure; 72: 4-Benzoylbuttersäure; 73: Heptadecan; 74: Pristan; 78: Tetradecansäure; 81: Methyl 2-methyltetradecanoat; 87: Phytan; 91: Pentadecansäure; 93: Hexadecylacetat; 96: Nonadecan; 97: 2-Phenyltridecan; u: unbekannt

Abbildung 8-36 TIC der Nachfraktion der Probe #0

TIC Scan 1200-2000

TAIHUETOHNACHO.JDX [5/08/05]



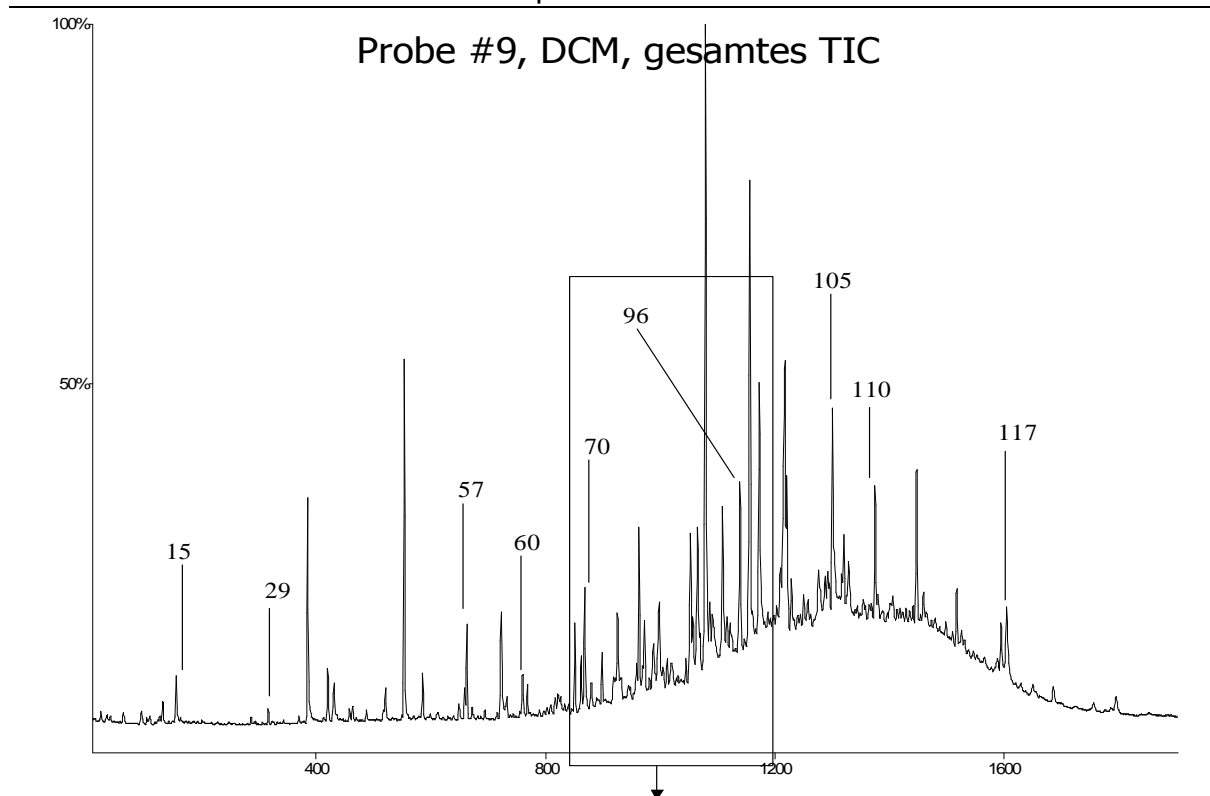
105: Heneicosan; 106: Methyloleat; 110: Docosan; 112: Tricosan; 113: Tetracosan; 115: Diheptylphthalat; 116: Pentacosan; 120: Squalan; u: unbekannt

Abbildung 8-36 (Forts.) TIC der Nachfraktion der Probe #0

Probe #9 - "unbelastete" Region

Hier soll der Extrakt der Probe #9, die aus einer relativ unbelasteten Region des Taihus entstammt, präsentiert und die Resultate mit den bislang vorgestellten Ergebnissen verglichen werden. Die Untersuchungen zur Mutagenität der Probe #9 zeigten sowohl für den ethanolischen als auch den Dichlormethan-Extrakt im Ara-Test keine relevanten Effekte (Abbildung 8-3, S. 54 bzw. Abbildung 8-5, S. 57). Gegenüber dem Dichlormethan-Extrakt der Probe #0 wurde in der Probe #9 neben Kohlenwasserstoffen hauptsächlich noch einige langkettige Alkylbenzole nachgewiesen. Insgesamt enthielt der Extrakt jedoch weniger umweltrelevante Substanzen als dies für Probe #0 der Fall war. Der ethanolische Extrakt der Probe #9 enthielt ausschließlich Kohlenwasserstoffe, einige Fettsäuren sowie zwei nicht näher identifizierte Komponenten.

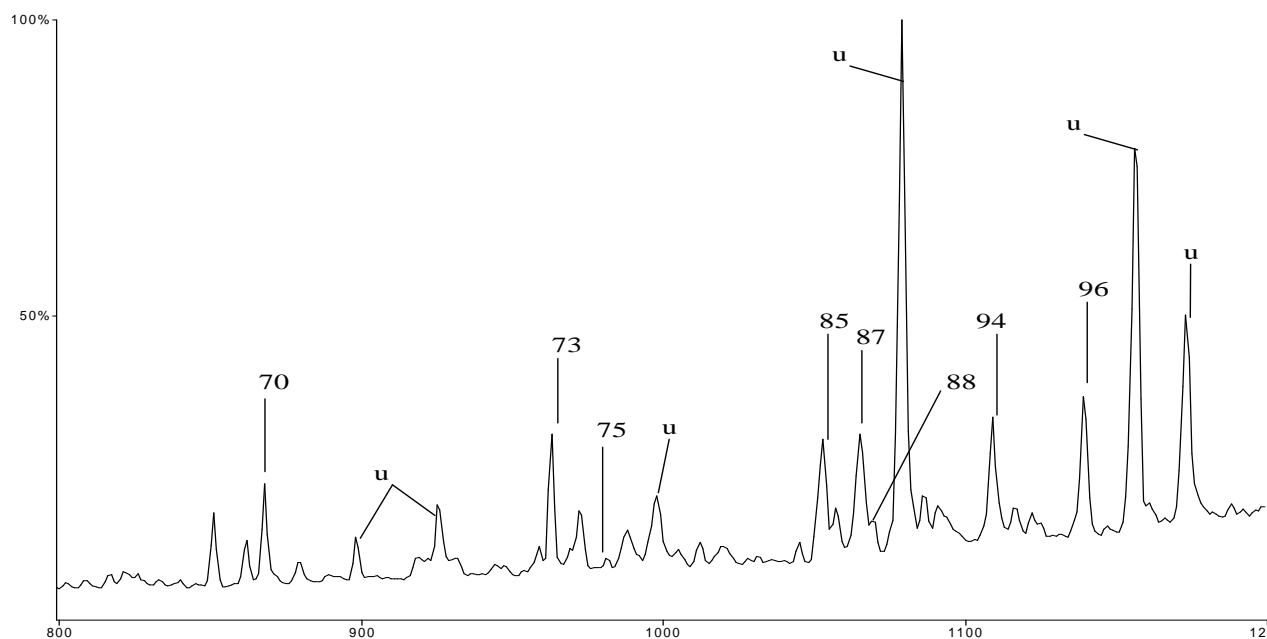
Wie sich aus dem Chromatogramm des Dichlormethan-Extraktes (Abbildung 8-37) entnehmen lässt, konnten neben einigen langkettigen Alkanen, die ubiquitär in Sedimenten auftreten^[90,91] nur die beiden langkettigen Alkylbenzole 6- bzw. 3-Phenyltridecan sowie einige Fettsäureester identifiziert werden. Insgesamt also weisen diese Extrakte gegenüber der Probe #0 vergleichsweise wenige Komponenten auf und können damit als relativ unbelastet bewertet werden. Der ethanolische Extrakt (Abbildung 8-38) unterscheidet sich vom Dichlormethan-Extrakt hauptsächlich darin, dass in diesem eine Vielzahl an langkettigen Fettsäureethylestern mit den Fragmentionen der Massen m/z 81 und 101 gefunden wurde.



15: 2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol; 29: Oxoisophoron; 57: Tetradecan; 60: Dihydroactinolid; 70: Hexadecan; 96: Nonadecan; 105: Heneicosan; 110: Docosan; 117: Diethylhexylphthalat (DEHP)

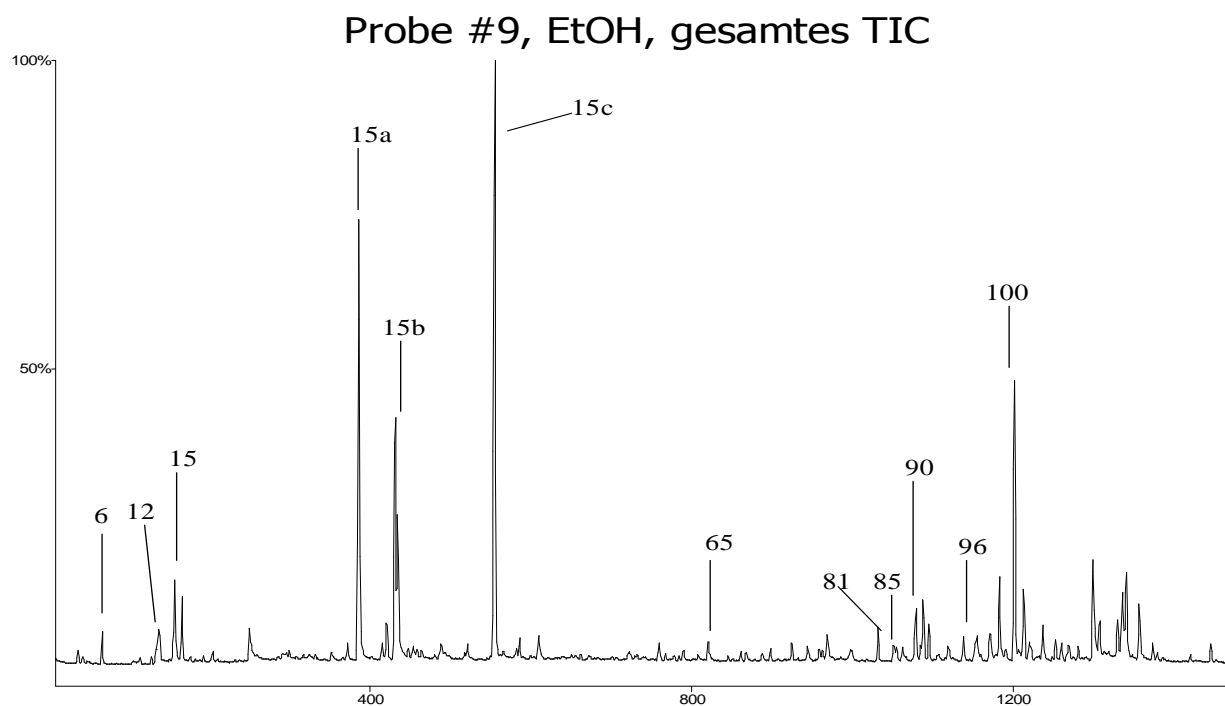
Abbildung 8-37 Totalionenstrom-Chromatogramm (TIC) des Dichlormethan-Extraktes der Probe #9 (weniger stark eutrophierte Region des Taihu)

Scanbereich 800-1200, gedehnt



70: Hexadecan; 73: Heptadecan; 75: 6-Phenyl-dodecan; 85: Oktadecan; 87: Phytan; 88: 6-Phenyl-tridecan; 94: 3-Phenyl-tridecan; 96: Nonadecan; u: unbekannt

Abbildung 8-37 (Forts.) Totalionenstrom-Chromatogramm (TIC) des Dichlormethan-Extraktes der Probe #9 (weniger stark eutrophierte Region des Taihu)



6: Nonan; 12: Hexansäure; 15: 2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol; 15a: 1-(2-Butoxyethoxy)ethanol; 15b: 1,2,3-propantrioldiactetat (MS); 15c: 1,2,3-Propantriolmonoactat (MS); 65: Diethylphthalat; 81: Methyl 2-Methyltetradecanoat; 85: Octadecan; 90: 6,10,14-Trimethylpentadecan-2-on; 96: Nonadecan; 100: Ethylpalmitat;

Abbildung 8-38 Totalionenstrom-Chromatogramm (TIC) der Probe #9 (EtOH), aus einer weniger stark eutrophierten Region des Sees

8.4. Untersuchung toxikologischer Eigenschaften einzelner Komponenten

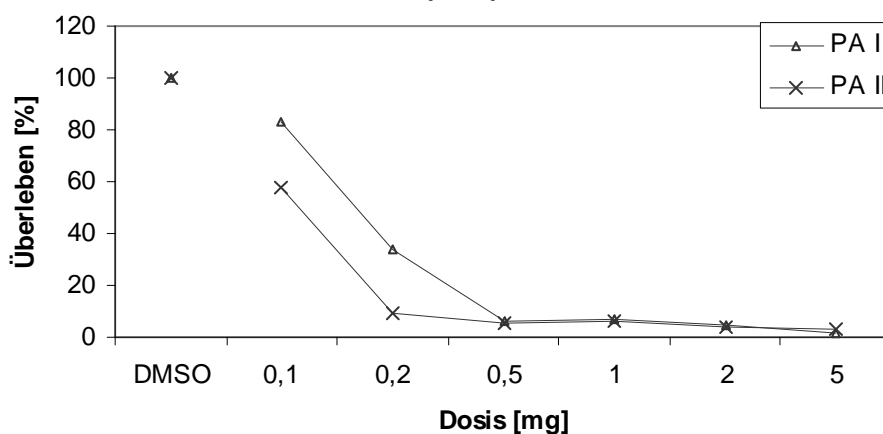
Lineare Alkylbenzole

Die toxikologischen Eigenschaften der linearen Alkylbenzole sind bislang unbekannt. Es wurden aus diesem Grund zwei technische Gemische auf deren mutagene Wirkung im Bakterienmutagenesetest untersucht.

Diese stellten Destillationsfraktionen mit unterschiedlichen Siedepunkten dar. Diejenige Fraktion mit dem niedrigeren Siedepunkt wird im Folgenden als Alkylbenzolgemisch I (PA I) bzw. jene mit dem höheren Siedepunkt als Alkylbenzolgemisch II (PA II) bezeichnet. Die Unterschiede der technischen Alkylbenzolgemische bestehen lediglich in der Länge der Alkylketten, d.h. im höher siedenden Gemisch PA II kommen hauptsächlich Alkylbenzole mit Kettenlängen von mehr als C₁₅ vor.

Die Untersuchungen zur Zytotoxizität und Mutagenität in Bakterien der langkettigen Alkylbenzolgemische erfolgte unter metabolischer Aktivierung mit den Ames-Stämmen TA 98 bzw. TA 100. Eine vergleichende Übersicht der D/W-Kurven zur Zytotoxizität ist in der Abbildung 8-39 dargestellt.

D/W-Kurven z. Zytotoxizität des PA I + II in TA 98 (+S9)



D/W Kurven zur Zytotoxizität von PA I + II in TA 100 (+S9)

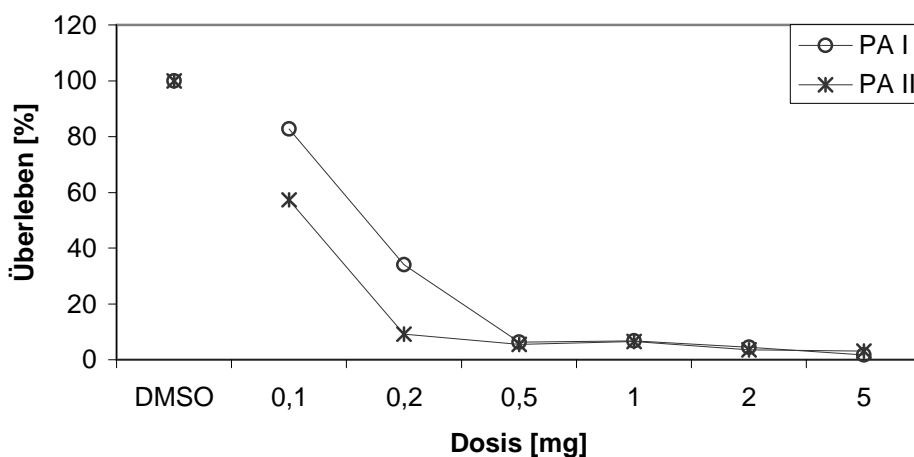


Abbildung 8-39 D/W-Kurve zur Toxizität in *S. typhimurium* TA 98 (oben) bzw. TA 100 (unten) der technischen Gemische mit metabolischer Aktivierung

Auffällig ist zunächst der ähnliche Verlauf der D/W-Kurven für die Experimente zur Bakterientoxizität der Gemische PA I bzw. PA II in TA 98 bzw. TA 100. Weiterhin kann den D/W-Kurven entnommen werden, dass das Gemisch PA I bei niedrigeren Dosen eine stärkere toxische Wirkung entfaltet als das Gemisch PA II. Wie sich aus dem Vergleich der D/W-Kurven ergibt, zeigt eine Dosis von mehr als 0,2 mg eine deutlich zytotoxische Wirkung, so dass diese Dosis als oberste Grenze für die Mutagenese-Experimente gewählt wurde. Die folgenden D/W-Kurven (Abbildung 8-40) geben die Induktionen im Mutagenesetest für die Stämme TA 98 und 100 wieder.

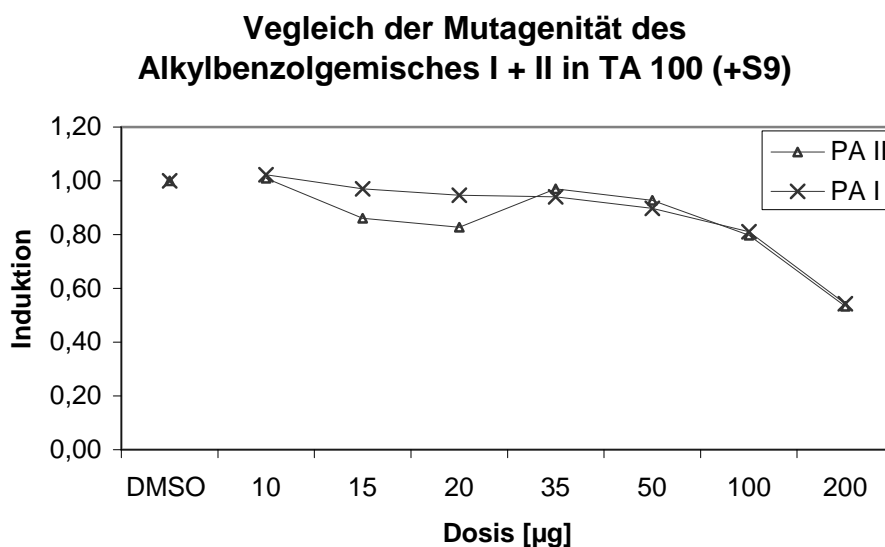
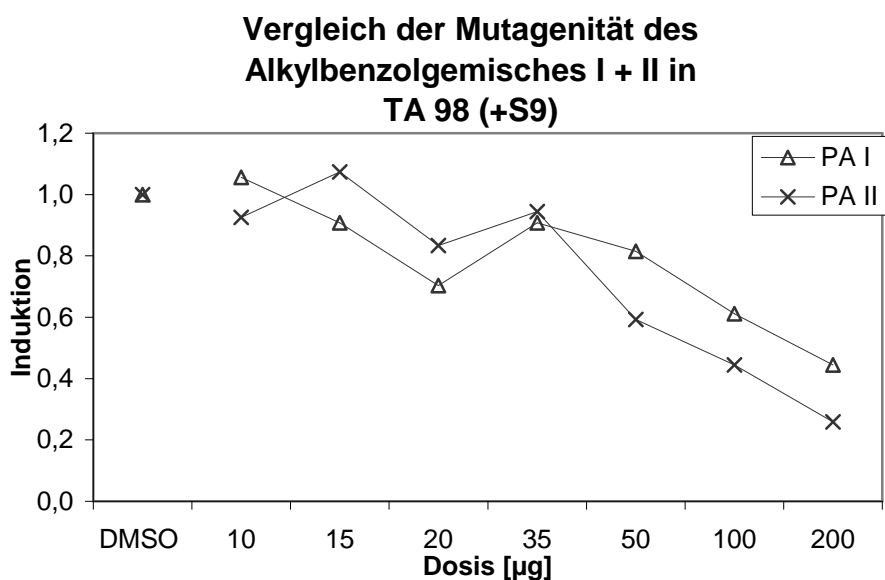


Abbildung 8-40 D/W-Kurve zur Mutagenität in *S. typhimurium* TA 98 (oben) bzw. TA 100 (unten) der technischen Gemische PA I und PA II mit metabolischer Aktivierung

Aus dem Vergleich der D/W-Kurven der technischen Gemische ist deutlich erkennbar, dass im untersuchten Dosisbereich kein mutagener Effekt vorlag und ausschließlich eine dosisabhängige Toxizität gefunden wurde. Wie aus der Literatur^[61] bekannt, ist für die kurzkettigen, „analogen“ BTEX-Aromaten ebenfalls keine Mutagenität beschrieben. Man kann diese Ergebnisse insofern miteinander in Beziehung setzen, indem man das Ausbleiben eines mutagenen Effektes ausschließlich dem Alkylsubstituenten am Aromaten zuschreibt.

Reten

Eindeutige Hinweise auf eine mutagene Wirkung von Reten nach metabolischer Aktivierung in den Ames- Stämmen TA 98/100 wurden bislang nicht beschrieben^[107], was jedoch in Zusammenhang mit den in der zitierten Arbeit verwendeten hohen Dosen stehen könnte. Es wurden 100 µg Reten als maximale Dosis für die Untersuchungen, die mit den Stämmen TA 98, TA 100 sowie TA 1537 erfolgte, eingesetzt.

Wie sich aus den D/W-Kurven (Abbildung 8-41) eindeutig ergibt, zeigte Reten im untersuchten Dosis-Bereich keine mutagene Wirkung. Stattdessen konnte eine dosisabhängige Toxizität beobachtet werden, die im Stamm TA 100 am stärksten ausgeprägt ist.

Vergleicht man die strukturellen Analogien des Retens mit denen der Alkyl-PAKs bzw. fasst ersteres als ein Alkyl-PAK auf, kann man diese Ergebnisse mit der strukturellen Abhängigkeit der mutagenen Wirkung der PAKs in Einklang bringen (sogen. Struktur-Wirkungsbeziehung; "Bay-Region"). So zeigen nicht alle alkylierten PAKs Mutagenität; andererseits gilt z.B. 7,8-Dimethylbenzanthren als das potenteste PAK. Das Ergebnis ist somit mit den in der Arbeit^[107] beschriebenen Resultaten konform.

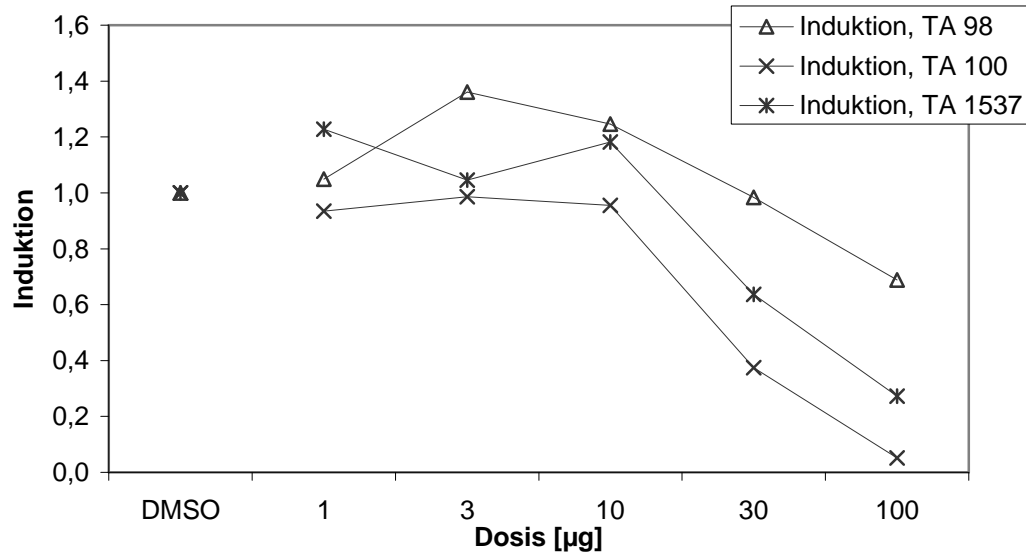


Abbildung 8-41 Mutagenitätstest mit Reten in unterschiedlichen Ames-Stämmen

9. Ergebnisse der Untersuchungen von Muldeproben

9.1. Brunnenwasserproben (BVV) – Erscheinung

Die Grundwasserproben zeigten schon rein äußerlich einen hohen Verschmutzungsgrad, der durch z.T. dunkle Färbung des trüben Wassers und strengen Chlorphenol-Geruchs auffiel. Eine Übersicht über die Beschaffenheit und Bezeichnung der Proben gibt Tabelle 9-1 wieder.

Probe	Höhe ü. NN [m] ^a	Aussehen	Geruch
BVV 473	73,75	farblos	kaum
BVV 511	77,20	dunkelbraun	wenig
BVV 512	77,17	schwach bräunlich	schwach
BVV 513	76,76	farblos bis leicht gelblich	sehr stark „chlorphenolartig“
BVV 514	77,04	dunkelbraun	stark
BVV 515	77,27	farblos	kaum

Tabelle 9-1 Erscheinung der Grundwasserproben^b

9.1.1. Toxizität in Bakterien

Die Wasserproben wurden mit Bakterien- und Säugerzellen auf Toxizität untersucht. Letztere bieten zudem Aufschluss über die Wirkung auf Zellsysteme höherer Organismen und ermöglichen eine bessere Vergleichbarkeit mit menschlichen Gewebezellen und somit eine bessere Abschätzung der potenziellen Gefährdung für den Menschen.

Die Verwendung der Wasserproben als Inkubationsmedium zur Anzucht der Bakterienkolonien, die dann auf Agarplatten ausplattiert werden, bietet gegenüber der herkömmlichen Methode^c den Vorteil, dass diese deutlich empfindlicher gegenüber toxisch wirkenden Inhaltsstoffen ist.

Es ließ sich mit dieser Testmethode eine eindeutige Toxizität der Grundwasserproben BVV 511 und BVV 513 gegenüber der Negativkontrolle (reines Wasser) aufzeigen. Bei den Proben BVV 473, 512 und 515 beobachtet man hingegen eine Wachstumserhöhung, wohingegen die Probe BVV 514 keine Veränderung des Bakterienwachstums gegenüber der Kontrolle ergab.

^a vgl. S.Franke, N.Heinzel, W.Francke: Abschlußbericht zum Flutfolgenprojekt^[5]

^b vgl. S.Franke, N.Heinzel, W.Francke: Abschlußbericht zum Flutfolgenprojekt^[5]

^cNach der herkömmlichen Methode werden die Bakterien im Nährmedium kultiviert und dann mit der zu untersuchenden Probe in Kontakt gebracht

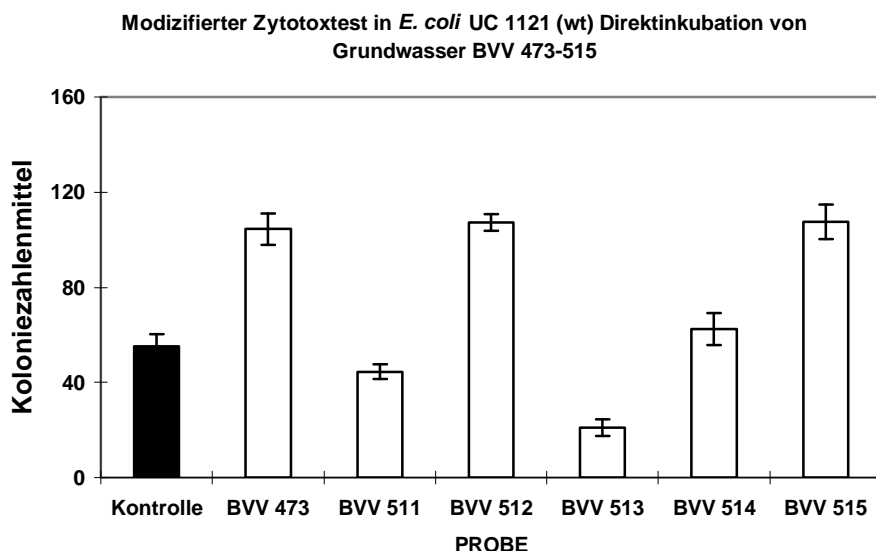


Abbildung 9-1 Grundwassertoxizität in Bakterienzellen

9.1.2. Zytotoxizität in Hepatozyten (UDA-Test)

Von besonderem Interesse waren die im Bakterientest akut toxischen Grundwasserproben (Abbildung 9-1). Diese sollten in Säugerzellen ein ähnliches Verhalten zeigen, insbesondere sollten die Zellen gegenüber toxisch wirkenden Substanzen empfindlicher reagieren.

Zytotoxizität in H4 II e Zellen der Grundwasserproben BVV 473-515

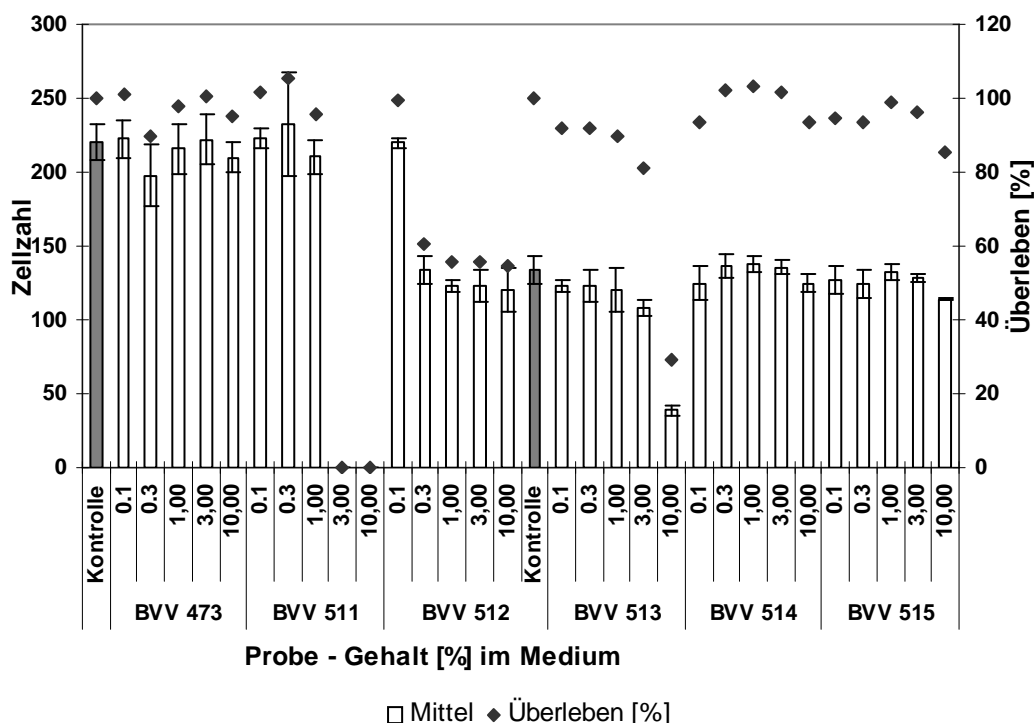


Abbildung 9-2 Zytotoxizität des Grundwassers in H4II-E Zellen

In den D/W-Kurven (Abbildung 9-2) ist die Zellzahl der überlebenden Zellen in Abhängigkeit von der Menge der jeweiligen Wasserprobe im Medium (Näheres zur Konzentration, vgl. Kapitel 15.7.4.), mit dem die Zellen direkt inkubiert wurden, dargestellt.

Die D/W-Kurven für die verschiedenen Wasserproben zeigen eine durchschnittliche Überlebensrate von 80-90%, was zunächst nicht auf gravierende Toxizität hindeutet. Die Proben BVV 511 und BVV 513 zeigen jedoch eine dosisabhängige Toxizität, die für die Probe BVV 511 ab einem Gehalt von 3% sogar zum vollständigen Absterben der Zellen führt. Auch für die Probe BVV 513 konnte eine Reduktion der Zellzahl gefunden werden, die jedoch nicht so stark ausgeprägt ist wie im Fall der Probe BVV 511. Dieses Ergebnis korreliert mit dem für die Bakterientoxizität schon beschriebenen Toxizitäten der Grundwasserproben BVV 511 und BVV 513.

Im Gegensatz zum Bakterientest zeigt dieses Testsystem jedoch eine wesentlich höhere Empfindlichkeit, insbesondere für die Probe 511, die schon mit einem Gehalt von nur 3% im Medium zum vollständigen Absterben der Zellen führt. Es sei an dieser Stelle daran erinnert, dass im Bakterientoxizitätstest die Grundwasserproben als Wasserphase des Inkubationsmediums verwendet wurden, also zu 100% als Medium vorlagen.

9.1.3. EROD-Test

Die Ergebnisse des EROD-Tests sind in der folgenden D/W-Kurve (Abbildung 9-3) wiedergegeben. Untersucht wurden die Hexan/Dichlormethan-Extrakte der Wasserproben, die dem Medium in unterschiedlichen Anteilen zugesetzt wurden. Die horizontalen Linien (durchgezogen bzw. gestrichelt) geben die Enzymkonzentrationen CYP-450 1A1 der Negativkontrolle (BLANK) und der Positivkontrolle nach Induktion durch Methylcholanthren (in den Konzentrationen 2 $\mu\text{mol/L}$ und 4 $\mu\text{mol/L}$) wieder. Die D/W-Kurve zeigt, dass die Induktionswerte des CYP-450 1A1 für die Extrakte der Proben BVV 511, BVV 513 und BVV 515 im Bereich der Negativkontrolle liegen. Dies kann als Hinweis dafür gedeutet werden kann, dass sich im untersuchten Dosisbereich keine dem Methylcholanthren vergleichbare induzierende Wirkung nachweisen lässt und demnach keine strukturell ähnlichen Substanzen enthalten sind. Hingegen zeigen die Extrakte der Proben BVV 473, BVV 512 und BVV 514 ab einer Verdünnung von 1:100 schwache Effekte.

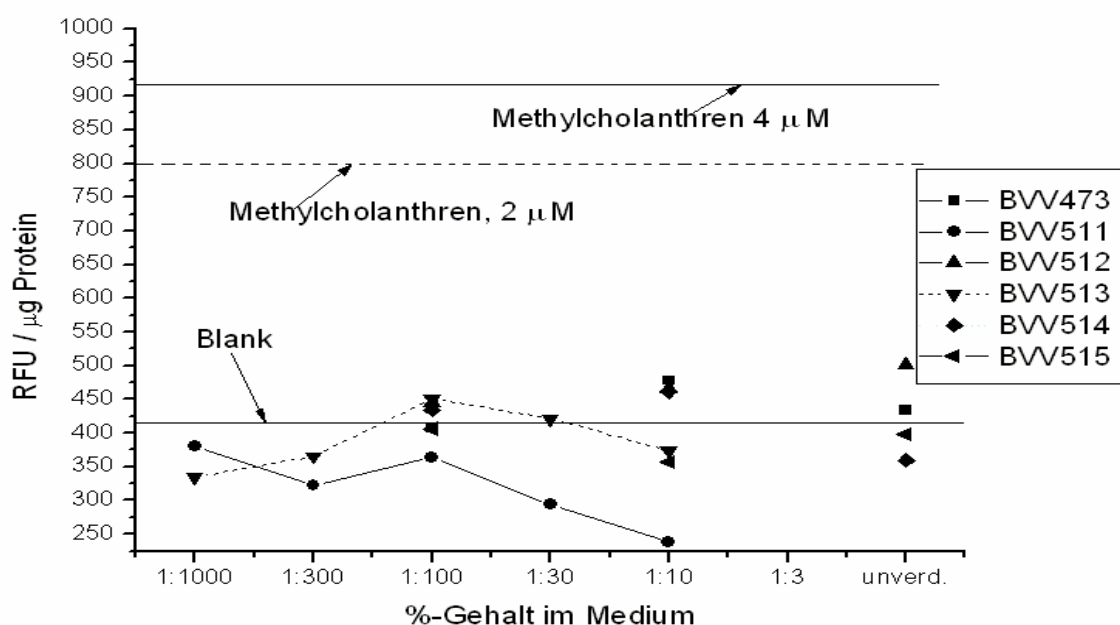


Abbildung 9-3 EROD-Test der Brunnenwasserproben BVV

9.1.4. Östrogene Aktivität der Brunnenwasserproben (BVV)

Um einen ersten Hinweis auf östrogene Wirkungen zu erhalten, wurden die Hexan/Dichlormethan-Extrakte der Wasserproben im Östradiol-Verdrängungsassay auf deren Affinität zu den Östrogenrezeptoren ER α und ER β untersucht. Es wurden hierzu jeweils 10 μ L der ethanolischen Lösung des Gesamtextraktes eingesetzt. In Abbildung 9-4 ist die Verdrängung von radioaktivem Östradiol durch die extrahierbaren Wasserinhaltsstoffe der unterschiedlichen Probenahmestellen von den Östrogenrezeptoren ER α bzw. ER β wiedergegeben sowie für Diethylstilbestrol (DES), das in diesem Testsystem als Positivkontrolle fungiert. Alle Messwerte wurden zuvor um den Wert für Diethylstilbestrol korrigiert. Aus der Darstellung lässt sich entnehmen, dass die Verdrängung durch die Wasserinhaltsstoffe bei allen Proben nur für den β -Rezeptor in der Größenordnung des DES liegen.

Insbesondere trifft dies für die Proben BVV 473, BVV 511 und BVV 513 zu, für die die Abweichung der Effekte zum DES gering sind. Ein etwas anderes Bild ergibt sich für den α -Rezeptor, bei dem die Effekte der einzelnen Proben unterschiedlich stark ausgeprägt sind.

Hier zeigen nur die Proben BVV 473 und BVV 512 eine Verdrängung, die in der Größenordnung des Diethylstilbestrols (DES) liegt. Vergleicht man die Abweichungen der Verdrängung aller Proben für ER α und ER β zum DES so fällt auf, dass die Proben im α -Rezeptor stärker um den Meßwert der Verdrängung für DES streuen. Zudem fällt auf, dass der Unterschied der Verdrängung in den Positivkontrollen beider Rezeptoren recht gering ist. Dieses läßt darauf schließen, dass die Verdrängungswerte der Proben BVV 514 und BVV 515 im α -Rezeptor eher als Ausreißer zu betrachten sind. Vergleicht man die Verdrängung für beide Rezeptoren, so erkennt man, dass der Effekt am β -Rezeptor im Mittel etwas stärker ausgeprägt ist. Diese Differenzierung fällt besonders für BVV 514 und BVV 515 auf. Für BVV 512 und BVV 513 wird hingegen der α -Rezeptor tendenziell stärker beeinflusst.

Kompetitiver Verdrängungsassay der Hexan-Extrakte der Wasserproben BVV 473-515 mit ER α und ER β

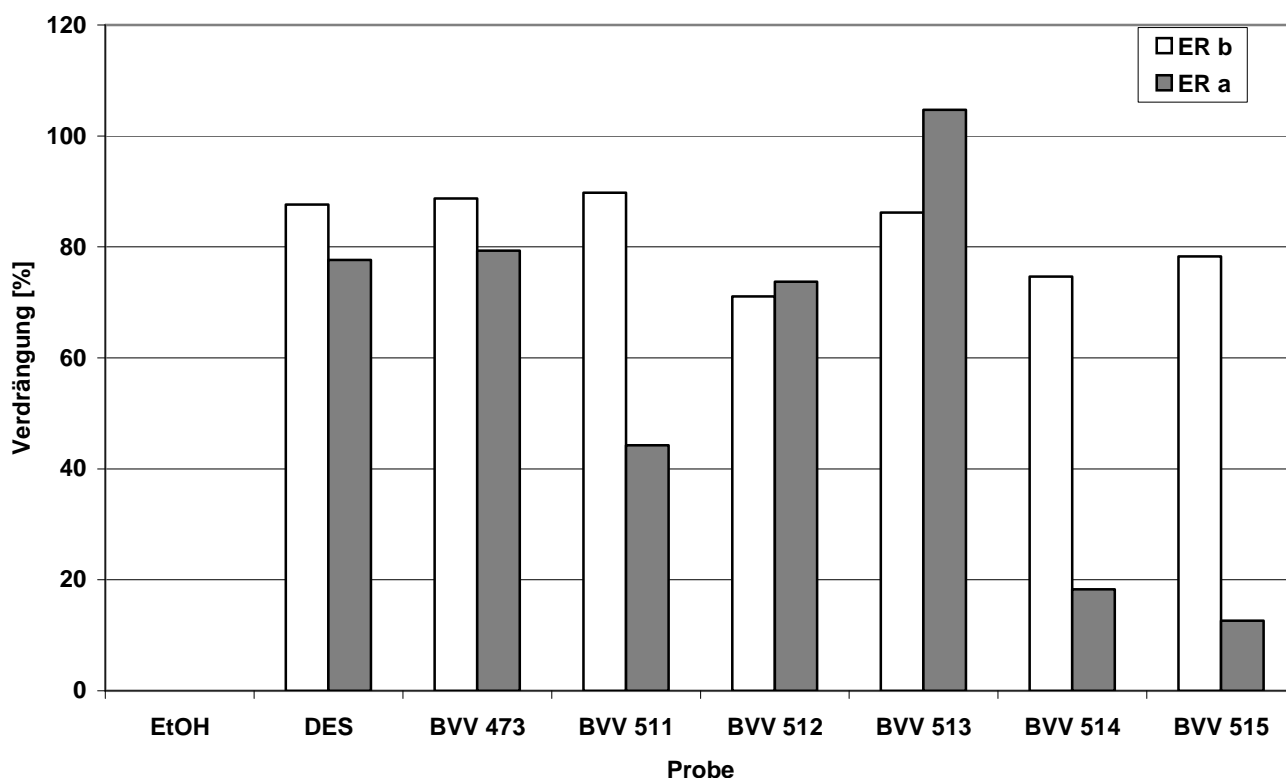


Abbildung 9-4 Affinitäten der Grundwasserproben zu ER α bzw. ER β

Um einen halbquantitativen Vergleich der östrogenen Wirkung der Proben BVV 511 und BVV 513 zu erhalten, wurden (gemessen an der Affinität zu den Östrogenrezeptoren) aus den D/W-Kurven die ED₅₀-Werte bestimmt. Diese Proben wurden stellvertretend ausgewählt, da sich diese gegenüber den übrigen Proben durch ihre hohe Verdrängung hervorhoben.

Kompetitiver Verdrängungsassay mit ER α und β der Wasserprobe BVV 511

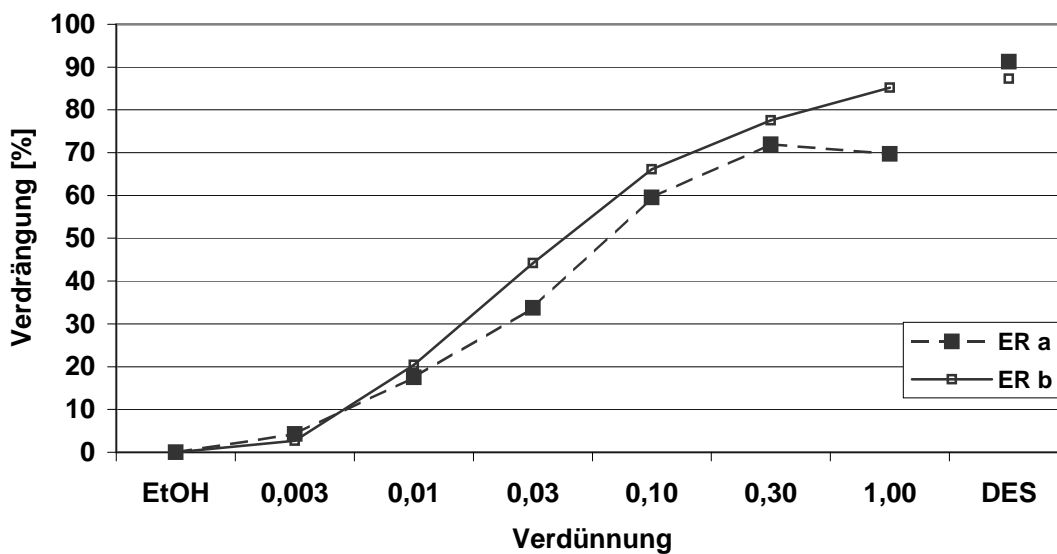


Abbildung 9-5 D/W-Kurven für BVV 511

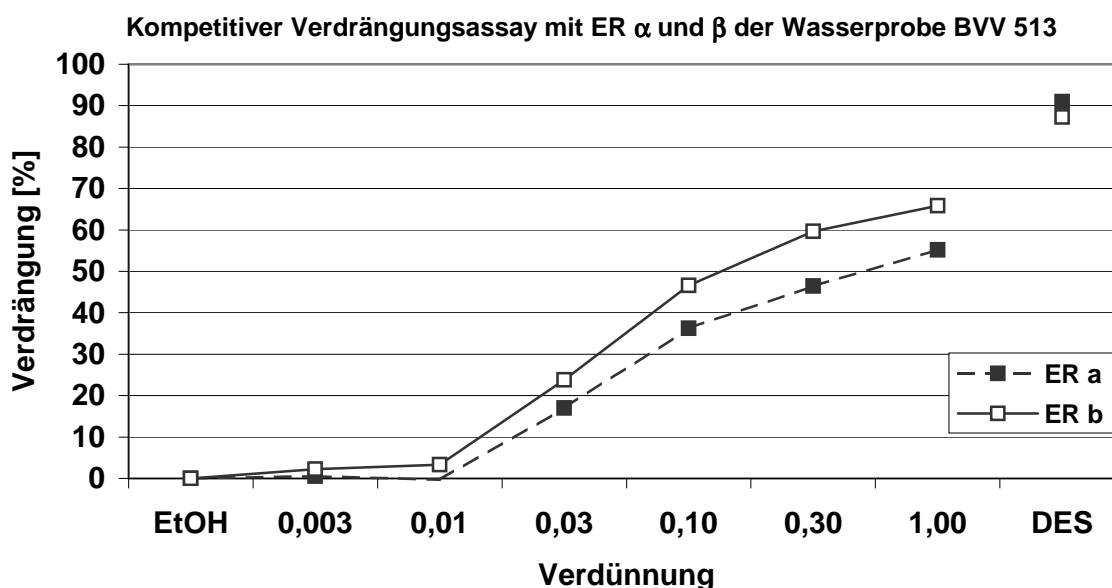


Abbildung 9-5 (Forts.) D/W-Kurven für BVV 513

Aufgetragen in der D/W-Kurve ist die Verdünnung des Extraktes, die sich wie folgt ergibt: 1 = 100% Probe, 0.3 = 30 % Probe und so fort.

Der D/W-Kurven in Abbildung 9-5 läßt sich für BVV 511 entnehmen, dass eine 50%-ige Verdrängung ungefähr noch bei einer Verdünnung von 1: 10 (α -Rezeptor) bzw. bei 1: 30 (β -Rezeptor) vorliegt. Im Vergleich dazu liegt der ED₅₀-Wert der Probe 513 für den β -Rezeptor ebenfalls bei einer Verdünnung von etwa 1:10, was der Probe 511 entspricht.

Hingegen erreicht die unverdünnte Lösung im α -Rezeptor nur eine 50%-Verdrängung. Die Diskrepanz dieser Verdrängungswerte gegenüber denen der Abbildung 9-4 zeigt sich auch in denen für die Positivkontrolle mit DES: in diesem Fall wird eine Verdrängung im Mittel von 90% für beide Rezeptoren erzielt, entsprechend eine Steigerung des Verdrängungswertes um 11% gegenüber dem aus Abbildung 9-4. Exemplarisch sei die Berechnung des nötigen Wasservolumens zum Erreichen des ED₅₀-Werts im Falle der Probe BVV 511 dargestellt. Da für die Extraktion ein Volumen von 10 mL genommen und der Rückstand in 200 μ L gelöst wurde, entspricht dies einer Aufkonzentrierung um den Faktor 200.

Geht man idealer Weise von einer vollständigen Extraktion aus, d.h. der verlustfreien Überführung aller in dem Probevolumen gelösten Inhaltsstoffe, entsprächen 200 μ L einem Wert von 100%. Das Testvolumen im Assay beträgt 10 μ L, etwa 1/20 des Gesamtvolumens des Extraktes. Somit ergibt die Rechnung für das benötigte Wasservolumen, um eine 50%-ige Verdrängung zu erreichen: 10 mL (extrahiertes Volumen)/20 (Anteil des Testvolumens bezogen auf Gesamtextrakt)=0.5mL. Da eine 1:10-Verdünnung vorlag, entspricht dies 50 μ L Wasserprobe, um den ED₅₀-Wert zu erreichen.

Interessant ist der Verlauf der Kurven. Während die Kurve für die Probe 511 im Niedrigdosisbereich einen steileren Verlauf zeigt (Abbildung 9-5), verläuft die Kurve der Probe 513 deutlich flacher (Abbildung 9-6). Dies deutet darauf hin, dass die wirksamen Inhaltsstoffe der Probe 511 eine höhere Affinität zu den Rezeptoren aufweisen und demnach auch toxikologisch relevanter sind. Zudem fällt beim Vergleich der D/W-Kurve der Probe 513 (Abbildung 9-6) mit der in Abbildung 9-4 auf, dass die Verdrängung in der höchsten Konzentration wesentlich niedriger ausfällt.

Probe	Tox. <i>E.coli</i>	Tox H 4 II E	EROD	ER α	ER β
BVV 473	o	o	o	+++ (wie DES)	+++ (wie DES)
BVV 511	+	++	o	++	+++
BVV 512	o	+	o	+++	+++
BVV 513	++	++	o	+++	+++
BVV 514	o	o	o	+	++

Tabelle 9-2 Zusammenfassung der toxikologischen Ergebnisse der Wasserproben; +++ = stark, ++ = mittel
+ = schwach, o = toxisch bzw. ohne Effekt

9.1.5. Chemische Zusammensetzung der Brunnenwasserproben (BVV)

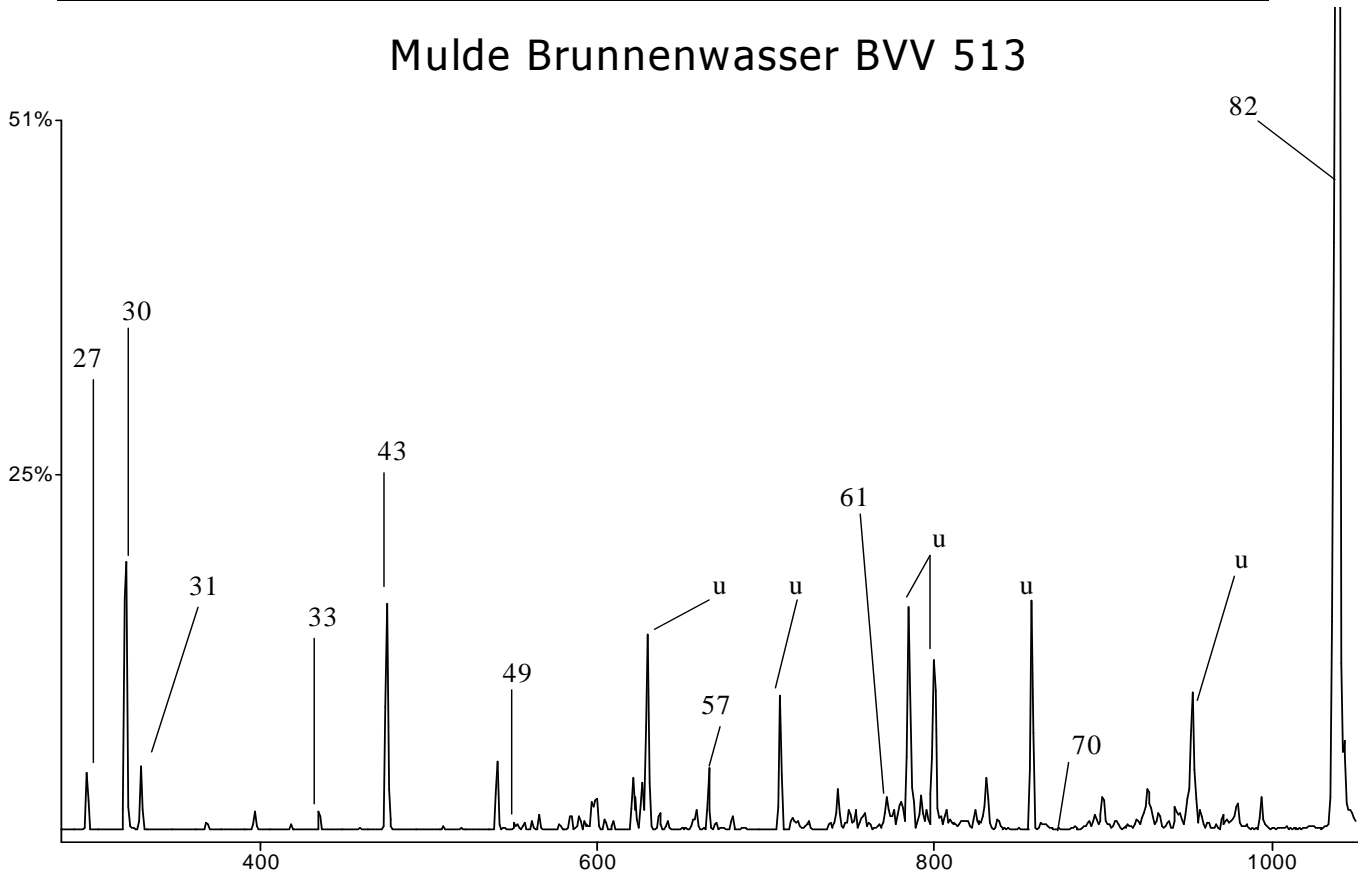
Um die Resultate der Toxizitäten in Bakterien und Säugerzellen qualitativ zu deuten, wurden die Wasserproben durch Extraktion mit Hexan/Dichlormethan aufkonzentriert und mittels GC/MS auf deren Zusammensetzung untersucht. Die qualitative GC/MS Analyse der Extrakte zeigte nur für die Proben BVV 513 und 514 die Gegenwart von unterschiedlich chlorierten Chlorphenolen an (Abbildung 9-9, S. 127). Nähere Angaben zu den Gehalten der einzelnen Chlorphenole sowie zu weiteren Inhaltsstoffen sind ausführlich im Abschlußbericht des Flutfolgeprojektes der Mulde dargestellt.^[5]

Probe	Hauptkomponente
BVV 473 – wenig belastet (n-Hexan-Extrakt)	<u>Dichlormethan-Extrakt:</u> Hauptsächlich Chlorphenole [g/L]
BVV 511 – kaum belastet	<u>Dichlormethan-Extrakt:</u> Perchlorethylen, Trichlorethylen
BVV 512 – stark belastet	<u>n-Hexan-Extrakt:</u> Trichlorethylen, Chlorphenol, chlorierte Aliphaten, Chlorbenzaldehyde <u>Dichlormethan-Extrakt:</u> Chlorphenole, Dichlorphenole
BVV 513 – höhere Konzentrationen als 512	<u>Dichlormethan-Extrakt:</u> Dichlorphenole, Chlorphenole
BVV 514 – wie 512 und 513	<u>Dichlormethan-Extrakt:</u> Chlorphenole und Dichlorphenole
BVV 515 – rel. wenig belastet	<u>Dichlormethan-Extrakt:</u> Spuren von Di- u. Tetrachlorethylen, Di- u. Monochlorbenzole

Tabelle 9-3 Qualitative Probenzusammensetzung^[5]

Qualitativ konnte ein Zusammenhang zwischen der Bakterientoxizität (vgl. Abbildung 9-1, S. 117) und den im Lösungsmittel-extrakt identifizierten Chlorphenolen gefunden werden. In der stark toxisch wirkenden Probe BVV 513 konnte 2,5- bzw. 2,6-Dichlor- und 2,4,5-Trichlorphenol identifiziert werden (vgl. Abbildung 9-6). Eine Deutung der Toxizität der Probe BVV 511 ließ sich aus den GC/MS Analysen nicht ableiten, da sich weder bekannte toxikologisch relevante Substanzen noch chlorierte Phenole im Extrakt nachweisen ließen. Interessant erschien dagegen, dass sich in der Probe BVV 514 Chlorphenole nachweisen ließen, diese Probe jedoch im Bakterientest sowie im Toxizitätstest mit Hepatozyten keine zytotoxischen Effekte zeigte. Die folgende Tabelle gibt die qualitative Zusammensetzung der Hauptkomponenten wieder, wie sie durch GC/MS Messungen im AK Francke identifiziert wurden.

Mulde Brunnenwasser BVV 513



27: 2,5-Dichlorphenol; 30: 4-Chlorphenol; 31: 2,6-Dichlorphenol; 33: Dodecan; 43: 2,4,5-Trichlorphenol; 49: Tridecan; 57: Tetradecan; 61: Pentadecan; 70: Hexadecan; 82: Tetradecylacetat (MS); u: unbekannt

Abbildung 9-6 Gedehnter Ausschnitt des TIC der Probe BVV 513, in der die Chlorphenole eluieren

Eine vollständige Übersicht der Inhaltsstoffe der Grundwasserproben BVV 473-BVV 513 ist in der Tabelle 9-4 angeben.

Spezieller Teil

	BVV 473	BVV 511	BVV 512	BVV 513	BVV 514
<i>Kohlenwasserstoffe</i>					
Dodecan	x	x		x	
Tridecan	x	x		x	x
Tetradecan		x			
Pentadecan	x	x	x	x	x
Heptadecan	x	x			
Oktadecan	x	x	x		
Eicosan	x	x			x
Heneicosan	x	x			
Docosan	x	x			
Tricosan	x	x			
Farnesan	x	x			
Phytan	x				
<i>Alkohole</i>					
2-Decanol	x	x			
1-Octen-3-ol					x
<i>Carbonäuren/ -ester</i>					
1-Octen-3-yl 2-methylbutyrat		x			
Tetradecyl acetat		x		x	
<i>Chlorphenole</i>					
4-Chlorphenol				x	x
2,5-Dichlorphenol					x
2,6-Dichlorphenol				x	x
2,4,5-Trichlorphenol				x	x

Tabelle 9-4 Chemische Zusammensetzung der Brunnenwasserproben (BVV)

9.1.6. Synthese und Identifizierung von 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol

Die Untersuchungen zur Affinität an ER α bzw. ER β (Abbildung 9-4, S. 123) der Hexan/Dichlormethan-Extrakte zeigten, dass für alle Extrakte eine Affinität im Östradiol-Verdrängungsassay nachgewiesen werden konnte. Die genauere Analyse der GC/MS-Untersuchungen zu den Proben BVV 473 und 511 ergab, dass neben den Chlorphenolen noch eine weitere Substanz (Scan 1259) in den Extrakten enthalten war, deren Massenspektrum in der Abbildung 9-7 gezeigt ist.

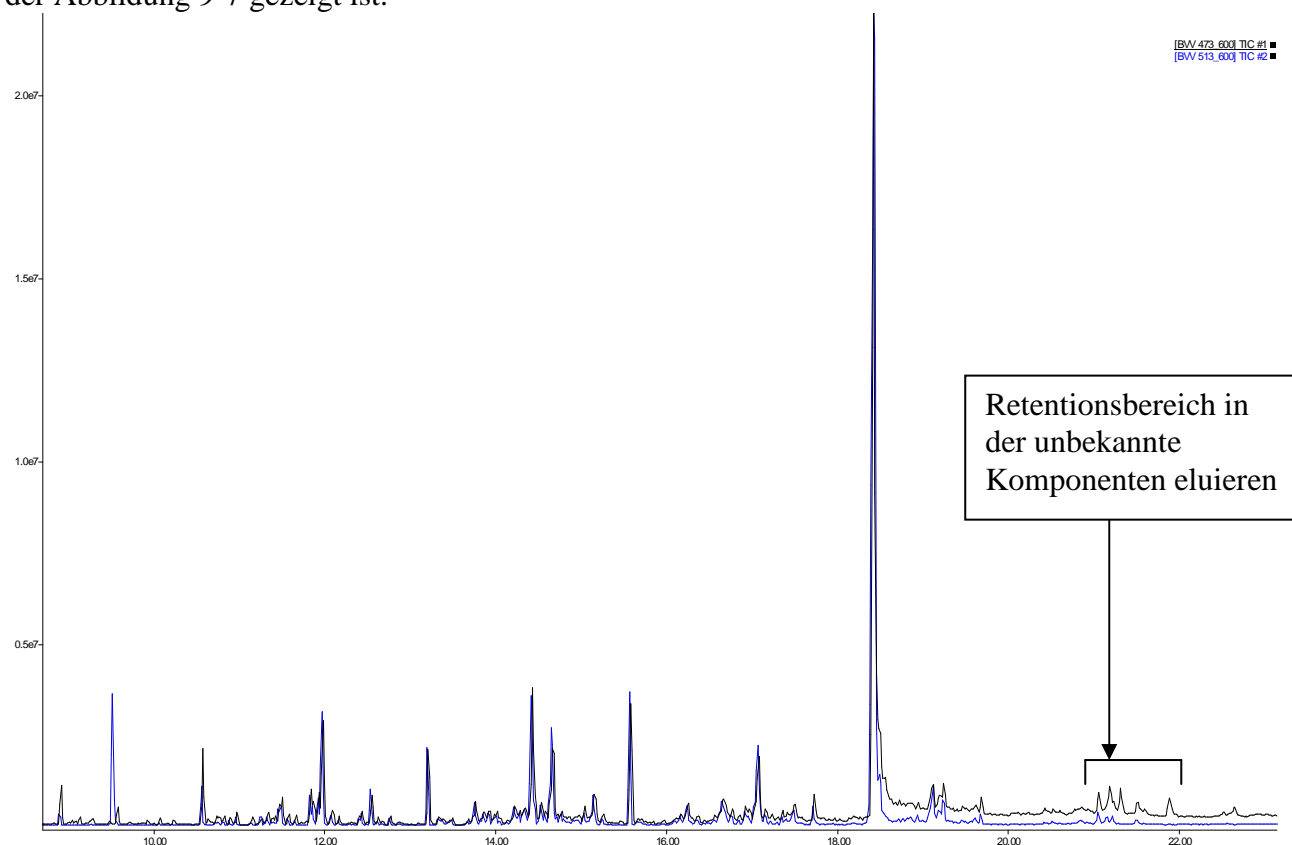


Abbildung 9-7 TIC der Brunnenwasserproben BVV 473 und 513; identische Zusammensetzung im Bereich bis Scan-Nr.1000 (vgl. Abbildung 9-6)

Spezieller Teil

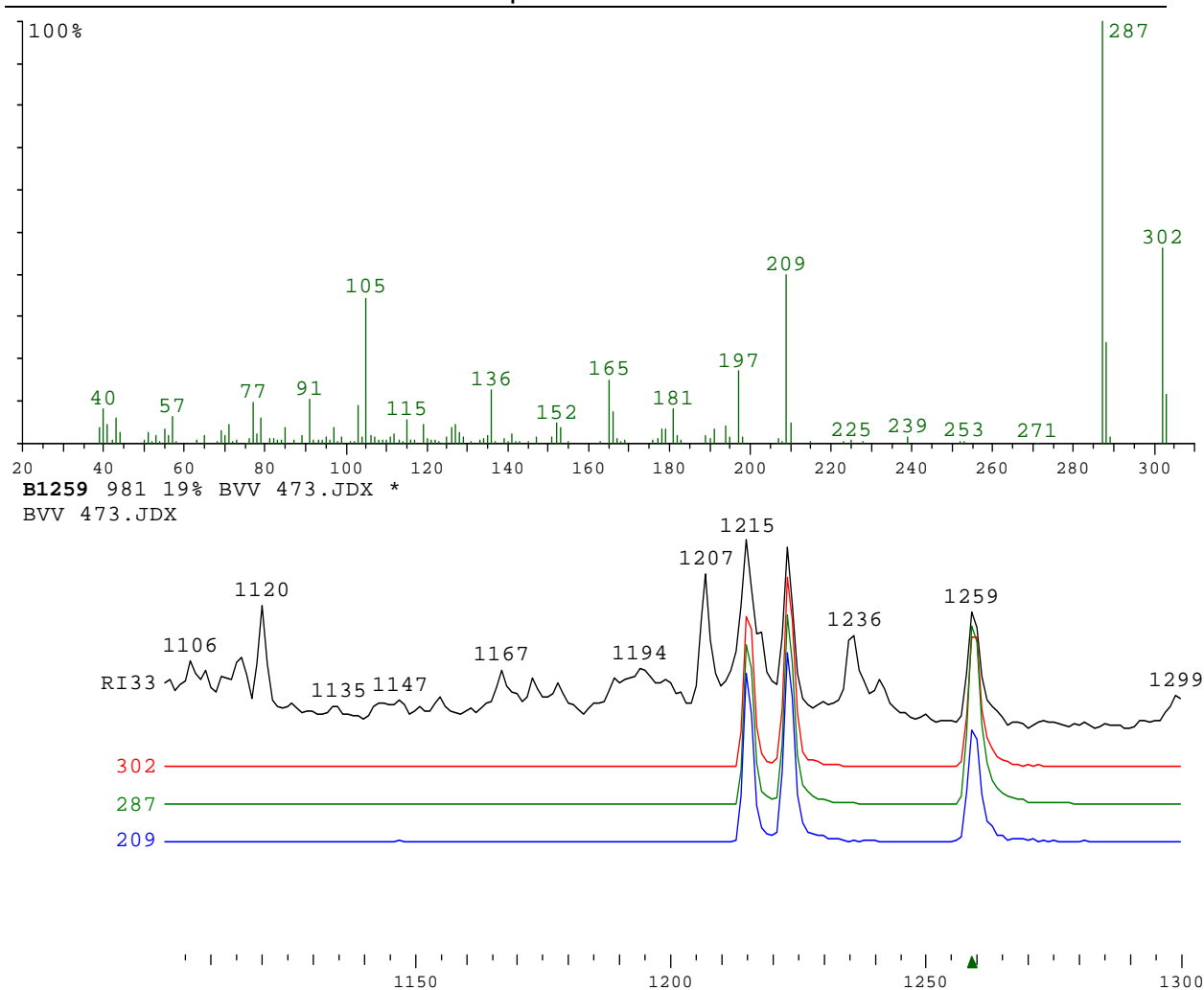


Abbildung 9-7 (Forts.): Ionenspuren der Massen m/z 302, 287 und 209 der bislang unbekannt Substanz [Nr. 1259] in den Wasserproben BVV 473 und BVV 511

Recherchen in der Massenspektrenbibliothek MassLib nach Strukturvorschlägen für dieses Fragmentierungsmuster (Scan 1259) ergab die Struktur des in Abbildung 9-8 dargestellten Phenols 1, das als Arbeitshypothese für die gefundene östrogene Aktivität des Extraktes im Östradiol-Verdrängungsassay angenommen wurde. Um diese Hypothese zu belegen, wurde das Phenol synthetisiert und spektroskopisch charakterisiert.

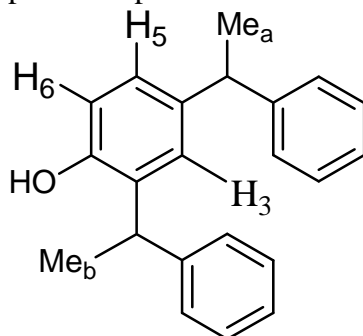


Abbildung 9-8: Strukturvorschlag für die Substanz gemäß dem Massenspektrum von Abbildung 9-7
Die Interpretation des Fragmentierungsmusters ergab folgende Information: das Molekülion hat die Masse 302. Dass es sich bei diesem Fragmentation um das Molekülion handeln muss, ergibt sich daraus, dass keine weiteren Fragmente mit höherer Masse im Massenspektrum gefunden wurden und dieses Fragment eine Abspaltung von $[M^+ - 15]$ zeigt. Aus dem Intensitätsverhältnis des Molekülions der Masse m/z 302 zum Isotopenpeak lässt sich die Kohlenstoffzahl abschätzen zu $[A+1]/[A] \approx 10/50 = 20\%$ entsprechend einer Anzahl von 18 Kohlenstoffatomen.

Ebenso ergibt sich aus dem Intensitätsverhältnis des Fragmentations der Masse m/z 287: $[A+1]/[A] \approx 20/100 = 20\%$ eine analoge Abschätzung. Vergleicht man diese grobe Abschätzung mit dem Strukturvorschlag, zeigt sich in erster Näherung eine recht gute Übereinstimmung hinsichtlich der Kohlenstoffzahl. Unter Annahme der in Abbildung 9-8 dargestellten Strukturformel für das Phenol, lassen sich für die Fragmentationen folgende Strukturen postulieren:

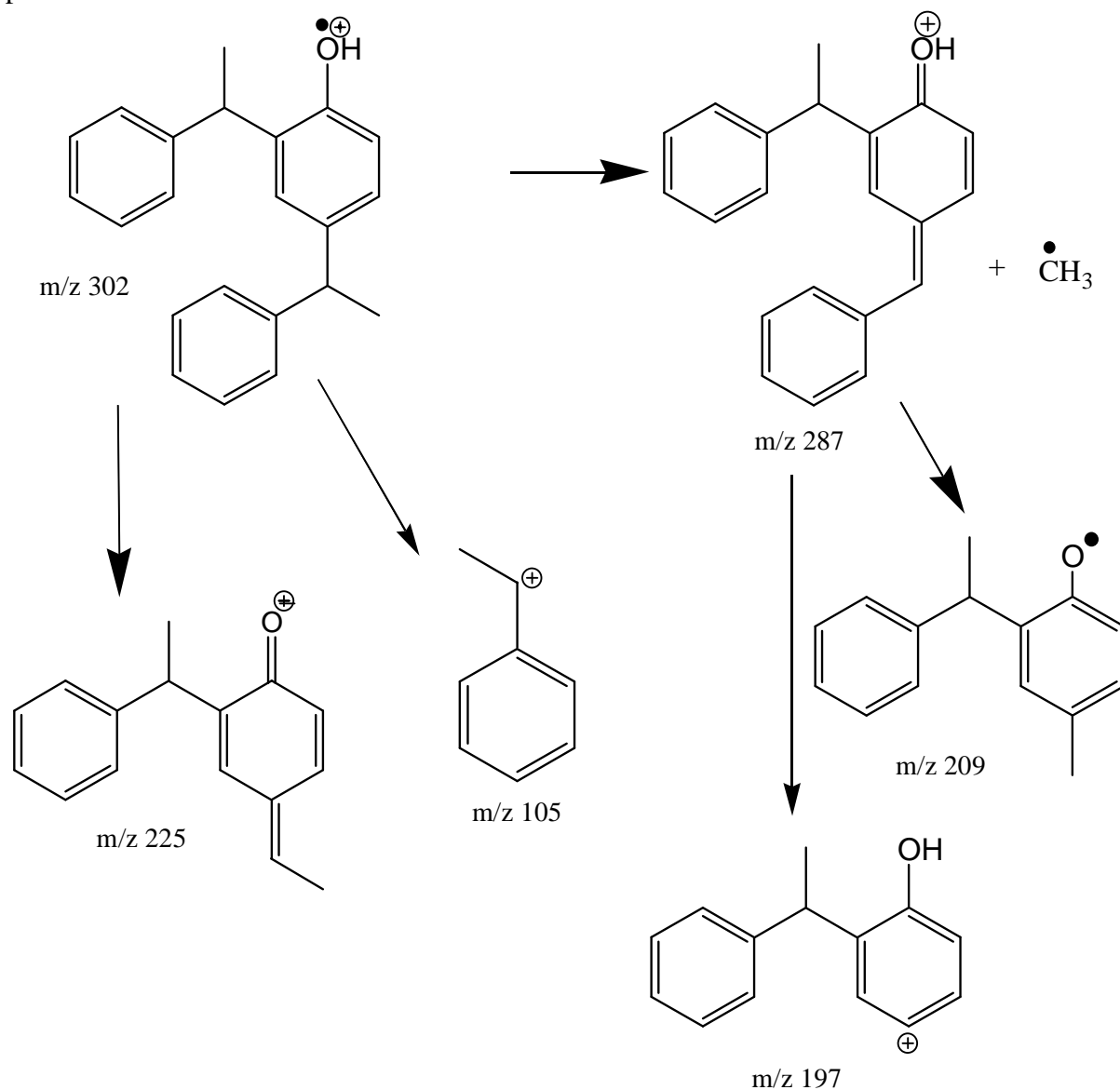


Abbildung 9-9: Mögliche Strukturen der Fragmentationen des Massenspektrums in Abbildung 9-7

Um den Strukturvorschlag abzusichern und damit die bislang unbekannt Substanz eindeutig zu identifizieren, wurde das Phenol entsprechend der japanischen Patentschrift^[108] synthetisiert. Die Synthese erfolgte entsprechend der in der Abbildung gezeigten Weise unter *Friedel-Crafts*-Bedingungen:

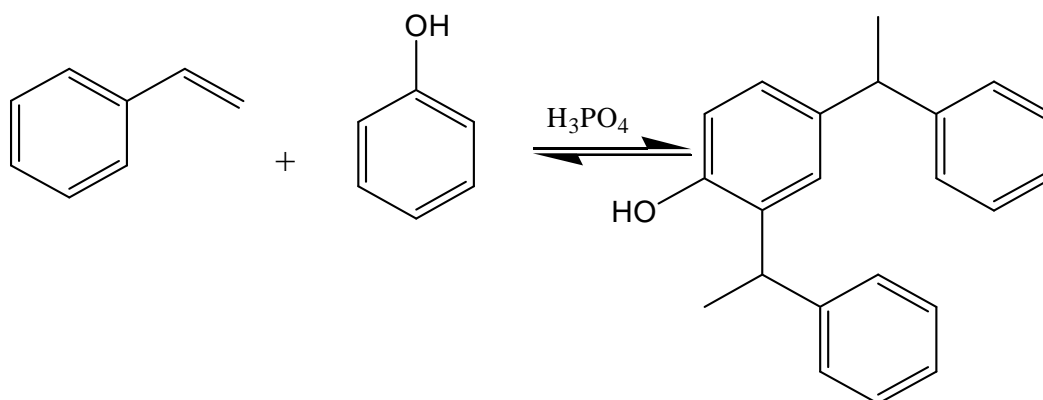


Abbildung 9-10: (Friedel-Crafts-)Syntheseprinzip zur Darstellung von 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol

Das TIC des GC/MS des nach der Reaktion erhaltenen Produkts (vgl. Abbildung 9-11), zeigt dass neben dem gewünschten Produkt (Scan 1262) noch weitere Substanzen erhalten wurden.

P290705A.JDX * /
MaxE3 SumE4
RI 32043 47806

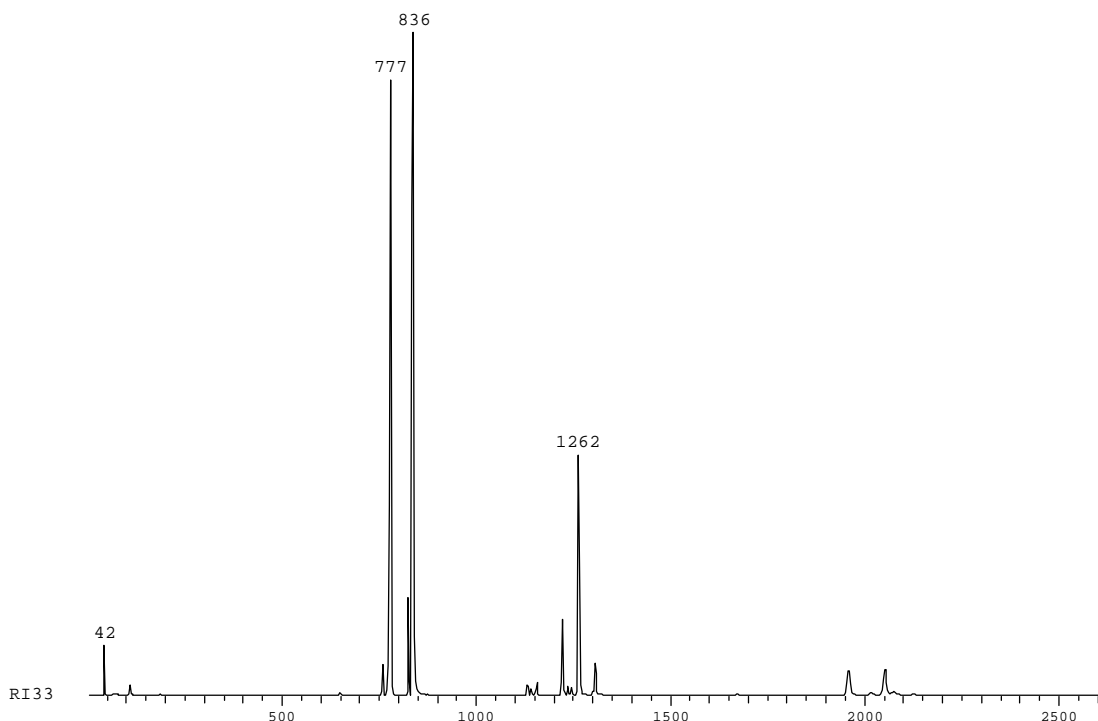


Abbildung 9-11: TIC des durch *Friedel-Crafts*-Synthese erhaltenen Produktgemischs

Dies ist aufgrund der Reaktion nach *Friedel-Crafts* zu erwarten, da diese wenig (regio-)selektiv abläuft und u.a. auch höher alkylierte Produkte erhalten werden können.

Die folgende Übersicht (vgl. Abbildung 9-12) gibt die möglichen Syntheseprodukte systematisch wieder, wobei sich zeigt, dass die Zielverbindung, das ortho-para-substituierte Phenol aus dem mono-ortho- und dem mono-para-substituierten Phenol entstehen kann. Nicht betrachtet wurden jene alkylierten Phenole, deren zweite Substitution am eingeführten Aromaten erfolgte, da dieser gegenüber dem substituierten Phenol weniger nucleophil reagiert. Die im TIC des GC/MS gefundene Produktverteilung (vgl. Abbildung 9-11) zeigt zunächst, dass die mono-substituierten Phenole (Scan 777 und 836) den weitaus größten Anteil im Produktgemisch ausmachen. Dies kann derart interpretiert werden, dass mit Fortschreiten der Reaktion die Konzentration des Styrols im Reaktionsansatz stetig abnimmt und somit eine Zweitsubstitution immer unwahrscheinlicher wird.

Dass das ortho-para-substituierte Phenol (Zielsubstanz, Scan 1220) gegenüber den anderen disubstituierten Phenolen einen größeren Anteil ausmacht, kann durch dessen diskutierte Bildung aus den entsprechenden mono-substituierten Phenolen gedeutet werden.

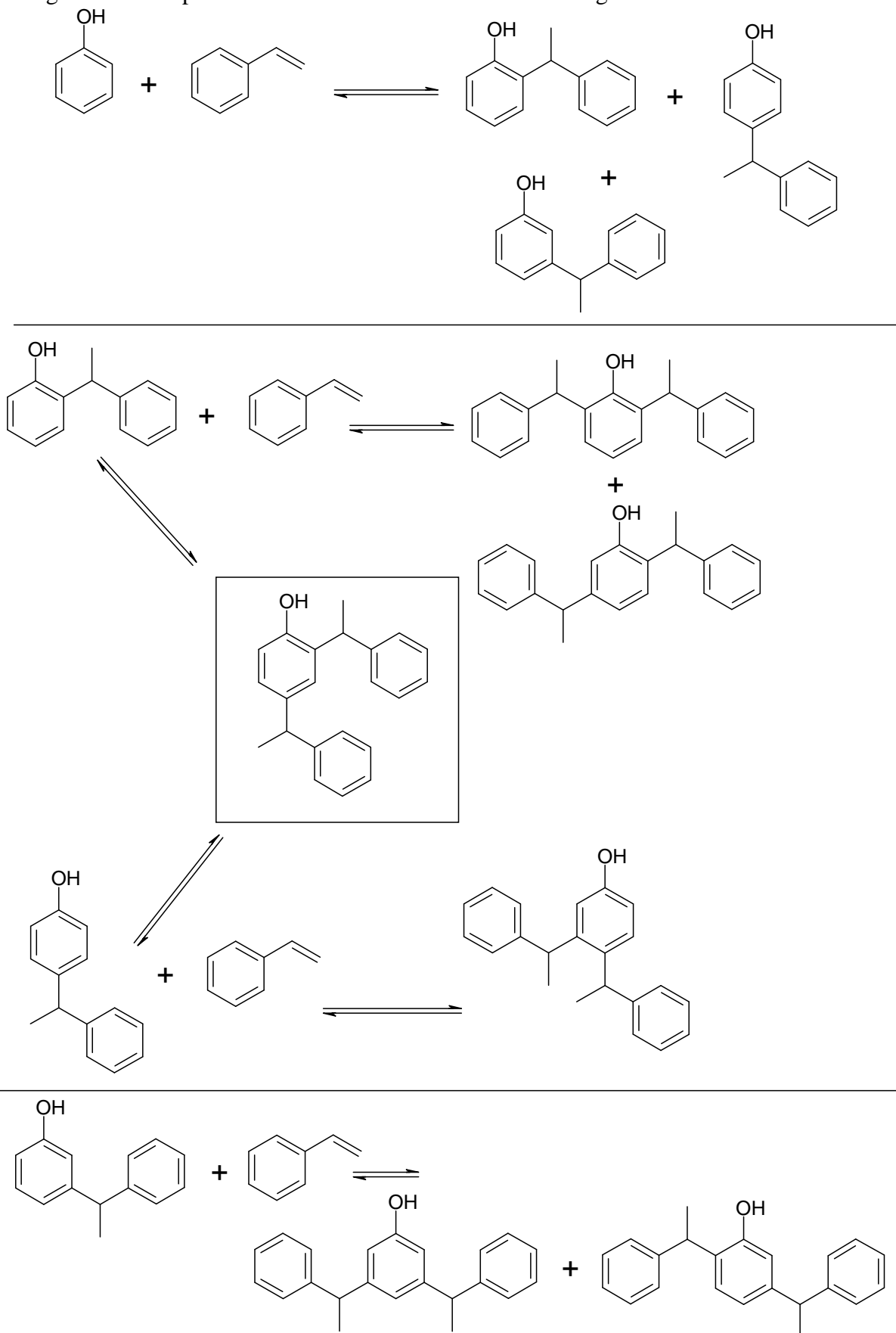


Abbildung 9-12: Mögliche Produkte in der 1,2-Bis(1-phenylethyl)phenol-Synthese

Die folgende Abbildung zeigt die Massenspektren der mono-phenylierten Phenole (Scan 777 und 836).

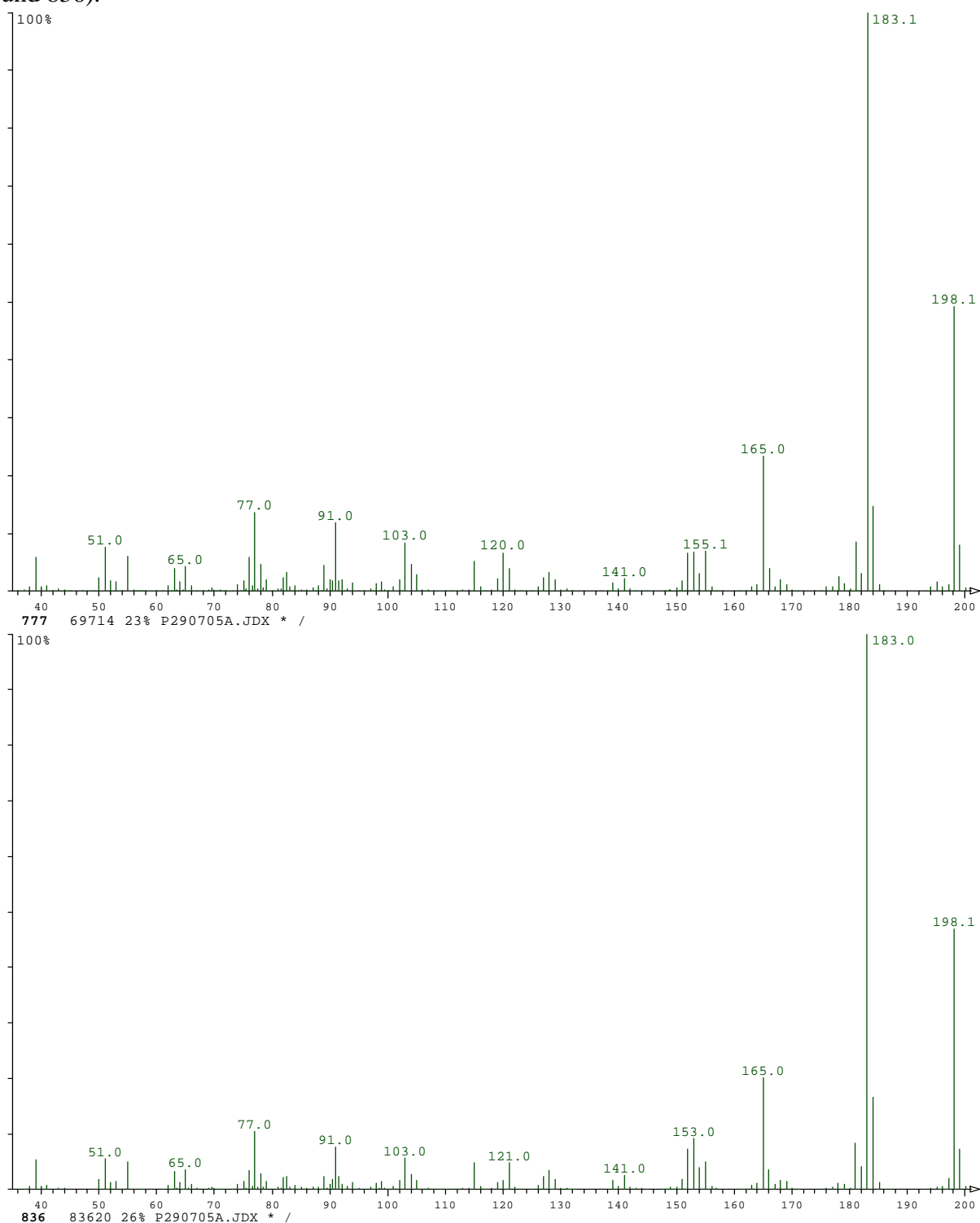


Abbildung 9-13: Massenspektren der einfach phenylierten Phenole (Scan 777 und 836)

Interessant ist, dass unter diesen Reaktionsbedingungen ebenfalls eine Verbindung (Scan 1220) entsteht, die die gleiche Masse wie monophenylierten Produkte (Scan 777 bzw. 836) aufweist, sich jedoch im Fragmentierungsmuster unterscheidet. Der Basispeak hat in diesem Fall die Masse m/z 105 (statt 183).

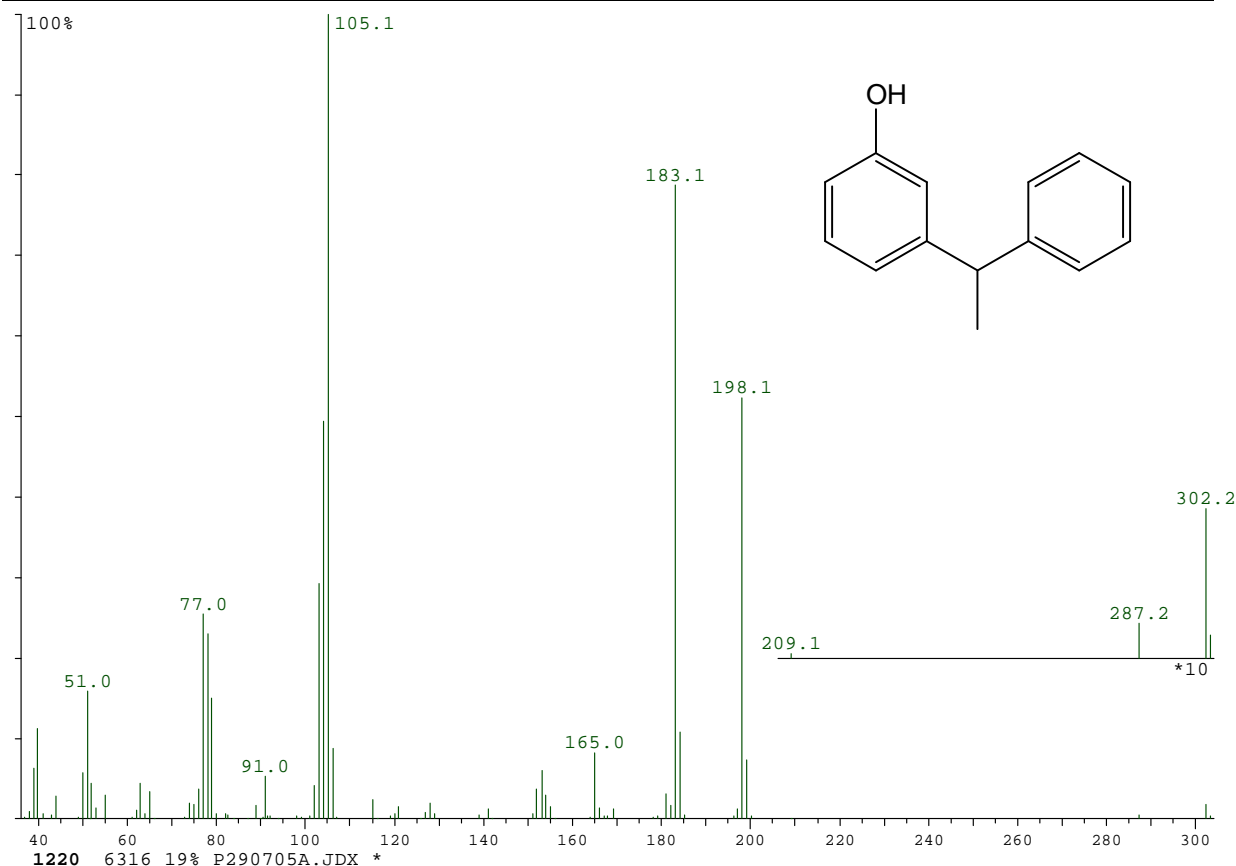


Abbildung 9-14: Massenspektrum des phenylierten Phenols (Scan 1221) – wahrscheinlich monosubstituiertes 3-(1-Phenylethyl)phenol

Aufgrund der Intensitätsverhältnisse der Peaks der Scan-Nr. 777 bzw. 836 und der Scan-Nr. 1221 ist es wahrscheinlich, dass es sich bei der Scan-Nr. 1221 um das meta-Produkt handelt (vgl. Abbildung 9-14). Daneben tritt noch ein weiteres Reaktionsprodukt auf (Scan 1305), das wie dieses die gleiche Masse hat. Es unterscheidet sich jedoch im Fragmentierungsmuster derart, dass der Basispeak die Masse m/z 183 aufweist (Abbildung 9-15). Zudem ist hier die Abspaltung einer Methylgruppe [M-15] gegenüber der Verbindung mit dem Scan 1221 eher weniger ausgeprägt.

Intensiver tritt die Abspaltung von m/z 105 Masseneinheiten (aus dem Fragment der Masse m/z 287) in den Vordergrund. Nimmt man an, dass das di-ortho-substituierte Phenol entstanden ist, so kann die Abspaltung des Fragmentions m/z 105, wie in Abbildung 9-16 dargestellt, formuliert werden.

Spezieller Teil

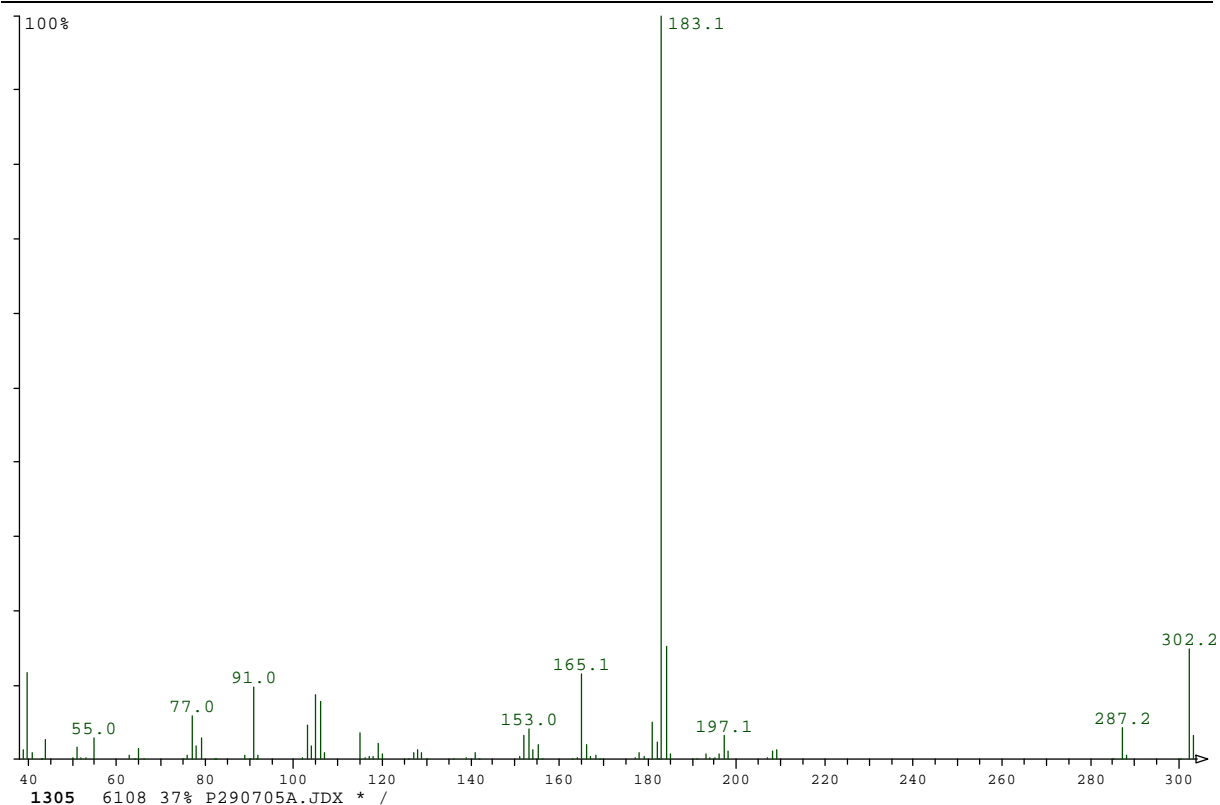


Abbildung 9-15: Massenspektrum eines zweifach phenylierten Phenols (Scan 1305)

Geht man von der „keto“-Grenzformel für das di-ortho-substituierte Phenol (Abbildung 9-16) aus, so kann im Sinne einer McLafferty Umlagerung die Abspaltung von m/z 105 Masseneinheiten dann wie folgt formuliert werden:

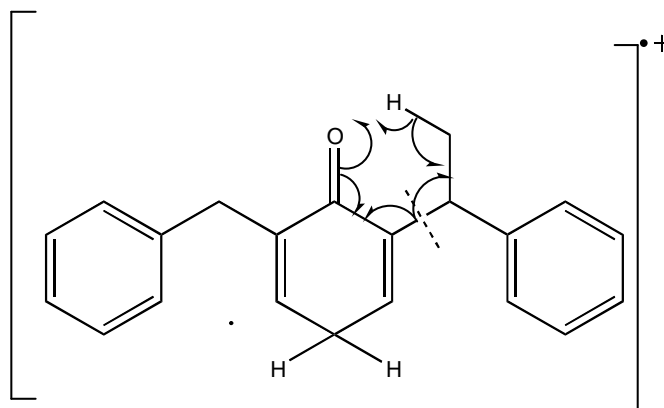


Abbildung 9-16: Interpretation für die Abspaltung von m/z 105 aus m/z 287

Da das Mutterion in beiden ortho-Positionen einen Substituenten mit einer Methylgruppe enthält, erklärt sich somit das Fragmentierungsmuster für die Scan-Nr. 1305, so die höhere Intensität dieses Fragments und damit die abweichende Fragmentierung gegenüber der Zielsubstanz (Scan 1262).

Das Produktgemisch der *Friedel-Crafts*-Alkylierung wurde mit Hilfe von Flüssig- und Dünnschichtchromatographie gereinigt (vgl. Kapitel 15.9). Aus den Peakflächenverhältnissen im GC-FID (vgl. Abbildung 9-17) konnte die Reinheit der enthaltenen Verbindung zu etwa 90% abgeschätzt werden.

Einen Hinweis, dass es sich dabei um die gewünschte Verbindung handelt und diese mit der im Extrakt bislang unbekanntem Verbindung identisch ist, erhält man aus dem Vergleich der Retentionszeiten sowie des Fragmentierungsmusters (vgl. Abbildung 9-18).

Eine Reinheitsprüfung des Produktes bei isothermer Arbeitsweise am Gaschromatographen führte zu keiner weiteren Auftrennung.

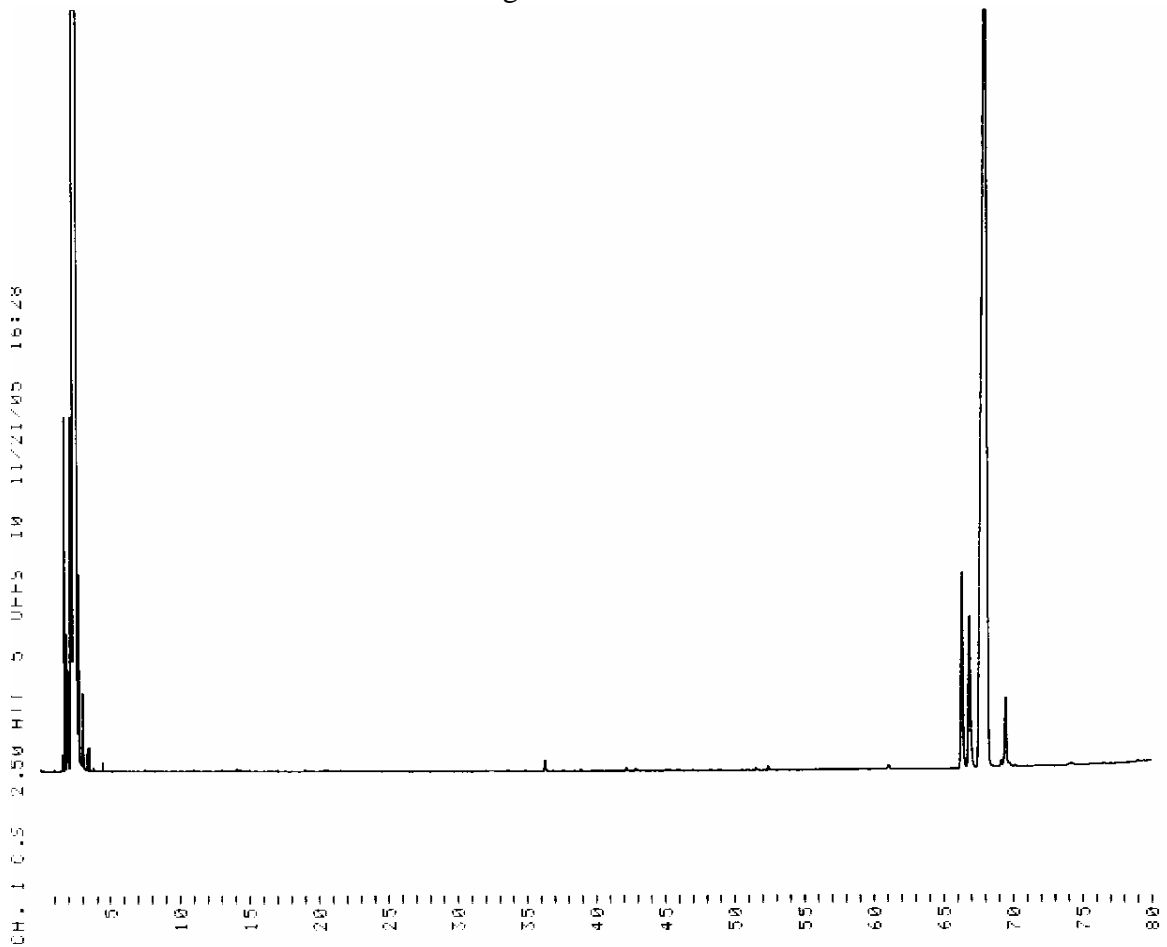


Abbildung 9-17: GC-FID des Syntheseproduktes nach Reinigung

BVV 473-A.JDX * /
 MaxE1 SumE3
 RI 29183 20129
 RI 54062 18920

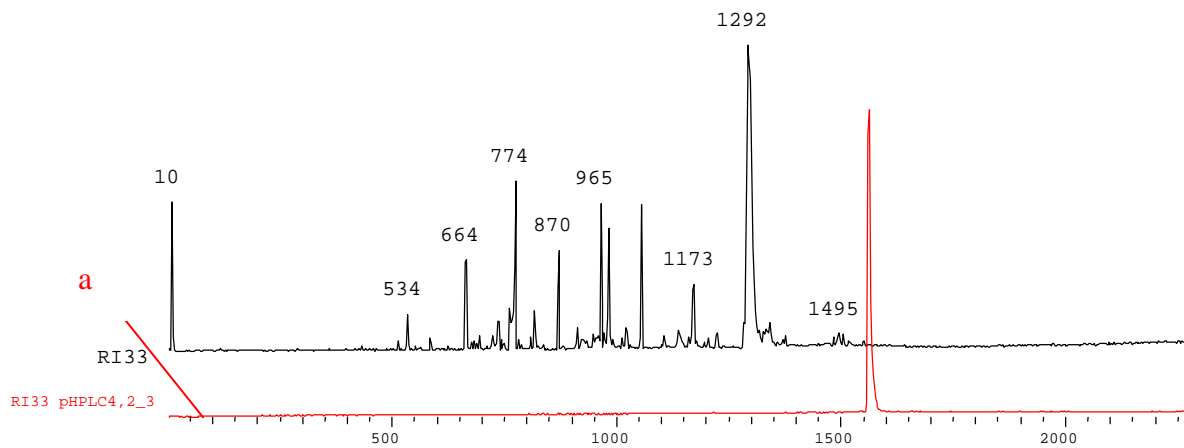


Abbildung 9-18: TIC des Extraktes BVV 473 und des aufgereinigten Syntheseproduktes (a)

Das Produkt wurde daher ohne weitere Reinigung für weitere spektroskopische Untersuchungen eingesetzt. Die Abbildung 9-19 zeigt das $^1\text{H-NMR}$ des (aufgereinigten) Produktes aus der HPLC-Fraktion F4.2.

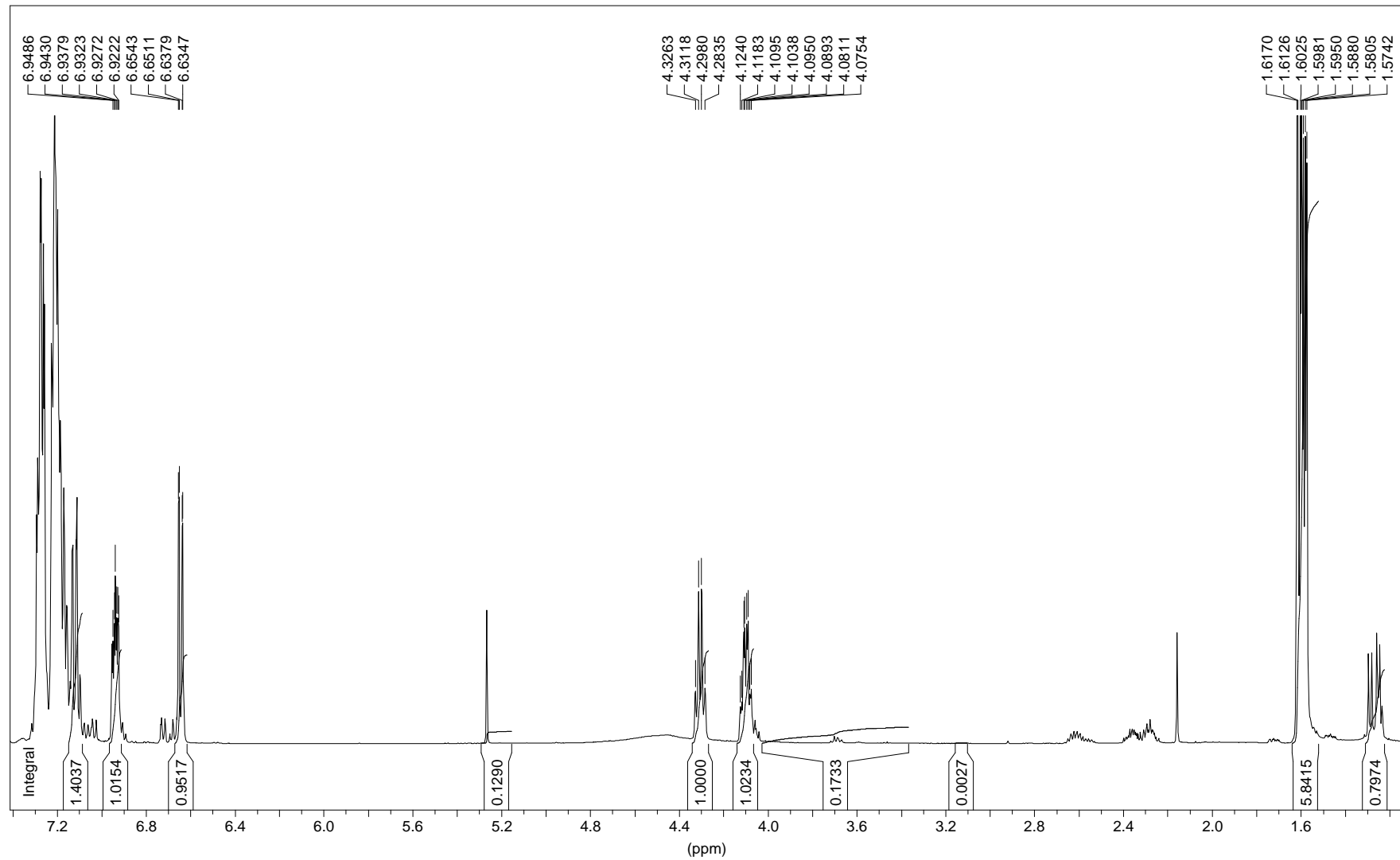


Abbildung 9-19: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des aufgereinigten Syntheseproduktes

Das ^1H -NMR Spektrums (Abbildung 9-19) zeigt drei Bereiche, in denen Resonanzen auftreten. Das Signal mit der chemischen Verschiebung von $\delta=1.6$ ppm entspricht den Methylprotonen und ist mehrfach aufgespalten, wobei 4x eine Kopplungskonstante von 7Hz ermittelt wurde.

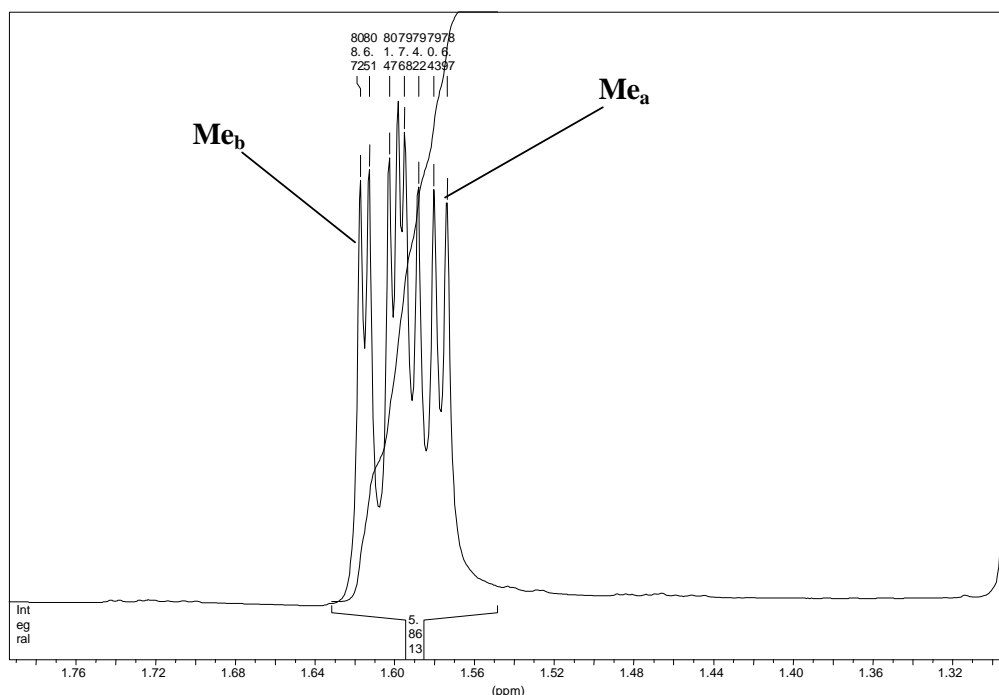


Abbildung 9-20: Signal der Methylprotonen mit der chemischen Verschiebung von 1.6 ppm. Interpretiert man die zwei Signalgruppen mit der chemischen Verschiebung von $\delta=4.3$ und 4.1 ppm als Methinprotonen (Abbildung 9-21), ergeben sich daraus die Integralwerte der übrigen Resonanzsignale. Nach Integration der möglichen Methinprotonen mit dem Integralwert von jeweils 1H, erhält man einen Integralwert von 6H für das Resonanzsignal bei 1.6 ppm. Das System der potentiellen Methylprotonen erweist sich als ein 8-Liniensystem (Abbildung 9-20). Die Deutung dieses 8-Liniensystems als eine Aufspaltung des Signals kann mit dem in Abbildung 9-8 gezeigten Strukturvorschlag nicht vereint werden. Auf Grundlage des Strukturvorschlages wäre dagegen eine ^3J -Kopplung der Methylprotonen mit dem benachbarten Methinproton in Form einer Aufspaltung der Resonanzsignale zum Dublett zu erwarten.

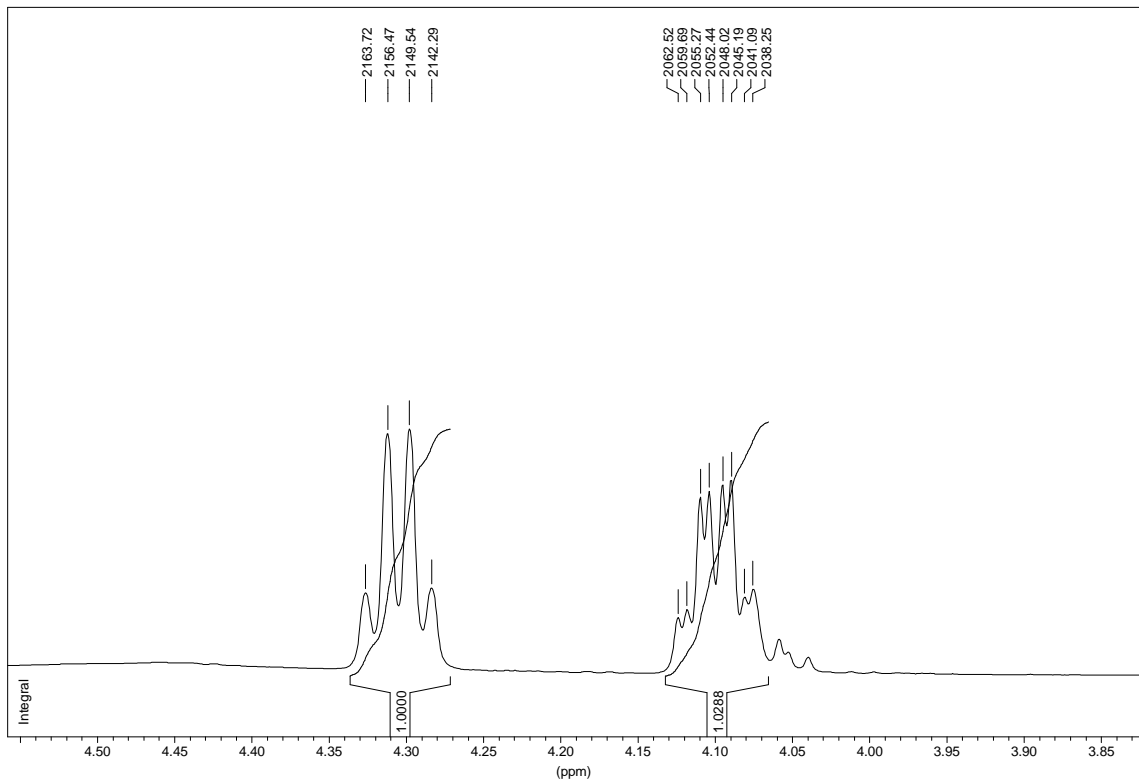


Abbildung 9-21: Signal der Methinprotonen mit der chemischen Verschiebung von 4.1 und 4.3 ppm
 Die Signale mit der chemischen Verschiebung von $\delta=4.3$ ppm und $\delta=4.10$ ppm zeigen jeweils eine Aufspaltung zum Quartett mit der Kopplungskonstanten von 7Hz. Letzteres Signal zeigt zudem eine weitere Aufspaltung zu einem Dublett mit der Kopplungskonstanten von 2Hz. Die Kopplung von 7Hz entspricht dabei einer Kopplung mit den Methylprotonen. Wie sich die Kopplung von 2Hz interpretieren lässt, ist nicht klar.

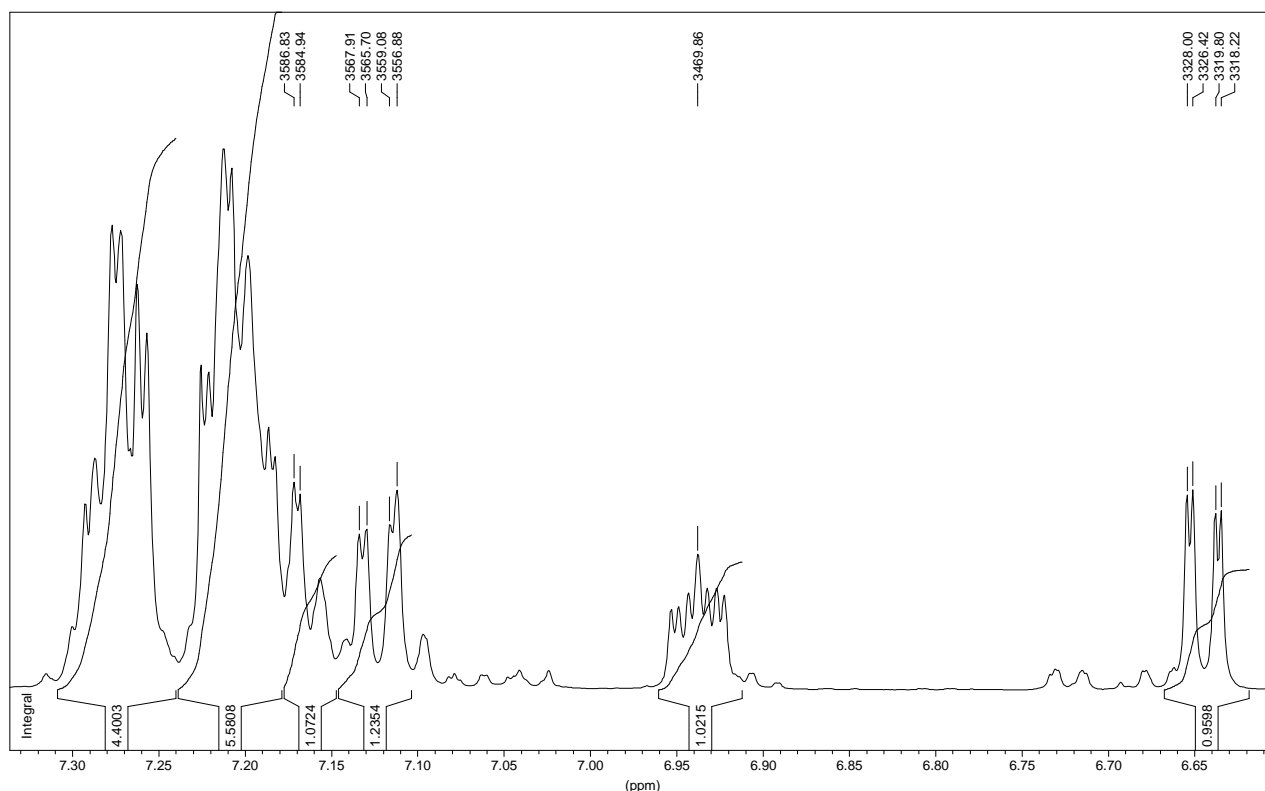


Abbildung 9-22: Signal der aromatischen Protonen mit der chemischen Verschiebung von 6.6, 6.9, 7.13, 7.2 und 7.27 ppm

Die Signale mit einer chemischen Verschiebung von 6.6 ppm, 6.9 ppm, 7.13 ppm, 7.2 ppm und 7.37 ppm repräsentieren die Resonanz der aromatischen Protonen. Interessant ist insbesondere das Aufspaltungsmuster des Protons mit $\delta=6.9$ ppm, das als mehrfach aufgespaltenes Signal erscheint. Dieses Aufspaltungsmuster ist ebenfalls nicht mit dem Strukturvorschlag in Abbildung 9-8 vereinbar, nach man kein mehrfach aufgespaltenes Signal sondern zwei Gruppen von Aufspaltungen der Signale im Phenolsystem erwarten würde: ein Singulett für das Proton H_3 und jeweils ein Dublett für die Protonen H_5 und H_6 . Im HH-COSY (Abbildung 9-23) finden sich Kopplungen für das aromatische Proton ($\delta=6.90$ ppm) zu den Protonen bei $\delta=6.6$ ppm und 7.13 ppm. Darüberhinaus findet sich eine weitere Kopplung zu einem Proton bei $\delta=7.2$ ppm. Das Proton bei $\delta=7.2$ ppm gehört zu einer Gruppe von Protonen (Resonanzbereich $\delta=7.18-7.3$ ppm, Abbildung 9-22), die zu den Aromaten gehören und sich nicht näher zuordnen lassen.

Eine skalare Kopplung erfolgt maximal über vier chemische Bindungen, so dass eine Kopplung des Protons bei $\delta=6.90$ ppm zu dem aromatischen Proton bei $\delta=7.2$ ppm aufgrund der Distanz ausgeschlossen werden kann.

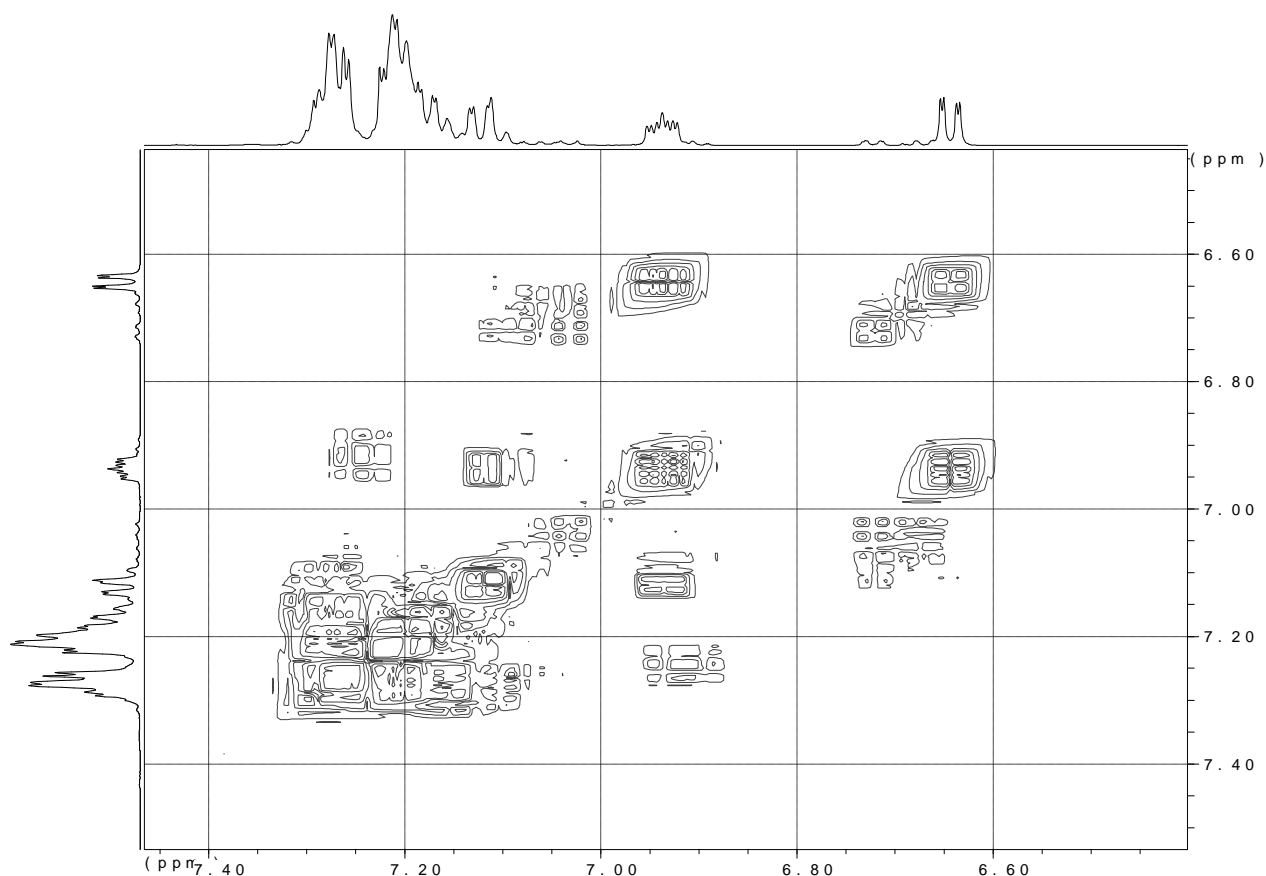


Abbildung 9-23: HH-COSY im Bereich der aromatischen Protonen

Aus dem Kopplungsmuster im aromatischen Bereich (vgl. Abbildung 9-23) ist eine eindeutige Zuordnung der Resonanzsignale zu einzelnen Protonen im Phenol nicht möglich und ein Substitutionsmuster lässt sich nicht ableiten. Darüberhinaus kann auch keine Aussage zur Verknüpfung einzelner Protonen zum jeweiligen Aromaten gemacht werden.

Aufgrund der bisherigen Interpretation der Aufspaltung einzelner Resonanzsignale ist anzunehmen, dass ein Gemisch zweier Diastereomere vorliegt. Diese treten als vermeintliche Aufspaltung der Signale der Methyl- ($\delta=1.6$ ppm) und Methinprotonen ($\delta=4.1$ ppm) in Erscheinung.

In der Vergrößerung des HH-COSY (Abbildung 9-24) erkennt man, dass das Methinproton bei $\delta=4.09$ ppm je eine Kopplung zu zwei Methylgruppen mit unterschiedlicher chemischer Verschiebung ($\delta=1.60$ und 1.62 ppm) aufweist. Dagegen zeigt das Methinproton mit $\delta=4.30$ ppm eine Kopplung zu einer Methylgruppe mit $\delta=1.58$ ppm.

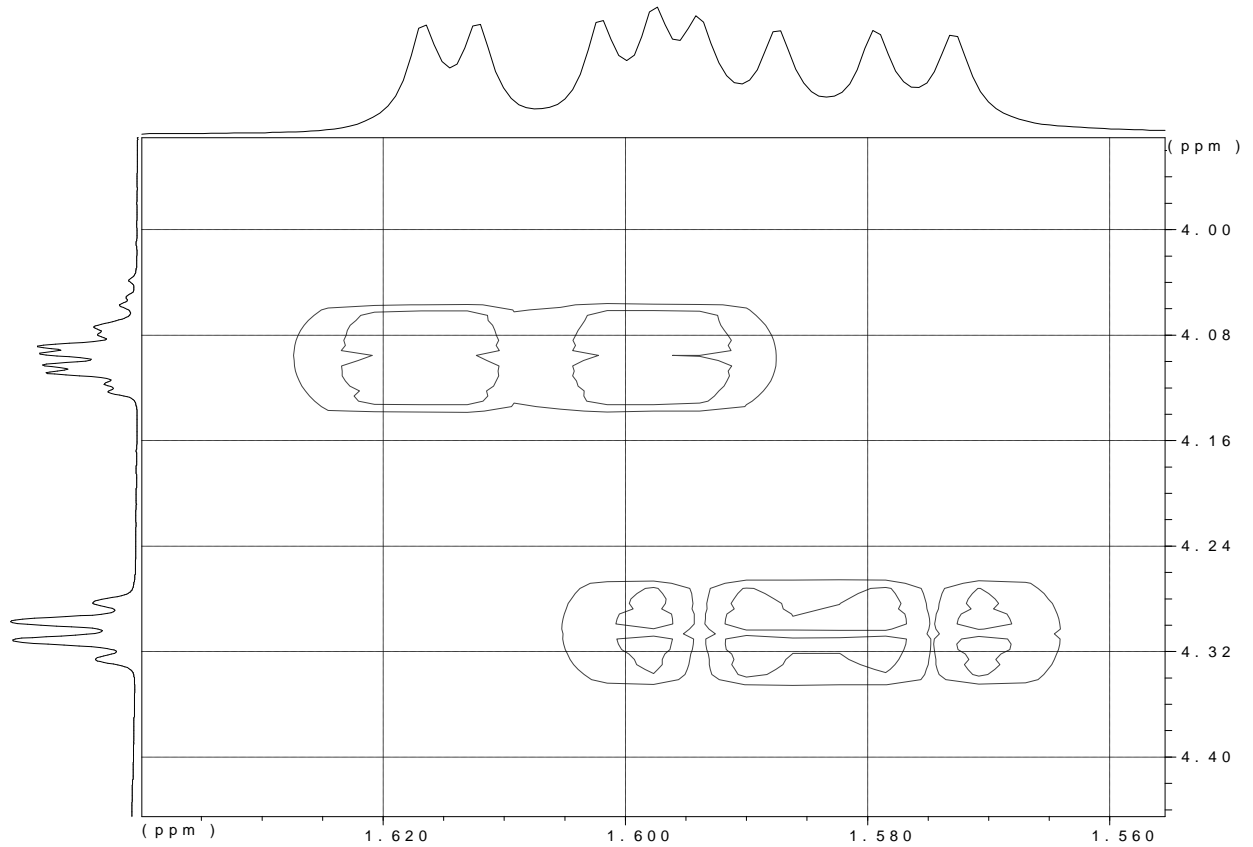


Abbildung 9-24: HH-COSY im Kopplungsbereich der Methyl- und Methinprotonen

In Folge der oben angeführten Überlegungen, führt eine Definition des Integrals der Methinprotonen mit jeweils 2H zu einem Wert für das Integral der Methylprotonen von 12H (vgl. Abbildung 9-25) und entsprechend 4 Methylgruppen.

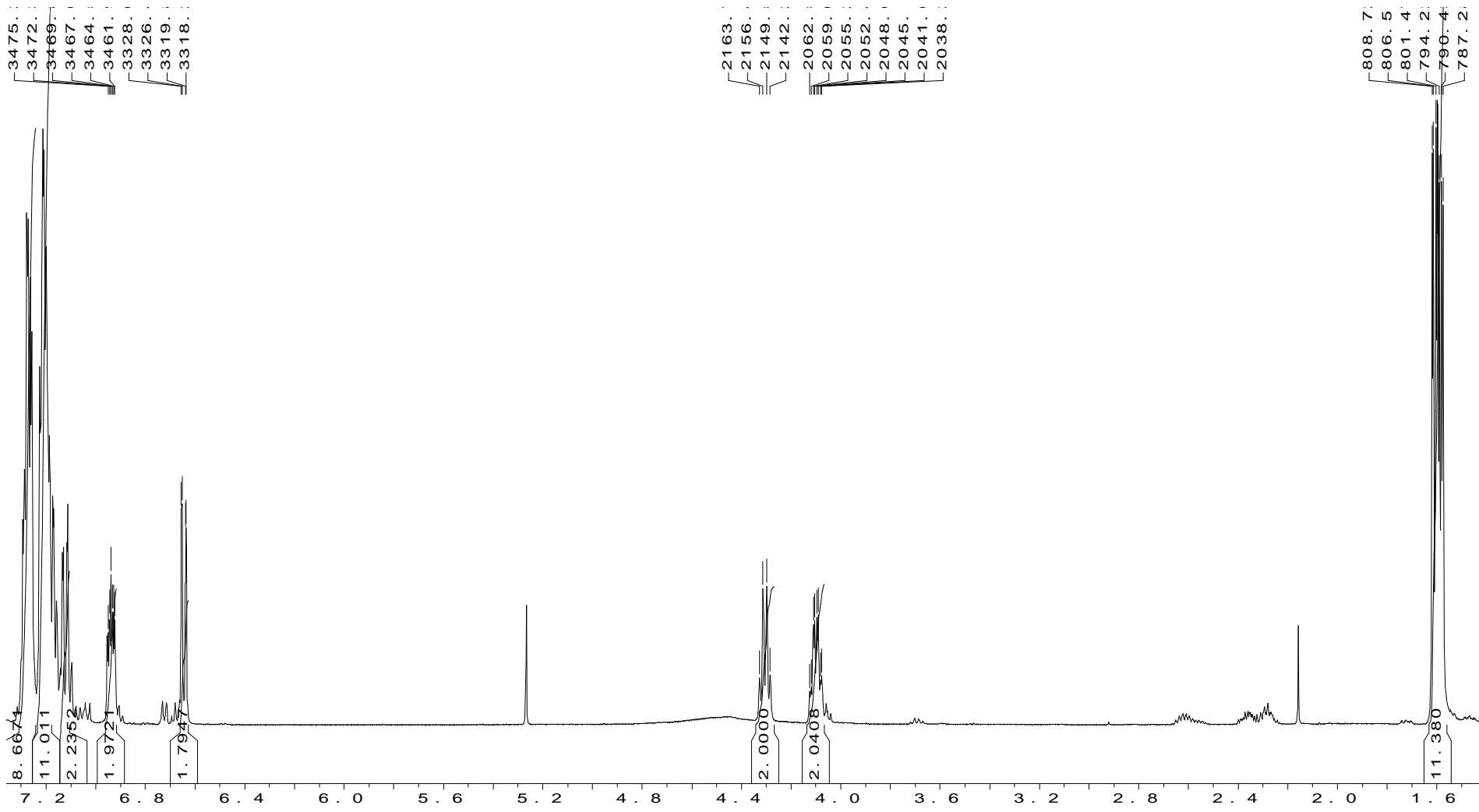


Abbildung 9-25: ¹H-NMR mit veränderten Integrationswerten für die Methinsignale

Dies läßt die oben aufgestellte die Hypothese, dass ein Diastereomeregemisch vorliegt, erhärten. In diesem Sinne ließen sich die gefundenen Aufspaltungsmuster derart interpretieren, dass es zwei Arten von Methinprotonen mit ähnlicher chemischer Verschiebung gibt. Die chemische Verschiebung für die Methinprotonen bei $\delta=4.30$ ppm wäre absolut identisch, die chemische Verschiebung der Methinprotonen bei $\delta=4.10$ ppm unterscheiden sich ein wenig. Dies also erklärt die beobachtete „Aufspaltung zu einem Dublett mit der Kopplungskonstanten von ${}^3J=2$ Hz“ des Methinsignals bei $\delta=4.10$ ppm, die als Überlagerung zweier Resonanzsignale interpretiert werden kann. Damit lässt sich das Korrelationsmuster im HH-COSY gut deuten, denn die Methinprotonen (2H) koppeln jeweils mit zwei Methylgruppen, so dass insgesamt mit 4 Methylgruppen zu rechnen ist.

Die Tabelle 9-5^a gibt die chemischen Verschiebungen für die Gruppen sowie deren Kopplungskonstanten wieder, wie sie sich aus der Interpretation der Resonanzsignale und Kopplungen ableiten.

Gruppe	Diastereomer 1 Chemische Verschiebung [ppm], (Kopplung [Hz])	Diastereomer 2 Chemische Verschiebung [ppm], (Kopplung [Hz])
Methylprotonen	CH ₃ : 1.61 dd (${}^3J=7.25$) CH ₃ : 1.59 dd (${}^3J=7.25$)	CH ₃ : 1.605 dd (${}^3J=7.25$) CH ₃ : 1.58 dd (${}^3J=7.25$)
Methinprotonen	H _a : 4.3 q (${}^3J=7.25, 6.93$) H _b : 4.1 q (${}^3J=7.25$)	H _a : 4.3 q (${}^3J=7.25$) H _b : 4.09 q (${}^3J=7.25$)
aromatische Protonen (Phenolring)	H ₃ : 6.94 m; H ₅ : 6.64 dd (${}^3J=8.8, {}^4J=2.2$) H ₆ : 7.12 dd (${}^3J=8.2, J=1.6$)	H ₃ : 6.88 m H ₅ : 6.59 dd (${}^3J=8.21, {}^4J=0.85$) H ₆ : 7.15 dd (${}^3J=6.89$)

Tabelle 9-5: Zuordnung der chemischen Verschiebungen und Kopplungen zu den Diastereomeren des *Friedel-Crafts*-Produkts

Unter Berücksichtigung des unbekanntes Reinheitsgrades des aufgereinigten Syntheseproduktes ist anzunehmen, dass die teilweise beobachtete Aufspaltung der Resonanzsignale sich aus der Überlagerung zweier sterisch ähnlicher Verbindungen ergibt. Diese Hypothese ließe sich durch Simulationsrechnungen isomerer Strukturen und Mischung der berechneten Spektren festigen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass der Strukturvorschlag (vgl. Abbildung 9-8) der bislang unbekanntes Verbindung aus den vorliegenden NMR-spektroskopischen Daten aus zwei Gründen nicht ohne Weiteres erhalten werden kann:

- Unter der Annahme es läge eine Reinsubstanz vor, läßt sich die Aufspaltung der Signale (z.B. Aufspaltung des Methinsignals bei 4.1 ppm, 8-Liniensignal der Methylprotonen) mit der vorgeschlagenen Struktur (Abbildung 9-8) nicht vereinen und
- das Kopplungsmuster im aromatischen Bereich erlaubt keine eindeutige Aussage zum Substitutionsmuster am Phenol und zur Verknüpfung einzelner Protonen mit dem jeweiligen Aromaten.

Nach weiteren Recherchen konnte schließlich eine kommerzielle Quelle für das 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol gefunden werden.

^a die hier angeführte Zuordnung der Signale zu einzelnen Gruppen dient nur der Veranschaulichung der angeführten Argumente und stellt keine definierte Relation einzelner Signale zum entsprechenden Diastereomer dar

Ein Vergleich der Massenspektren und der Retentionsindices der kommerziellen Standardreferenzsubstanz mit der unbekanntem Verbindung im Extrakt des Brunnenwassers sowie mit dem Syntheseprodukt der *Friedel-Crafts*-Alkylierung zeigt vollständige Übereinstimmung (vgl. Abbildung 9-27 bis 9-30). Die Tabelle 9-6 gibt die Retentionsindices wieder.

Substanz	Retentionsindex
Unbekannte Substanz im Extrakt	2437
<i>Friedel-Crafts</i> -Produkt (aufgereinigt)	2453
kommerzieller Standard	2466

Tabelle 9.6: Ermittelte Retentionsindices

Es zeigte sich, dass die zeitnah vermessenen Alkanraaster untereinander eine Abweichung von 30s aufwiesen, wobei die Abweichung im isothermen Arbeitsbereich sogar 45-58s betrug. Diese Abweichungen kommen durch veränderte Messbedingungen zustande, jedoch liegen die ermittelten Retentionsindices im Rahmen der Meßgenauigkeit.

BVV 473_600.JDX * /
 MaxE3 SumE4
 RI 22260 55621
 RI 25182 22983

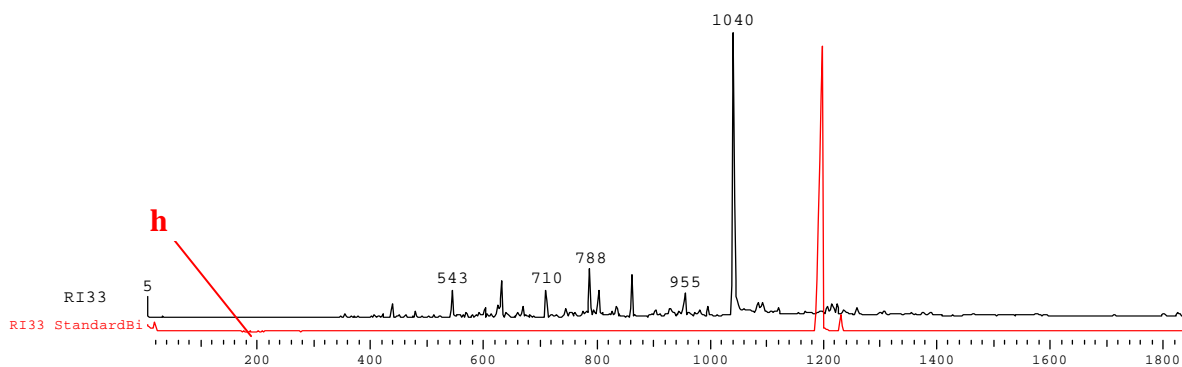


Abbildung 9-26: TIC der kommerziellen Referenzsubstanz (h) und des Extraktes der Brunnenwasserprobe

Spezieller Teil

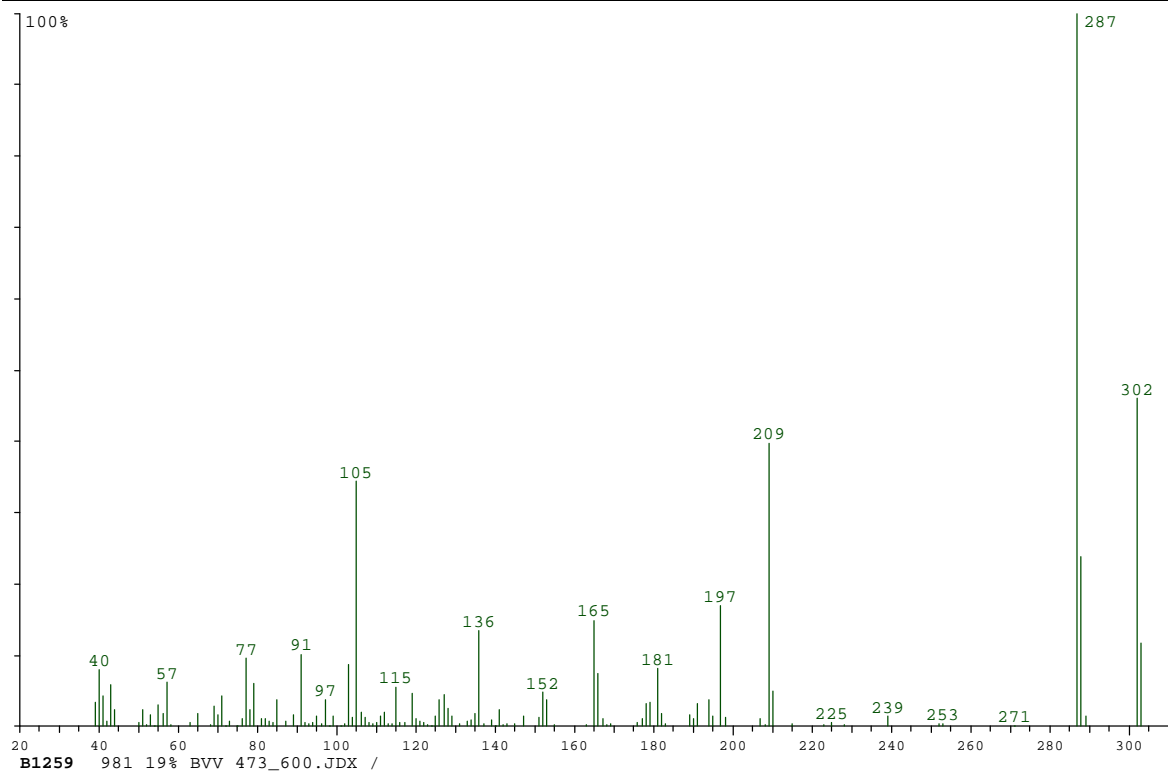


Abbildung 9-27: Massenspektrum der unbekannt Komponente im Extrakt der Brunnenwasserprobe

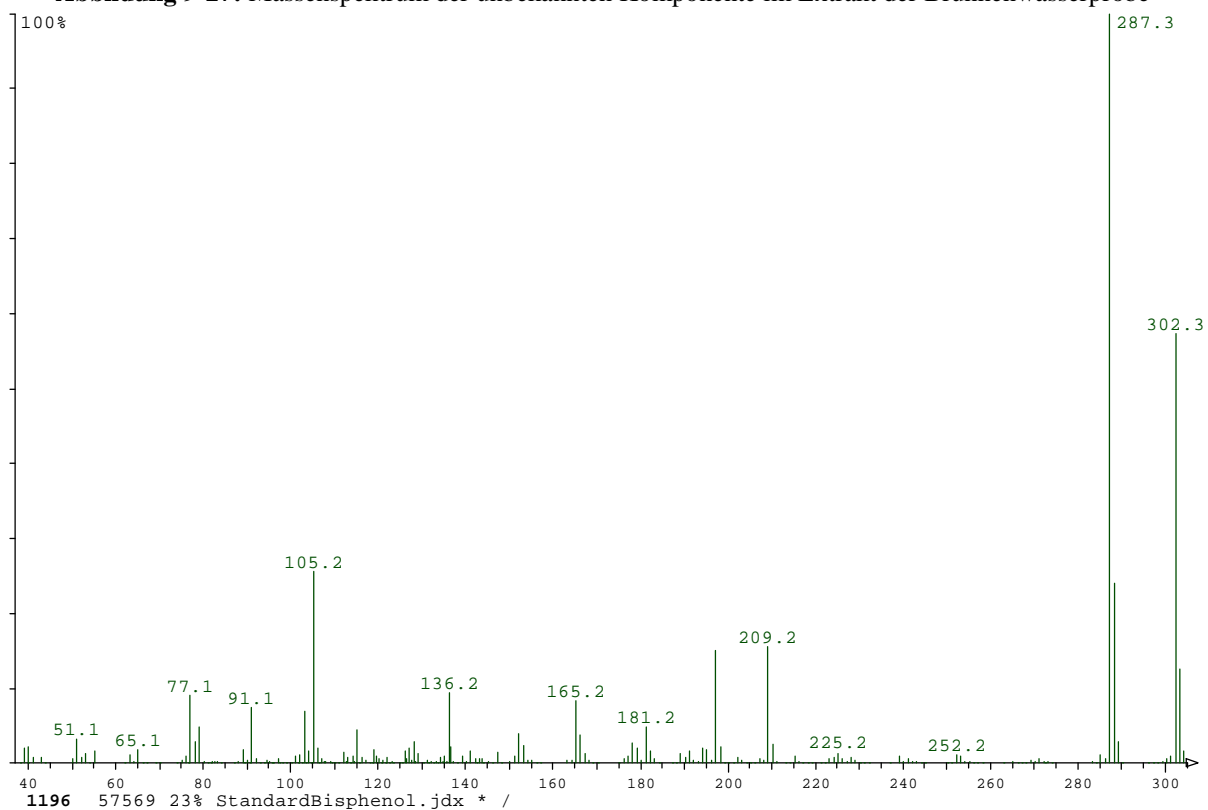


Abbildung 9-28: Massenspektrum der kommerziellen Standardreferenzsubstanz

Spezieller Teil

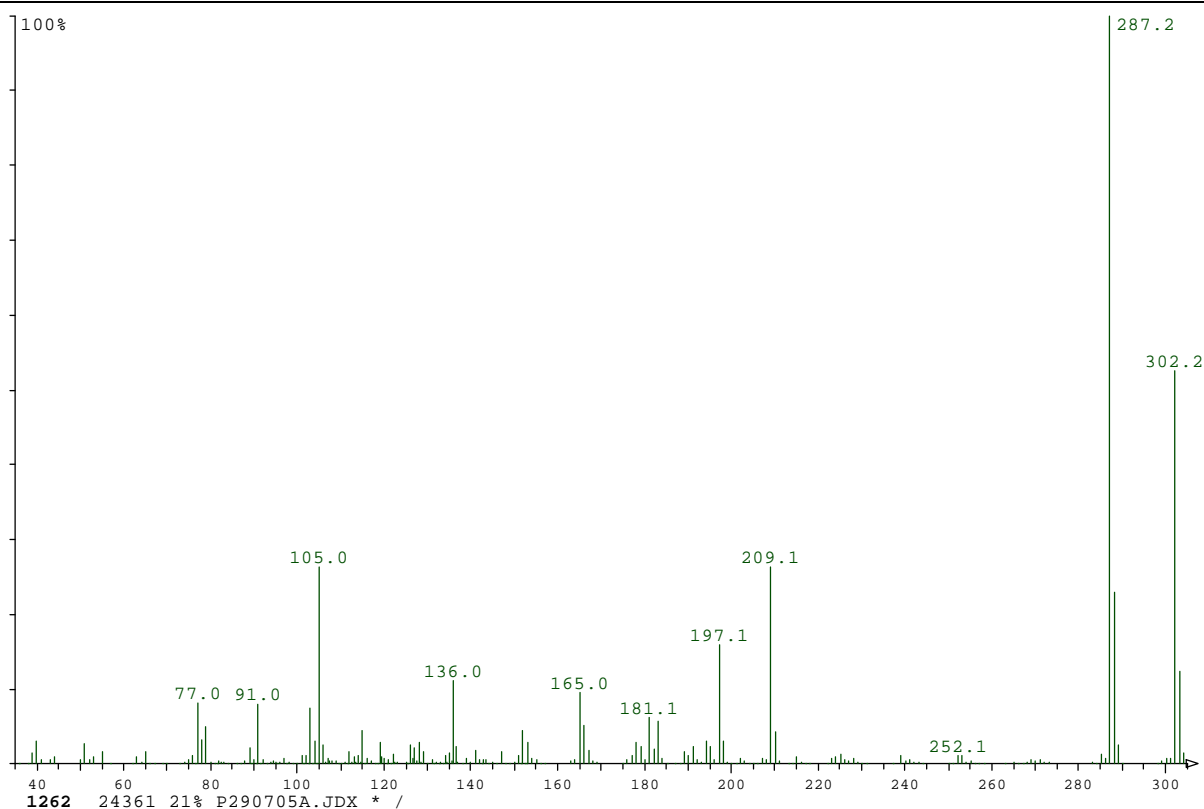


Abbildung 9-29: Massenspektrum des Syntheseproduktes aus der *Friedel-Crafts*-Alkylierung vor Reinigung

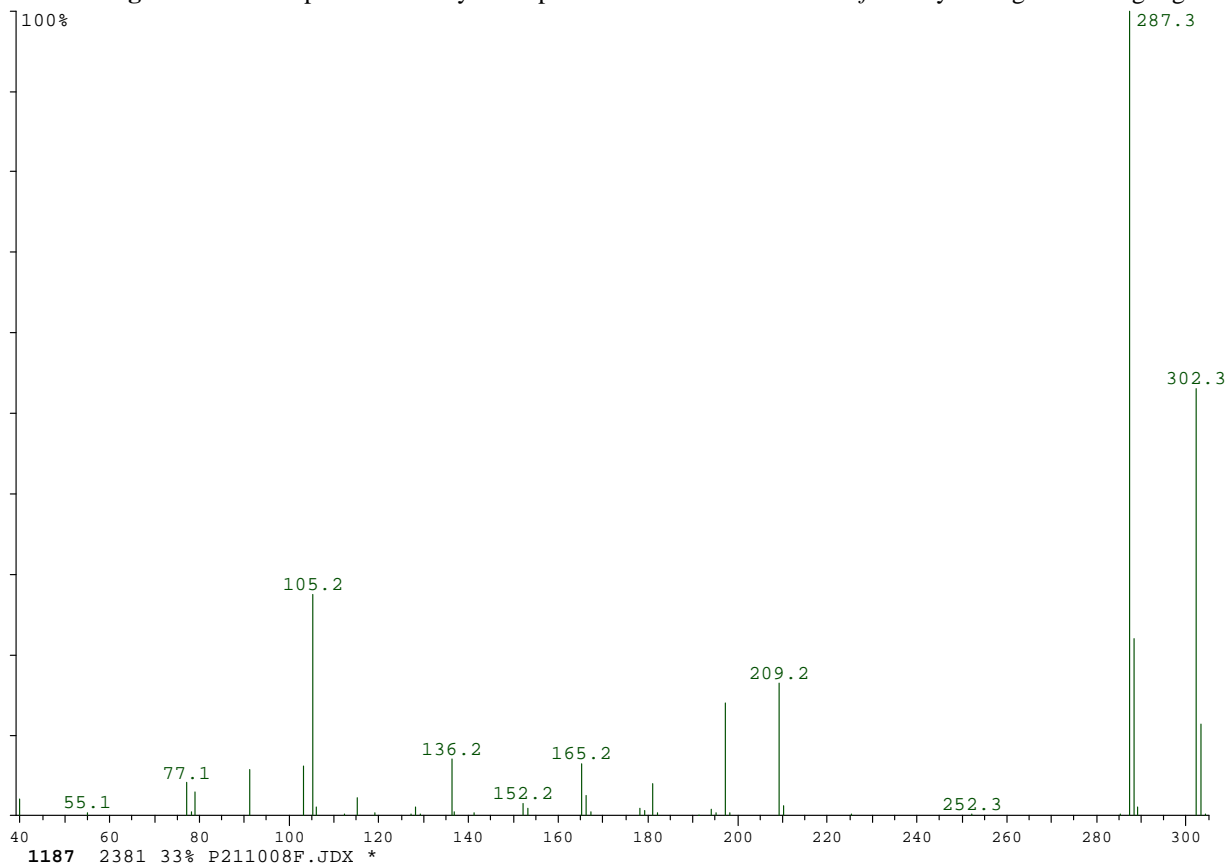


Abbildung 9-30: Massenspektrum des Syntheseproduktes aus der *Friedel-Crafts*-Alkylierung nach Reinigung

Vergleicht man die Intensitätsverhältnisse der Fragmentionen m/z 209 und 197 (Abbildung 9-27 bis 9-30) so fällt auf, dass sich die Intensitätsverhältnisse im Zuge der Reinigung des *Friedel-Crafts*-Produktes verändern und nach Reinigung eher der kommerziellen Standardreferenzsubstanz entsprechen. Im Brunnenextrakt zeigt sich ein ähnliches Intensitätsverhältnis wie in dem *Friedel-Crafts*-Produkt vor Reinigung.

Es kann angenommen werden, dass es sich hier um ein Diastereomergemisch handelt, das sich nach Reinigung des *Friedel-Crafts* Produkts in der Zusammensetzung verändert. Eine Auftrennung der kommerziellen Vergleichssubstanz und des aufgereinigten Produktes der *Friedel-Crafts*-Alkylierung mit langsamerer Heizrate im Temperaturprogramm als auch mit isothermer Arbeitsweise am Gaschromatographen zeigte jedoch keine Trennung.

Interessant zeigte sich der Vergleich des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums der kommerziellen Standardreferenzsubstanz (Abbildung 9-31) mit dem des Syntheseproduktes der *Friedel-Crafts*-Alkylierung. Die Kopplungsmuster sind nahezu identisch. Von besonderem Interesse ist dabei das Kopplungsmuster des aromatischen Protons bei $\delta=6.9$ ppm (vgl. Abbildung 9-32 sowie Abbildung 9-23, S.139).

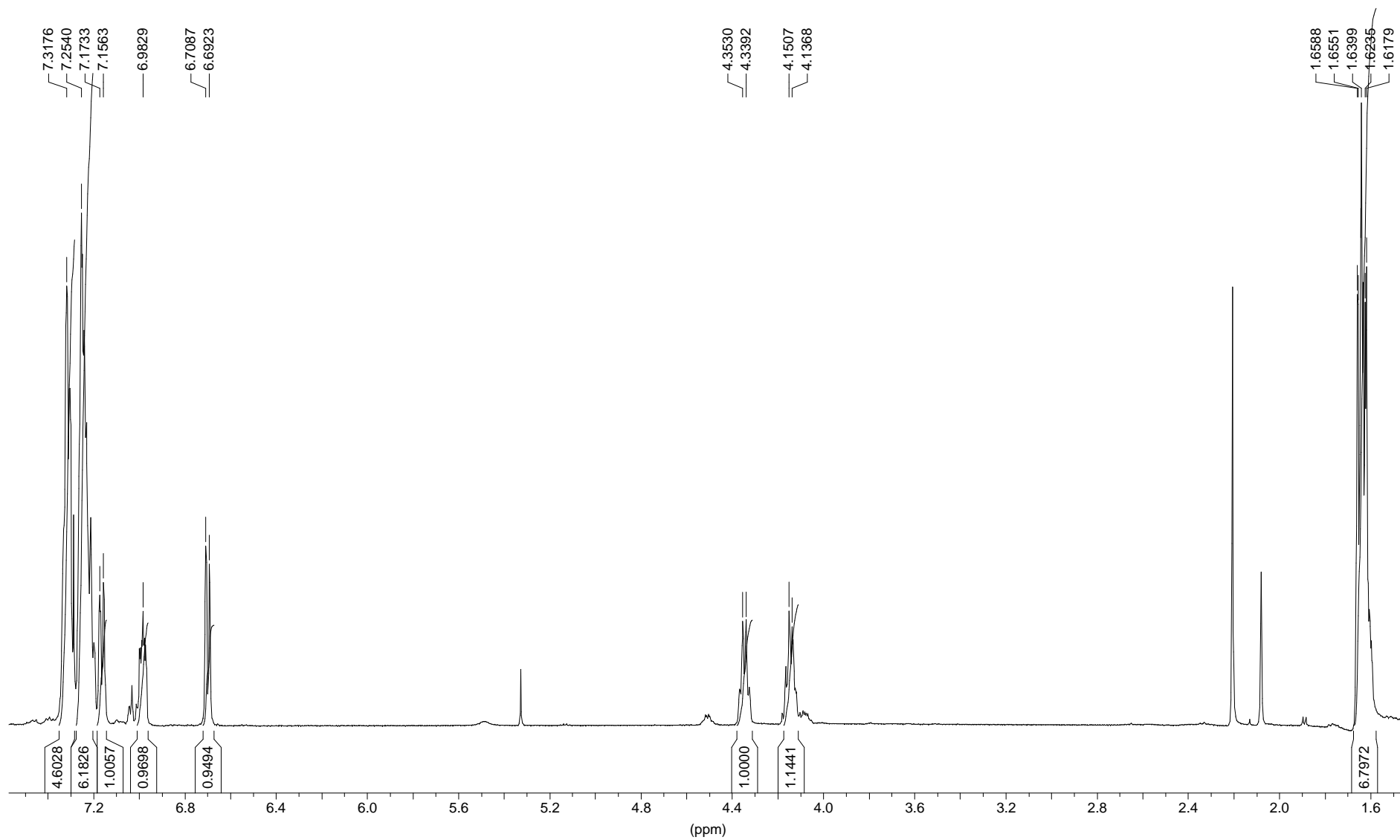


Abbildung 9-31: $^1\text{H-NMR}$ der kommerziellen Standardreferenzsubstanz

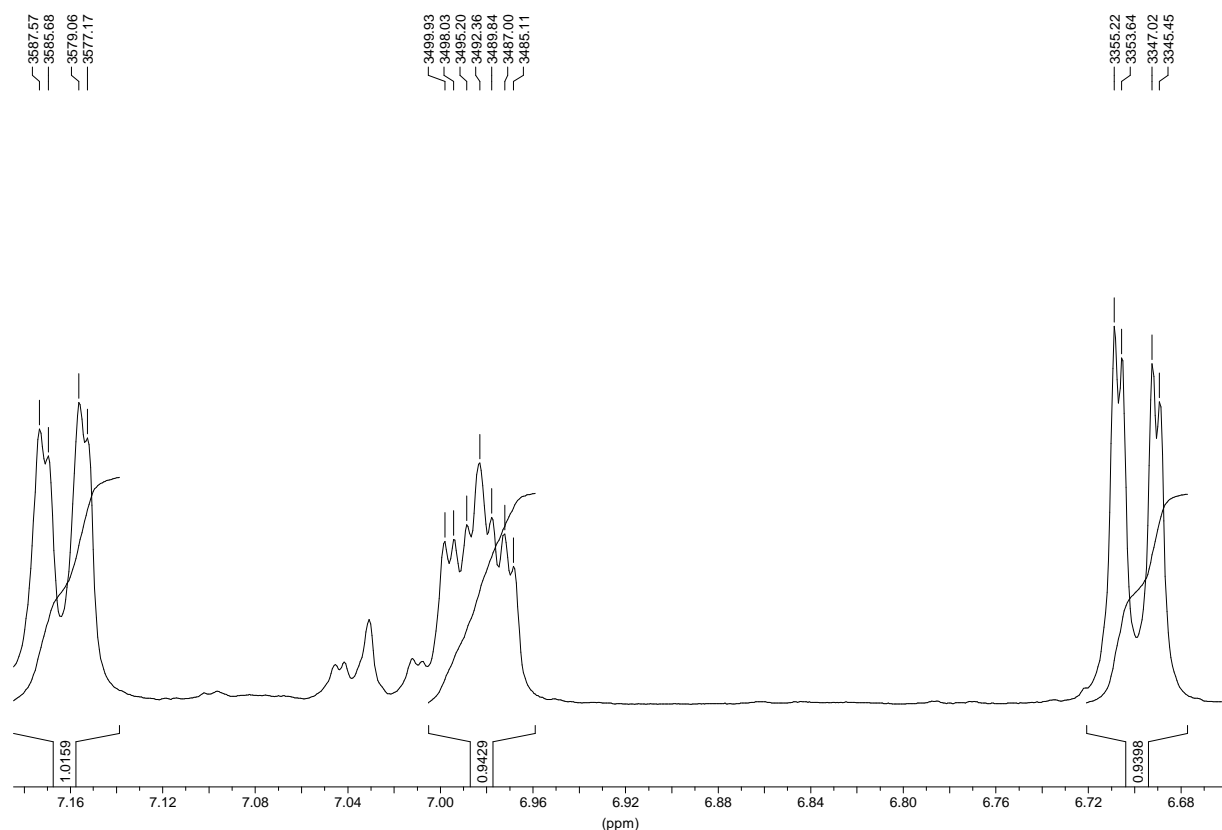


Abbildung 9-32: Verschiebungsbereich der aromatischen Protonen; vgl. Abbildung 9-23

Die beobachtete Aufspaltung des Signals bei $\delta=6.9$ ppm kann auf Grundlage der Strukturformel (vgl. Abbildung 9-8) derart interpretiert werden, dass das aromatische Proton H_3 sowohl einer 4J -Kopplung mit dem aromatischen Proton H_5 des Phenols als auch mit den Methinprotonen unterliegt (s. Abbildung 9-33).

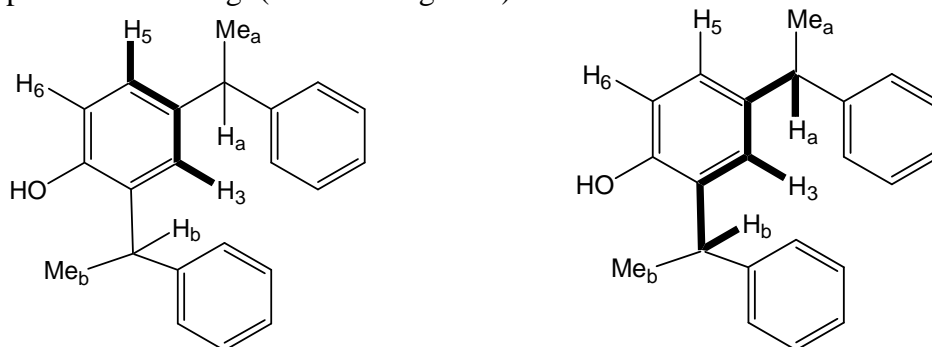


Abbildung 9-33: Mögliche Zuordnung der gefundenen Kopplungen für das Signal mit der chemischen Verschiebung von $\delta=6.9$ ppm

Aus dem Spektrum kann für H_3 - H_5 eine Kopplung von 1.9 Hz abgelesen werden. In Tabelle 9-7 sind die 1H -NMR Daten der Referenzsubstanz und des Syntheseprodukts aus der *Friedel-Crafts*-Alkylierung gegenübergestellt.

Spezieller Teil

Gruppe	<i>Friedel-Crafts</i> -Produkt Chemische Verschiebung [ppm], (Kopplung [Hz])	kommerz. Standardreferenzsubstanz Chemische Verschiebung [ppm], (Kopplung [Hz])
Methylprotonen	CH_3 : 1.61 dd ($^3J=7.25$) CH_3 : 1.59 dd ($^3J=7.25$)	CH_3 : 1.53 dd ($^3J=7.15$)
Methinprotonen	H_a : 4.3 q ($^3J=7.25, 6.93$) H_b : 4.1 q ($^3J=7.25$)	H_a : 4.24 q ($^3J=7.14$) H_b : 4.03 q ($^3J=7.25$)
Aromatische Protonen (Phenolring)	H_3 : 6.94 m; H_5 : 6.64 dd ($^3J=8.8, ^4J=2.2$) H_6 : 7.12 dd ($^3J=8.2, J=1.6$)	H_3 : 6.88 m H_5 : 6.59 dd ($^3J=8.21, ^4J=0.85$) H_6 : 7.15 dd ($^3J=6.89$)

Tabelle 9-7: Vergleich der NMR-Daten des Syntheseproduktes mit der kommerziellen Standardreferenzsubstanz. Bezeichnung der Protonen entsprechend Abbildung 9-34

Stereochemie des 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenols

Aufgrund der asymmetrischen Substitution am Phenol des 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenols, lassen sich vier Stereoisomere formulieren. Mit Bezug auf die angeführte Problematik der eindeutigen Zuordnung der Resonanzsignale im ^1H -NMR und der Kopplungen ist eine Aussage zur genauen Stereochemie nicht möglich.

2,6-Isomer des 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenols im Extrakt

Wie die Ionenspektren des GC/MS des Extraktes (s. Abbildung 9-7) zeigen, waren noch Substanzen mit ähnlichem Fragmentierungsmuster enthalten (Scan 1215 bzw. 1223), bei denen es sich um Isomere des Phenols in Abbildung 9-8 handeln muß. Vergleicht man die Massenspektren der Substanzen der Scannummern 1215, 1223 und 1259, so fällt auf zunächst das ähnliche Fragmentierungsmuster auf. Die Massenspektren der Scannummern 1215 und 1223 weisen zusätzlich die Fragmentationen m/z 223 und 224 auf (vgl. Abbildung 9-34). Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um Isomere des 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenols (Scan-Nr 1259) handelt.

Spezieller Teil

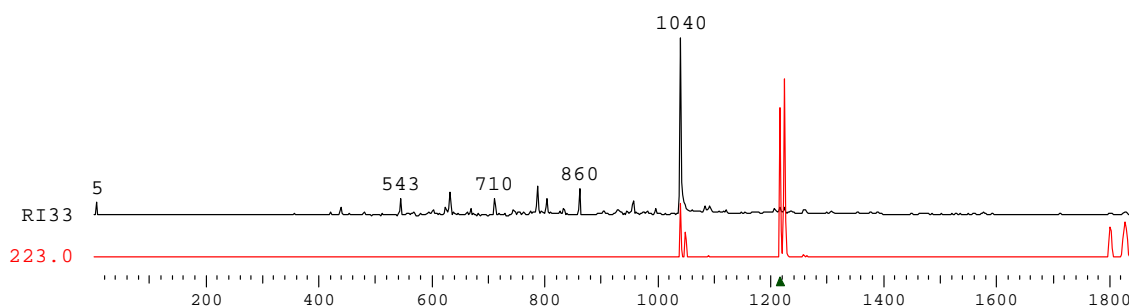
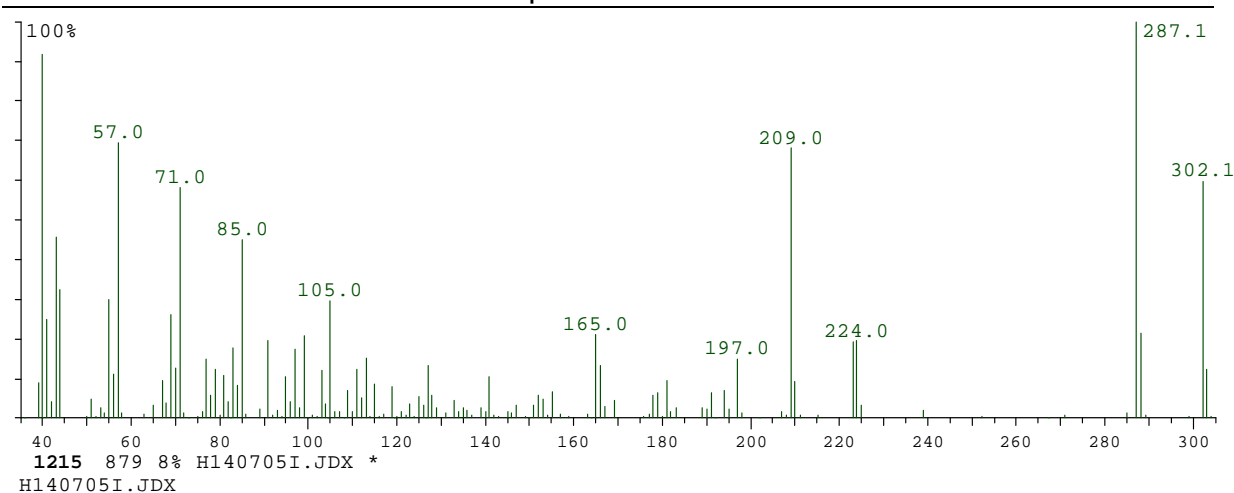


Abbildung 9-34: Massenspektrum und Ionenspur der Masse m/z 223 des 2,6-Isomers von 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol (Scan 1223)

Das Fragmentation der Masse m/z 223 kann so gedeutet werden, dass - unter Annahme einer di-ortho-Substitution des Bis(1-phenylethyl)phenols - dieses aus dem Molekölion durch Abspaltung von m/z 78 Massen entsteht.

Aufgrund der GC-Trennung ist also davon auszugehen, dass die Substanzen der Scannummern 1215 und 1223 Diastereomere darstellen (vgl. Abbildung 9-8). Das 2,4- und 2,6-Isomer dieses Phenols wurde als Bestandteil in *Zanthoxylum integrifoliolum* beschrieben und im 2,6-Isomer das Fragmentionen m/z 223 beobachtet.^[109]

Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass die Substitution einen wesentlichen Einfluß auf die Absorptionenthalpie an der stationären Phase der GC-Säule hat und es nur im Falle des 2,6-Isomers zu einer Trennung kommt. Ähnliche Effekte sind für die GC-Trennung des m- und p- Isomers des Xylols beschrieben worden.^[110]

9.1.7. Nachweis der östrogen Wirkung von 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol im Östradiol-Verdrängungsassay

Nach Reinigung des Syntheseproduktes wurde dieses in einer Verdünnungsreihe im Östradiol-Verdrängungsassay auf dessen Bindungsaffinität zu den jeweiligen Östrogenrezeptoren untersucht.

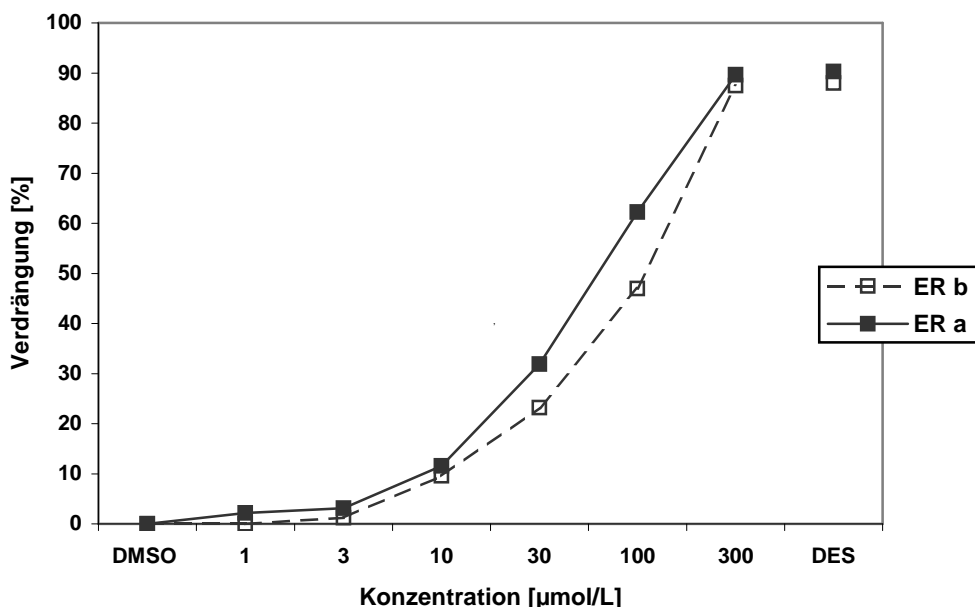


Abbildung 9-35: D/W-Kurve für 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol im Östradiol-Verdrängungsassay mit ERβ und ERα

Wie aus der D/W-Kurve ersichtlich ist, kann eine 50%-ige Verdrängung noch bis zu einer Konzentration von 100 μmol/L gefunden werden. Außerdem ist ersichtlich, dass die Verdrängung an den beiden Östrogenrezeptoren sich nur unwesentlich unterscheidet. Der ED₅₀-Wert des 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenols ist gegenüber dem des 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenols („4-tert.-Octylphenols“) höher^a, entsprechend ist die Verdrängung weniger stark ausgeprägt (vgl. Abbildung 9-60).

9.2. Sedimentproben der Mulde

9.2.1. Toxizität und Mutagenität in Bakterien (Ara-/Ames-Test)

Die Sedimentextrakte wurden sowohl mit als auch ohne metabolische Aktivierung durch S9 im Bakterientoxizitätstest auf Zytotoxizität untersucht. Da sich jedoch nach metabolischer Aktivierung keinerlei Effekte zeigten, wird hier auf die Darstellung der D/W-Kurven verzichtet. Insgesamt aber zeigte sich in allen Sedimentextrakten, dass die Toxizität ohne S9-Aktivierung höher war, was wohl so zu interpretieren ist, dass Proteine des Rattenleberhomogenats (S9-Mix) die lipophilen Xenobiotika binden und damit diesen den Zugang zur Bakterienzelle erschweren.

In den bakteriellen Zytotoxizitätstests wurden bei/bis zu 100 mg Trockenmasse-Äquivalenten keine toxischen Effekte beobachtet und dieser Bereich dann für die Ara-Tests zugrunde gelegt.

^a Zur Reinheit des im Test eingesetzten 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenols: vgl. Abbildung 9-57, S.188

Insgesamt waren im Ara-Test nur drei Sedimentproben mutagen wirksam (S031, S032 und S035), von denen nur die Proben S031 und S032 im Folgenden stellvertretend diskutiert werden sollen, da sich im Hexan/Aceton-Extrakt für Probe S035 keine Effekte zeigten (vgl. Abbildung 9-36 und 9-37).

Die Induktionsraten der Hexan/Aceton-Extrakte der Proben S031 bzw. S032 lagen zwar nur geringfügig über dem Wert der Positivkontrolle (2.35 bzw. 3.46 bezogen auf jeweils 100 mg Trockenmasse), lieferten aber einen ersten Hinweis für das Vorhandensein potenziell mutagener Inhaltsstoffe in den entsprechenden Sedimenten. Die mutagenen Effekte zeigten sich aber meistens erst kurz unterhalb der toxischen Konzentrationsschwelle. Erste Mutageneseuntersuchungen der Ethylacetat-Extrakte ergaben gegenüber den Hexan/Aceton-Extrakten eine weitaus höhere Mutagenität (vgl. Abbildung 9-37).

9.2.2. Vergleich der Aceton/Hexan-Extrakte mit Ethylacetat-Extrakten im Ara-Test

Zunächst wurden die Sedimentextrakte im Rahmen eines Screenings in höheren Dosen auf deren mutagene Wirkung im Ara-Test untersucht. Im Anschluss wurden detaillierte D/W-Kurven erstellt.

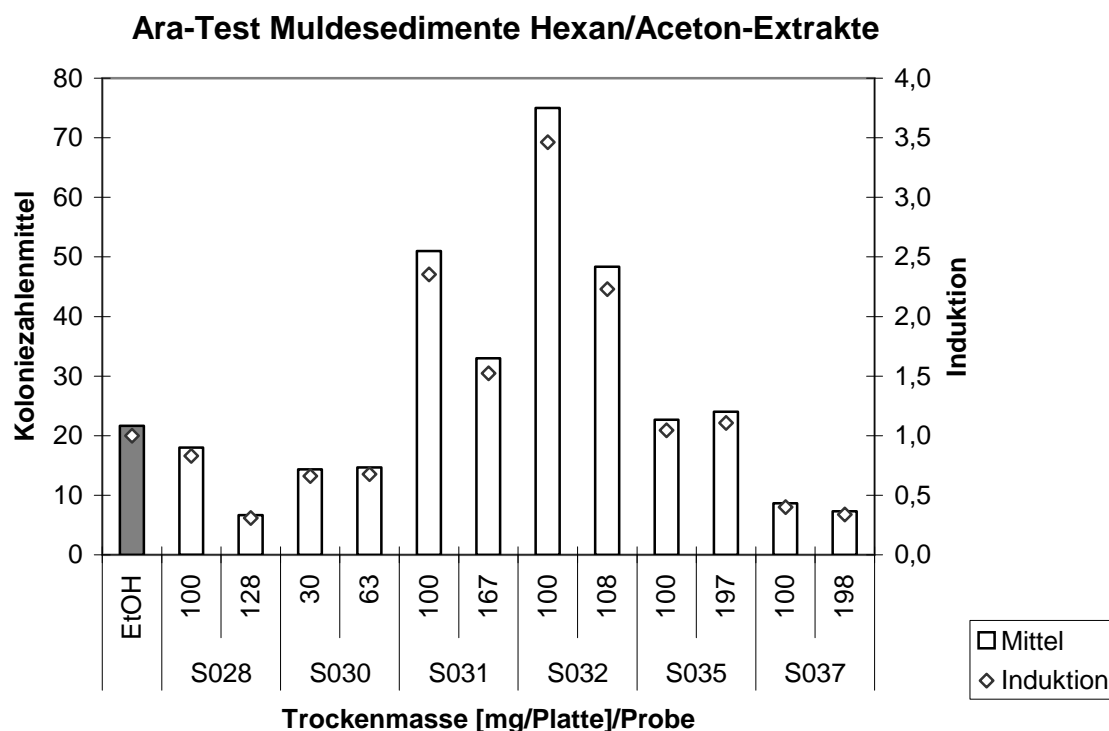


Abbildung 9-36: Überblick zu den Mutagenitäten der Hexan/Aceton-Extrakte

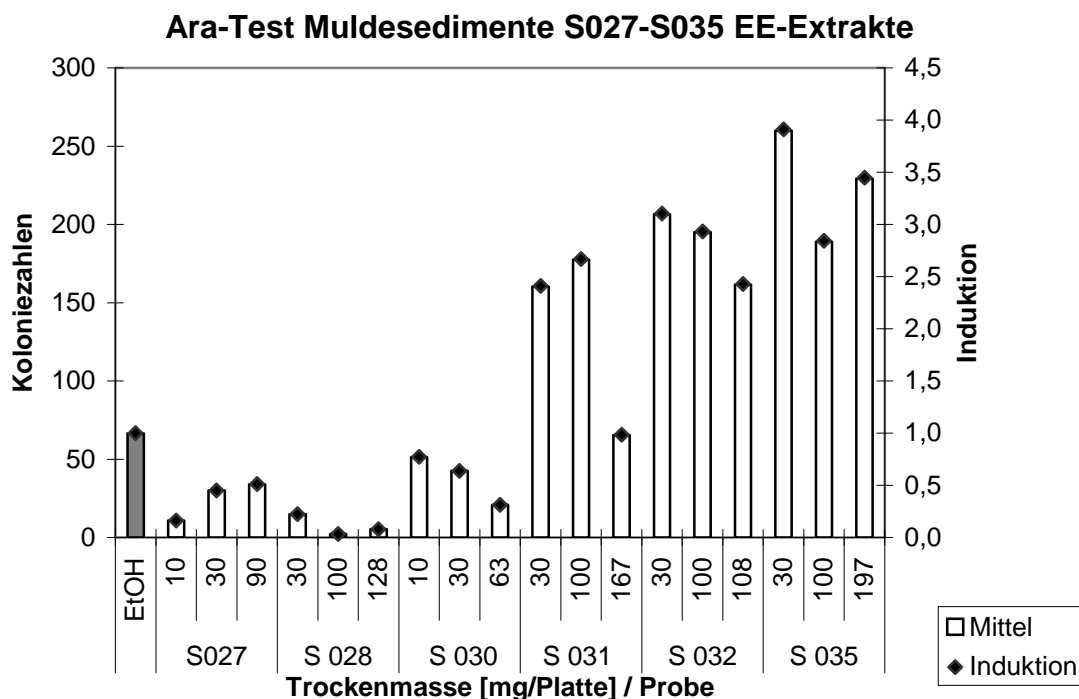


Abbildung 9-37: Überblick über die Mutagenitäten der Ethylacetat-Extrakte
 Die Abbildung 9-36 und 9-37 geben zu erkennen, dass insbesondere die Proben S031, S032 und S035 durch recht hohe Induktionsraten gegenüber den übrigen Sedimentextrakten hervortreten und deshalb von Interesse waren. Für diese Extrakte wurden die D/W-Kurven um weitere Messungen im unteren Wirkungsbereich ergänzt, um so ein vollständiges Gesamtbild der Sedimentextrakte zu gewinnen (Abbildung 9-38).

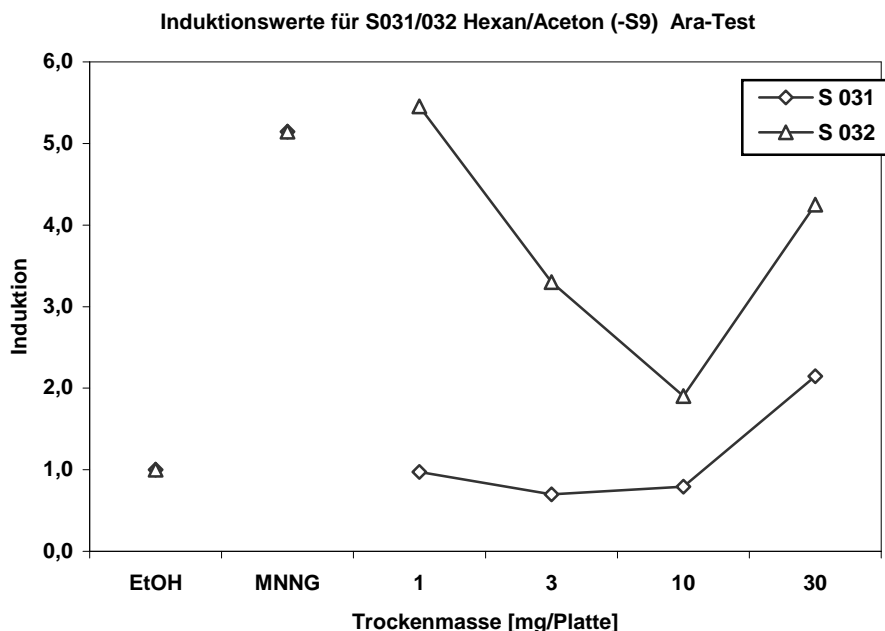


Abbildung 9-38: D/W-Kurven der Hexan/Aceton-Extrakte des Ara-Tests; MNNG: N-Methyl-N'-nitronitroso guanidin

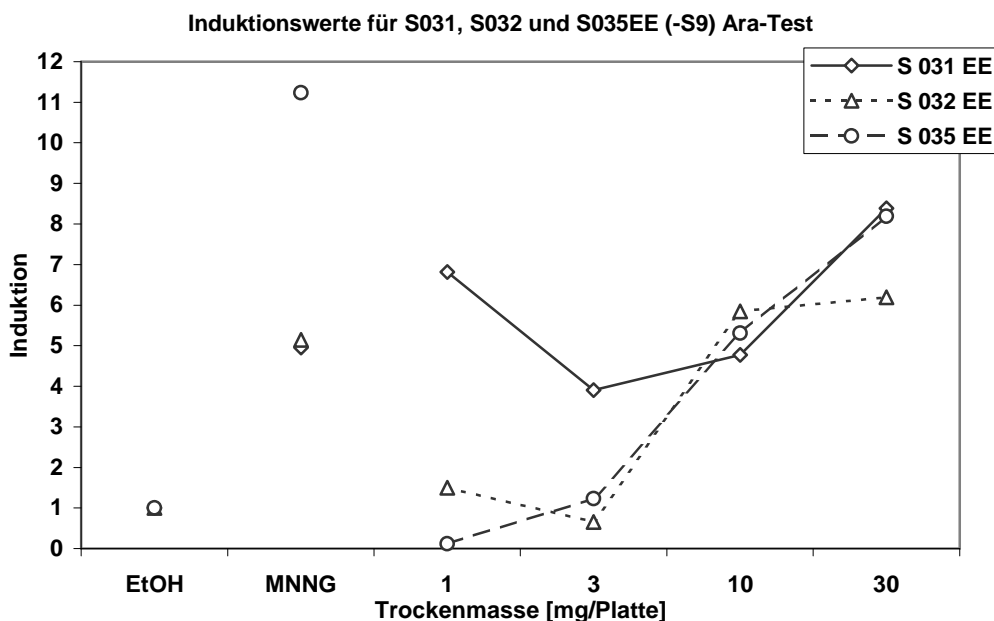


Abbildung 9-38: D/W-Kurven der Ethylacetat-Extrakte des Ara-Tests; MNNG: N-Methyl-N'-nitronitrosoguanidin

Die Hexan/Aceton bzw. Ethylacetat-Extrakte zeigten deutliche Unterschiede in den Induktionswerten, wie die D/W-Kurven der Sedimentextrakte in der Abbildung 9-38 wiedergeben. Der ungleichmäßige Kurvenverlauf der D/W-Kurven weist an unterschiedlichen Stellen auf Ausreißer (ausgefüllte Messpunkte) innerhalb der Meßreihe hin, die im Dean-Dixon-Test genauer untersucht wurden.

Vorraussetzung für die Anwendung des Dean-Dixon-Test ist die Normalverteilung der Daten nach Gauß. Der Test ist vor allem für kleine Stichprobenumfänge anwendbar.^[111,112] Zur Analyse des interessierenden Wertes wird eine Prüfgröße nach der Gleichung 3 berechnet:

$$Q = \frac{|x_1 - x_2|}{|x_1 - x_n|}$$

Wahrscheinlichkeiten für N=4 P(95%, N=4) = 0.77, P(99%, N=4)=0.89

Gleichung 3: Prüfwert nach dem Dixon-Test mit x_1 Wert, der zu prüfen ist, x_2 Wert der dem Prüfwert in der geordneten Messreihe benachbart ist, x_n Wert am Ende der Meßreihe

Der nach Gleichung 3 ermittelte Prüfwert aus den Daten der Induktion (0.51) für die Probe S032 (vgl. Abbildung 9-38, obere Kurve) wird unter Annahme einer definierten Wahrscheinlichkeit mit tabellierten Prüfwerten verglichen.^[112] Die Untersuchung des Induktionswerts der Probe S032 (bei 30 mg) auf mit dem Dixon-Test bei einer Wahrscheinlichkeit von $p=99\%$ ergab eine signifikante Abweichung. Ein ähnliches Resultat wurde nach Anwendung des Dixon-Tests auch für den Messpunkt 3mg der Probe S031 (vgl. Abbildung 9-38, unten) gefunden.

Eine Interpretation dieser Abweichungen ist nicht ohne weiteres möglich, da bei Untersuchungen zur Mutagenese an Bakterien häufiger Schwankungen auftreten können, wobei die Ausprägung vom Umfang der Wiederholungen abhängt als auch von der Statistik des Mutageneseprozesses. Biologische Systeme sind in der Hinsicht wesentlich schwieriger zu handhaben als ein physikalischer Meßprozeß, bei dem man systematisch die Fehlerquellen und deren Einfluß auf das Messergebnis untersuchen kann.

Diese Abweichungen für die mutagenen Sedimentextrakte werden eingehend in Kapitel 11.3. diskutiert. Diese Sedimentextrakte stehen dann im Mittelpunkt der weiteren Diskussion, insbesondere hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung sowie den weiteren toxikologischen Untersuchungen zur Mutagenität und östrogenen Wirkung.

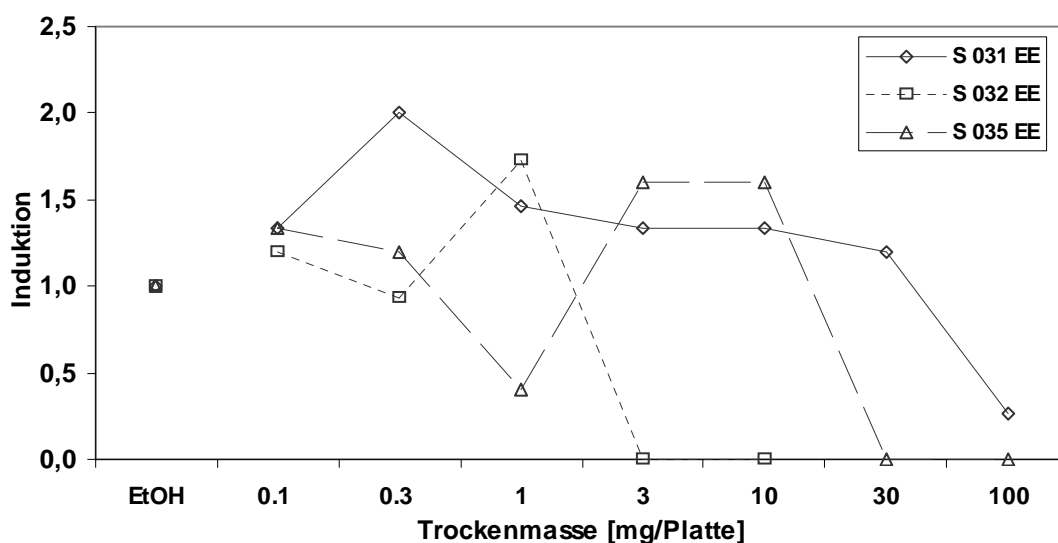
9.2.3. Vergleich der Resultate aus Ara- und Ames-Test

Zusätzlich wurden die im Ara-Test mutagenen Sedimentextrakte mit den Stämmen *S. typhimurium* TA 98 und TA 100 des Ames-Tests unter vergleichbaren Testbedingungen des Ara-Tests, d.h. also ohne metabolische Aktivierung und bei gleichen Dosen, getestet. Für die Diskussion der Unterschiede zur Mutagenität (vgl. Kapitel 11.3.) zwischen dem Ames- und dem Ara-Test sind die Ethylacetat-Extrakte (vgl. Abbildung 9-39) von besonderem Interesse, da diese im Ara-Test stark mutagen wirkten.

Die Unterschiede der Hexan/Aceton-Extrakte (vgl. Abbildung 9-40) in beiden Testsystemen wurde ebenfalls untersucht. Es werden im desweiteren Ausschnitte der D/W-Kurven gezeigt und die Positivkontrollen ausgespart, so dass die Effekte deutlicher in Erscheinung treten.

TA 98:

Induktionen S 031, S 032 und S 035 EE in TA 98 (-S9)



TA 100

Induktionen S 031, S 032 und S 035 EE in TA 100 (-S9)

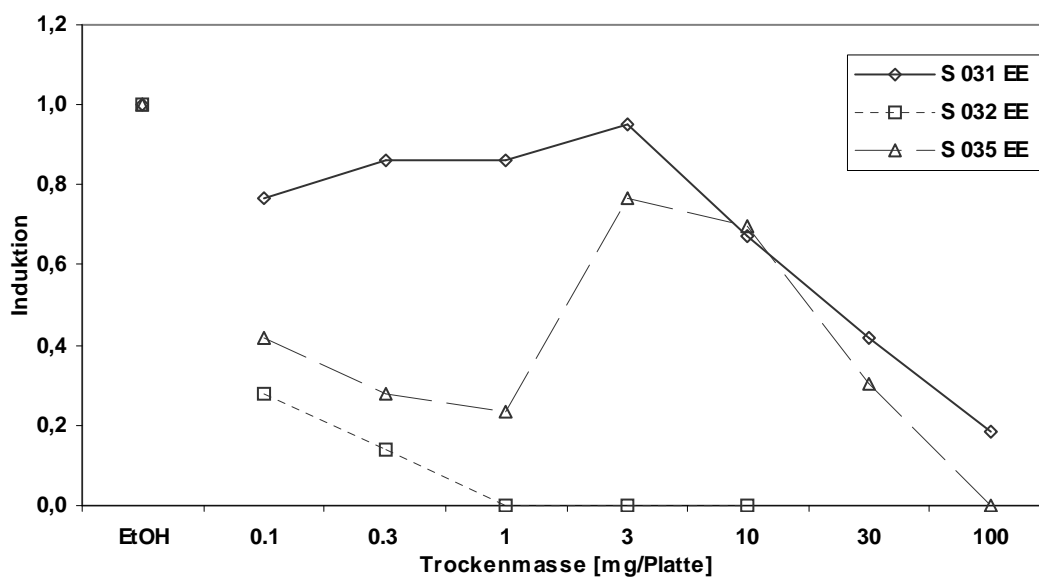


Abbildung 9-39: Induktionswerte für S031, 032 und 035 EE in TA 98 (o.) /100 (u.) (-S9)

Auch bei diesen D/W-Kurven zeigt sich ein auffälliger, eher ungleichmäßiger Verlauf über den Dosisbereich. Dies ist wie oben ausgeführt, auf die Eigenart biologischer Testsysteme zurückzuführen, stärkeren Schwankungen zu unterliegen als dies bei physikalischen der Fall ist (vgl. Diskussion).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Ara-Tests, zeigen die D/W-Kurven des Ames-Tests für die mutagenen Ethylacetat-Extrakte meist einen raschen Anstieg der Toxizität in Abhängigkeit von der zugesetzten Sedimenttrockenmasse. Im selben Konzentrationsbereich wurde im Ara-Test ein stark mutagener Effekt gefunden. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass der Arabinoseresistenz-Test wegen der größeren „Angriffsfläche“ des Zielgens empfindlicher auf mutage Effekte reagiert, als der Ames-Test, bei dem das Ziel des mutagenen Angriffs aus nur einem Basenpaar besteht. Ein Vergleich der Ergebnisse beider Ames-Stämme zeigt zudem noch, dass die Probe S031 in beiden Fällen eine dosisabhängige Zytotoxizität zeigt.

Für die D/W-Kurve der Probe S032 wurde eine rasche Abnahme der Koloniezahl in Abhängigkeit von der Sedimenttrockenmasse ermittelt, entsprechend einer starken, vorherrschenden Toxizität der Inhaltsstoffe für die Salmonella-Stämme.

Ein etwas anderes Bild zeigen dagegen die entsprechenden D/W-Kurven (vgl. Abbildung 9-40) der Hexan/Aceton-Extrakte mit den Ames-Stämmen TA 98/100 ohne S9. Hier präsentieren sich die zytotoxischen Effekte in schwächer ausgeprägter Form. Mitunter sind sogar schwach mutagene Effekte auffindbar.

Im Fall des Extraktes S032 (H/A), TA 100 (vgl. Abbildung 9-41) darf von einem Extremwert (bei 10 mg Trockenmasse) ausgegangen werden, da die Wirkungskurve über den gesamten Dosisbereich tendenziell auf eine Zytotoxizität des Extraktes hinweist.

TA 98:

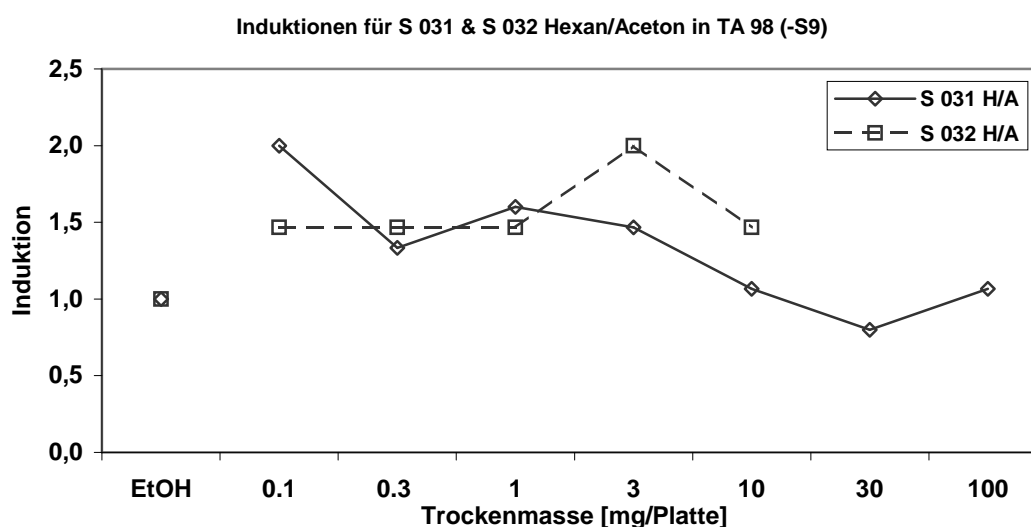


Abbildung 9-40: Induktion der Hexan/Aceton-Extrakte S031 und S032 in TA 98

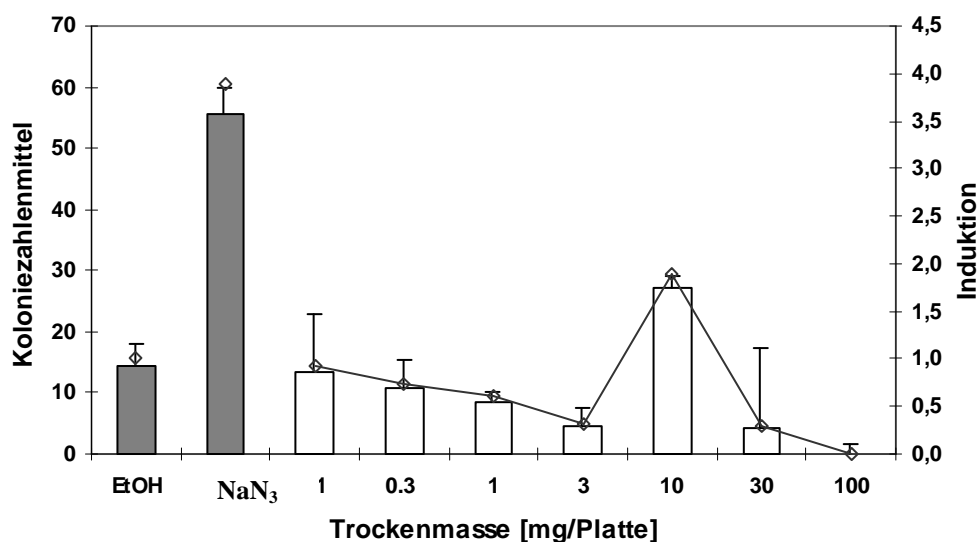
TA 100:**Ames-Test mit TA 100(-S9) - S032 Hexan/Aceton**

Abbildung 9-41: Induktion der Hexan/Aceton-Extraktes S032 in TA 100; NaN₃: Natriumazid

Aus dem Vergleich der D/W-Kurven für die Hexan/Aceton-Extrakte und den Ethylacetat-Extrakten im Ames-Test geht deutlich die geringere Zytotoxizität der Hexan/Aceton-Extrakte hervor. Darüber hinaus zeigt sich, dass die Toxizitäten auch von den verwendeten Stämmen abhängig sind. Überwiegend beobachtet man deutlich stärker toxische Effekte im Stamm TA 98 für die Ethylacetat-Extrakte.

9.2.4. Chemische Zusammensetzung mutagener Fraktionen

Die im Ara-Test mutagenen Sedimentextrakte (vgl. Abbildung 9-38, S. 153), wurden mittels GPC fraktioniert. Die gewonnenen Fraktionen wurden erneut im Ara-Test untersucht und deren Zusammensetzung qualitativ mittels GC/MS ermittelt. Die im Ara-Test ermittelte Mutagenität der erhaltenen Fraktionen sollte mit der qualitativen Zusammensetzung korreliert werden, um Mutagene zu identifizieren. Die Unterschiede der Mutagenität der Ethylacetat- und Hexan/Aceton-Extrakte sollten ebenfalls aus der chemischen Zusammensetzung interpretiert werden.

Prinzipiell bestand jedoch das Problem, dass eine Abnahme der mutagenen Wirkung nach Fraktionierung eintrat und sich diese Effekte nicht eindeutig auf eine Verbindungsklasse zurückführen ließen. Dies hing u.a. damit zusammen, dass die Fraktionen ebenfalls komplexe Gemische darstellten und dass klassisch mutagene Komponenten nicht nachweisbar waren. Es lassen sich somit nur Angaben zur chemischen Zusammensetzung der mutagenen Extrakte machen.^[39,82]

Die nach Fraktionierung erhaltenen D/W-Kurven der Gesamtextrakte S031 bzw. S 032 sowie die Ergebnisse aus den GC/MS Messungen der Fraktionen sollen im Folgenden präsentiert werden. Wie sich aus dem qualitativen Vergleich der GC/MS Untersuchungen ergab, unterschieden sich die Proben in der chemischen Zusammensetzung nicht wesentlich. Exemplarisch wird im Folgenden auf die Fraktionen des Sedimentextraktes S032 eingegangen. Zudem konnte in diesem Extrakt die an den Östrogenrezeptoren bindende Komponente eindeutig nachgewiesen werden, wie sich dies aus Experimenten mit dem Östradiol-Verdrängungsassay an der Referenzsubstanz zeigte.

9.2.5. Mutagenität der Fraktionen der Hexan/Aceton-Extrakte S031 und S032

Aus der D/W-Kurve der GPC-Fractionen (vgl. Abbildung 9-42) geht hervor, dass im untersuchten Dosisbereich gegenüber dem Gesamtextrakt (vgl. Abbildung 9-38, S. 153) nur schwach mutagene Effekte bzw. kaum Mutagenität mehr nachzuweisen war. Teilweise zeigten sich sogar in den untersuchten Dosisbereichen starke zytotoxische Effekte (vgl. Abbildung 9-43). In Abbildung 9-45, S. 163 ist das Totalionenstrom-Chromatogramm der GPC-Hauptfraktion wiedergegeben, das zeigt, dass die Fraktion hauptsächlich aus langkettigen, aliphatischen Verbindungen zusammengesetzt ist.

Induktion d. GPC Fraktionen S031 Hexan/Aceton Ara-Test (-S9)

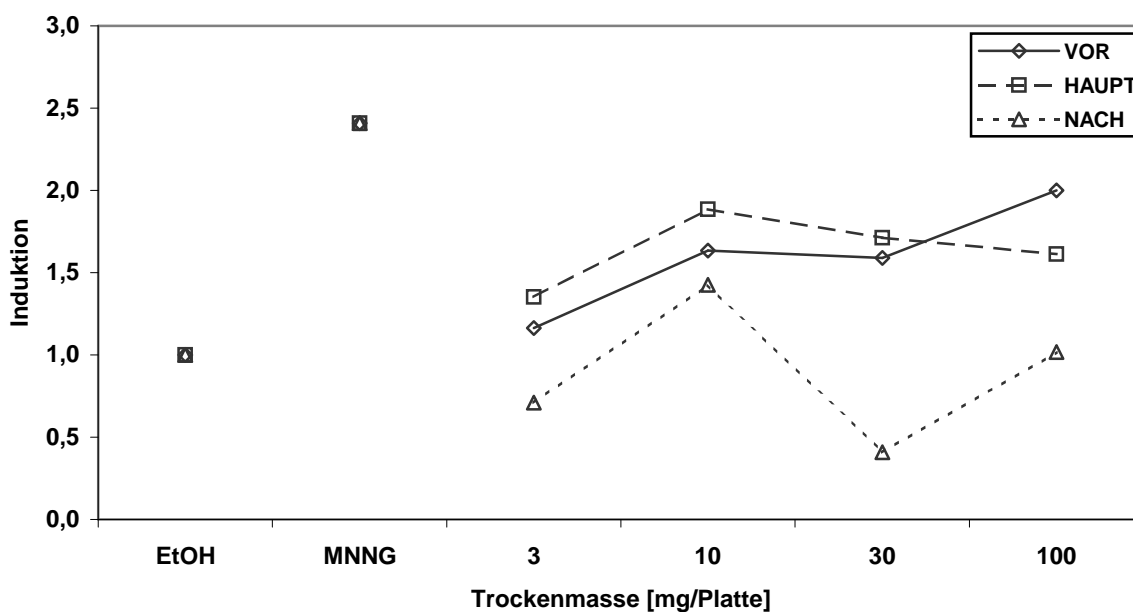


Abbildung 9-42: D/W-Kurve der GPC Fraktionen des Hexan/Aceton-Extraktes der Probe S031; MNNG: N-Methyl-N'-nitronitrosoguanidin

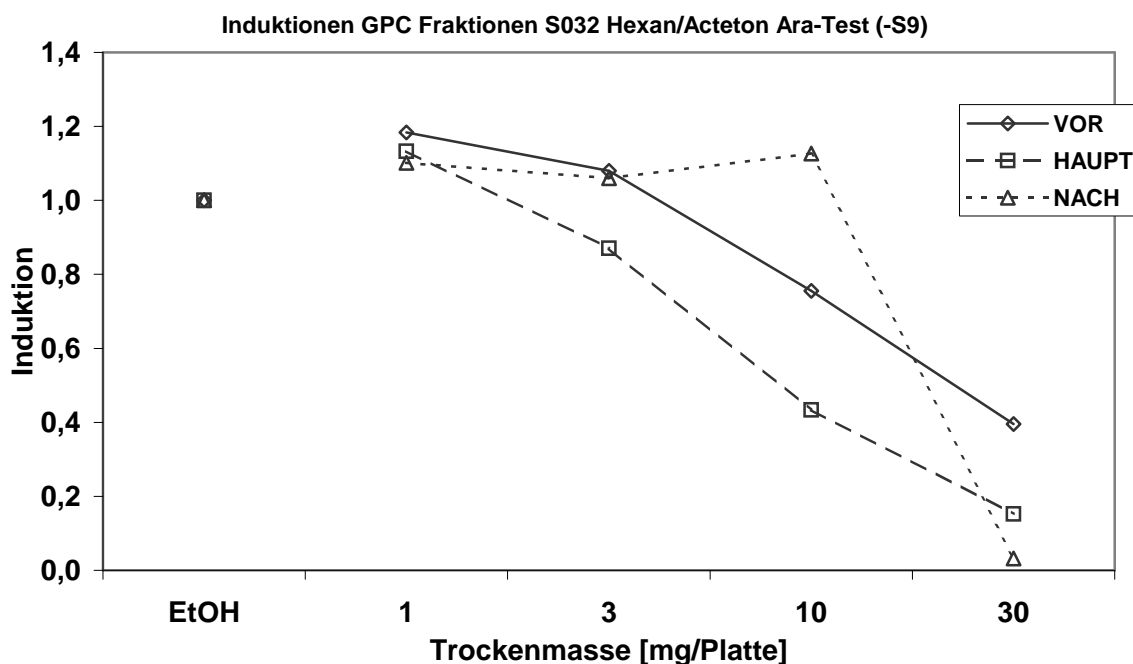
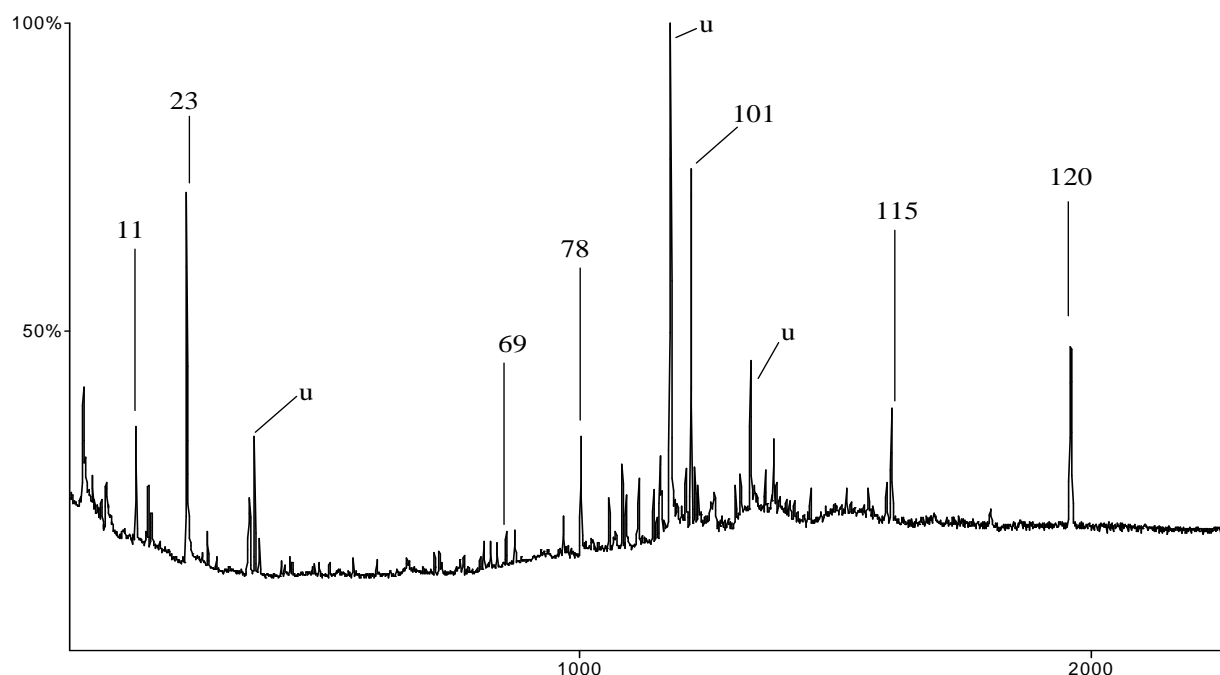


Abbildung 9-43: Ara-Test der GPC-Fractionen aus dem mutagenen Extrakt S032 (H/A)

Wie aus den D/W-Kurven der Fraktionen gegenüber den Gesamtextrakten entnommen werden kann, zeigen diese eine deutlich verminderte Mutagenität. Dies lässt sich auf die komplexere Zusammensetzung und den damit verbundenen Mischungseffekten der Gesamtextrakte gegenüber den Fraktionen zurückführen. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem in unterschiedlichen Arbeiten beschriebenen Resultaten, u.a. im ISIS-Abschlussbericht.^[20]

Wie anhand der GC/MS-Analysen gezeigt wird, sind diese Fraktionen aus einer Vielzahl von Substanzen zusammengesetzt. Die Fraktionen wiesen neben langkettigen Alkanen, Fettsäuren und Fettsäureester auch Alkylphenole unterschiedlicher Kettenlänge auf, wie z.B. das 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol (RI 1584). (vgl. z.B. Abbildung 9-51, S.167). Es wurden keine klassischen Mutagene wie z.B. PAKs oder aromatische Amine nachgewiesen.

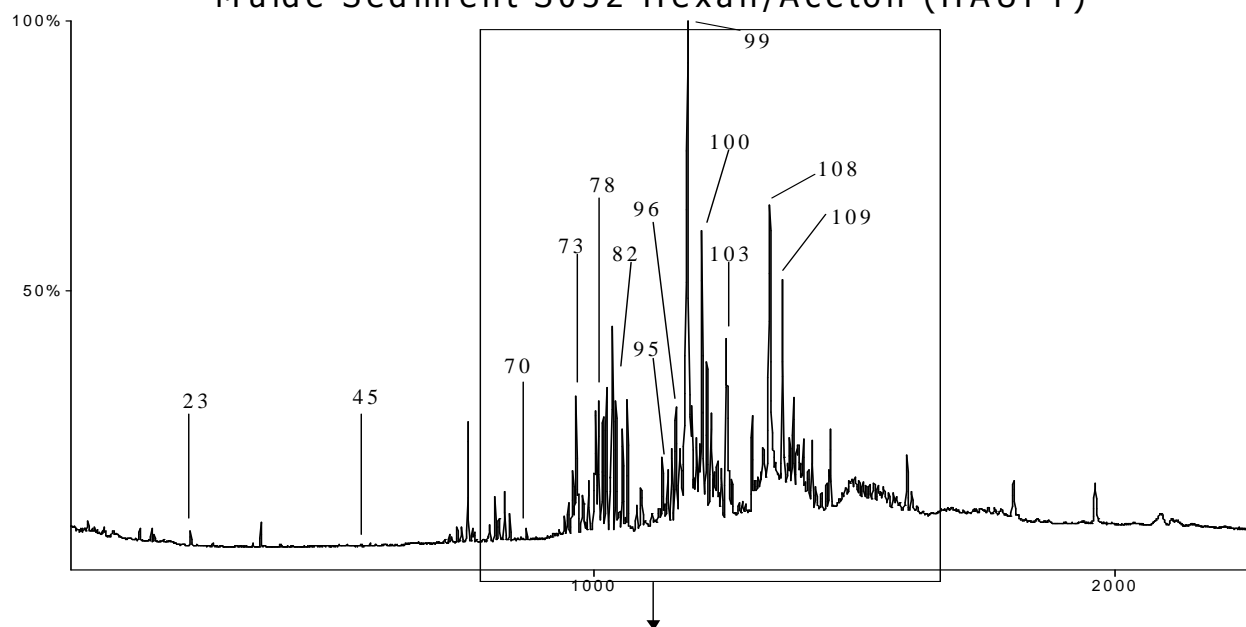
Mulde Sediment S032 Hexan/Aceton (VOR)



11: Phenol; 23: Acetophenon; 69: 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol („p-tert.-Octylphenol“); 78: Tetradeconsäure; 101: S₈; 115: Diheptylphthalat; 120: Squalen; u: unbekannt

Abbildung 9-44: TIC der GPC-Vorfraktion des Extraktes S032 H/A

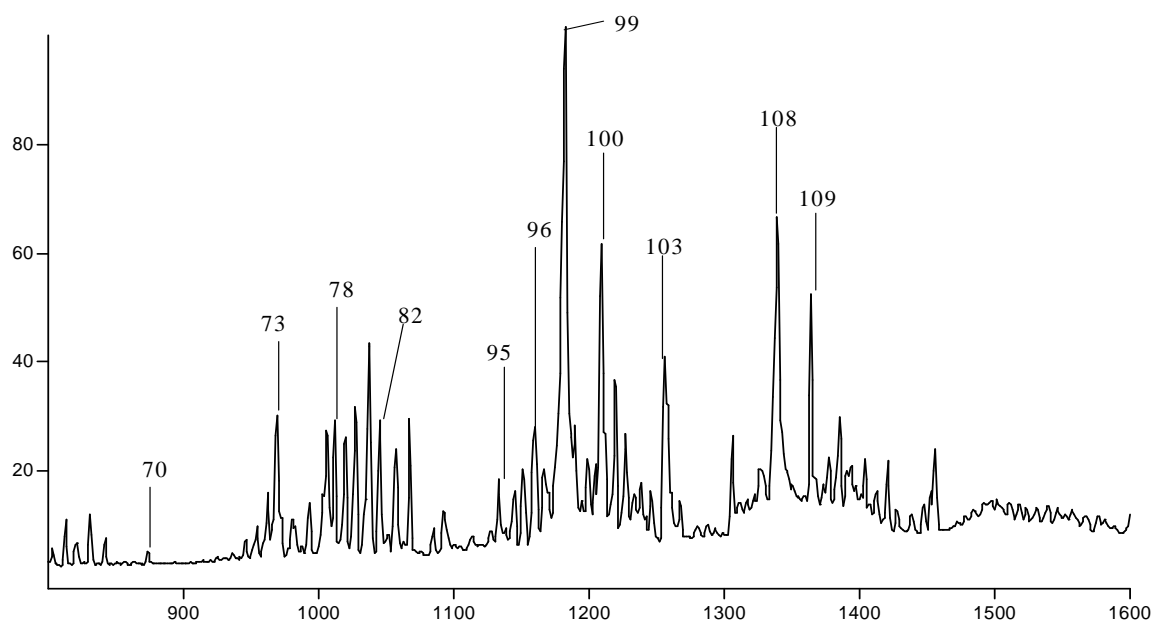
Mulde Sediment S032 Hexan/Aceton (HAUPT)



23: Acetophenon; 45: 2-tert.-Butylphenol; 70: Hexadecan; 73: Heptadecan; 78: Tetradeconsäure; 82: Tetracyclacetat; 95: 1-Nonadecen; 96: Nonadecan; 99: Hexadecansäure; 100: Ethylpalmitat; 103: 6,9,12,15-Heneicosatetraen; 108: Stearinsäure; 109: Methyl 2-Methylpentadecanoat

Abbildung 9-45: TIC der GPC-Hauptfraktion des Extraktes S032 H/A

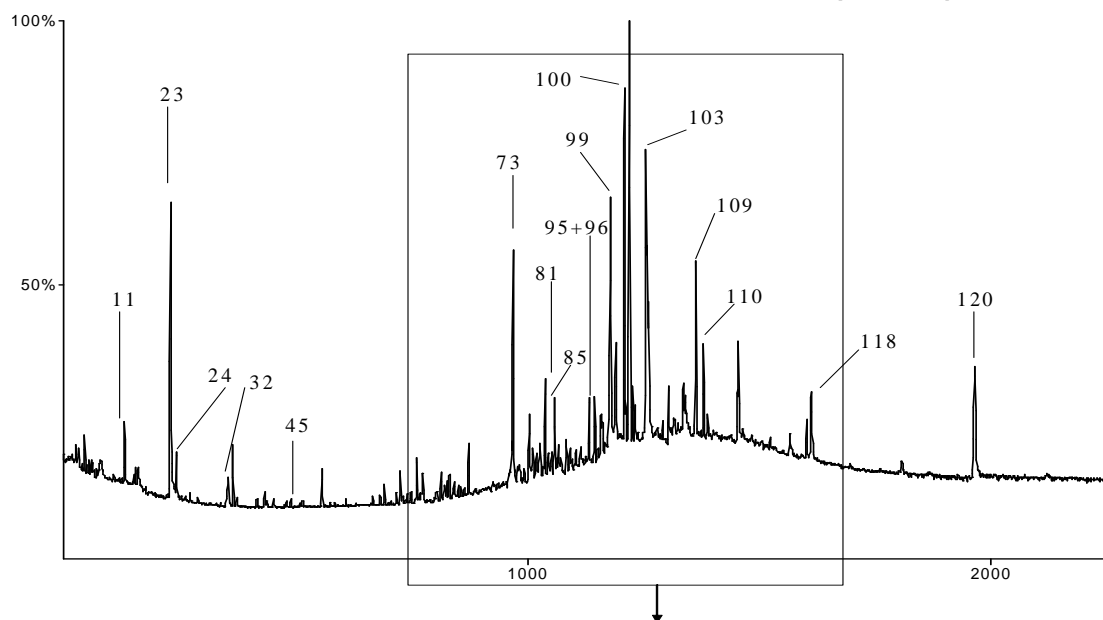
Mulde Sediment S032 Hexan/Aceton (HAUPT) Bereich 800-1600
gedehnt



70: Hexadecan; 73: Heptadecan; 78: Tetradecansäure; 82: Tetradecylacetat; 95: 1-Nonadecen; 96: Nonadecan; 99: Hexadecansäure; 100: Methylpalmitat; 103: 6,9,12,15-Heneicosatetraen; 108: Stearinsäure; 109: Methyl 2-methyl pentadecanoat;

Abbildung 9-45 (Forts.) : TIC der GPC-Hauptfraktion des Extraktes S032 H/A

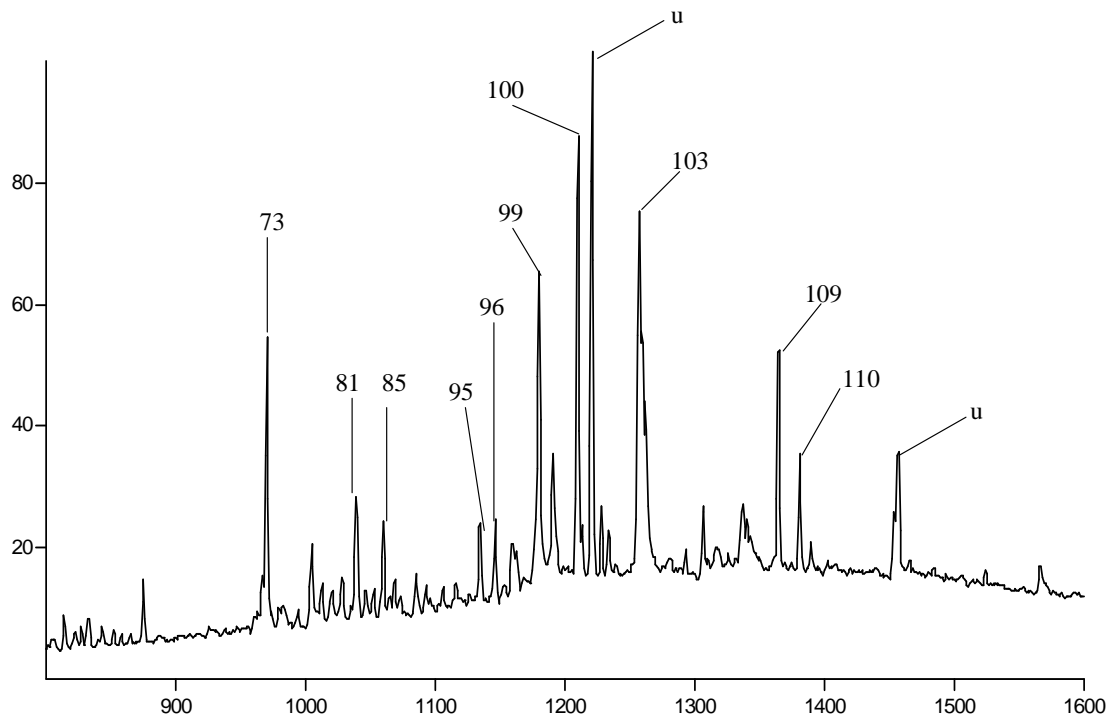
Mulde Sediment S032 Hexan/Aceton (NACH)



11: Phenol; 23: Acetophenon; 24: p-Cresol; 32: Benzoesäure; 45: 2-tert.-Butylphenol; 73: Heptadecan; 81: 2-Methyl tetradecanoat; 85: Octadecan; 95: 1-Nonadecen; 96: Nonadecan; 99: Hexadecansäure; 100: Ethylpalmitat; 103: 6,9,12,15-Heneicosatetraen; 109: Methyl 2-methylpentadecanoat; 110: Docosan; 118: Dioctylphthalat; 120: Squalen

Abbildung 9-46: TIC der GPC-Nachfraktion des Extraktes S032 H/A

Mulde Sediment S032 Hexan/Aceton (NACH) Bereich 800-1600
gedehnt



73: Heptadecan; 81: Methyl 2-Methyltetradecanoat; 85: Octadecan; 95: 1-Nonadecen; 96: Nonadecan; 99: Hexadecansäure; 100: Ethylpalmitat; 103: 6,9,12,15-Heneicosatetraen; 109: Methyl 2-Methylpentadecanoat; 110: Docosan; u:unbekannt;

Abbildung 9-46 (Forts.): TIC der GPC-Nachfraktion des Extraktes S032 H/A

9.2.6. Fraktionen der Extrakte S031 und S032 Ethylacetat

Die D/W-Kurven des Ara-Test zu den Fraktionen der Ethylacetat-Extrakte (Abbildung 9-47 bzw. 9-48) ergaben im untersuchten Dosis-Wirkungsbereich ebenfalls keine mutagenen Effekte.

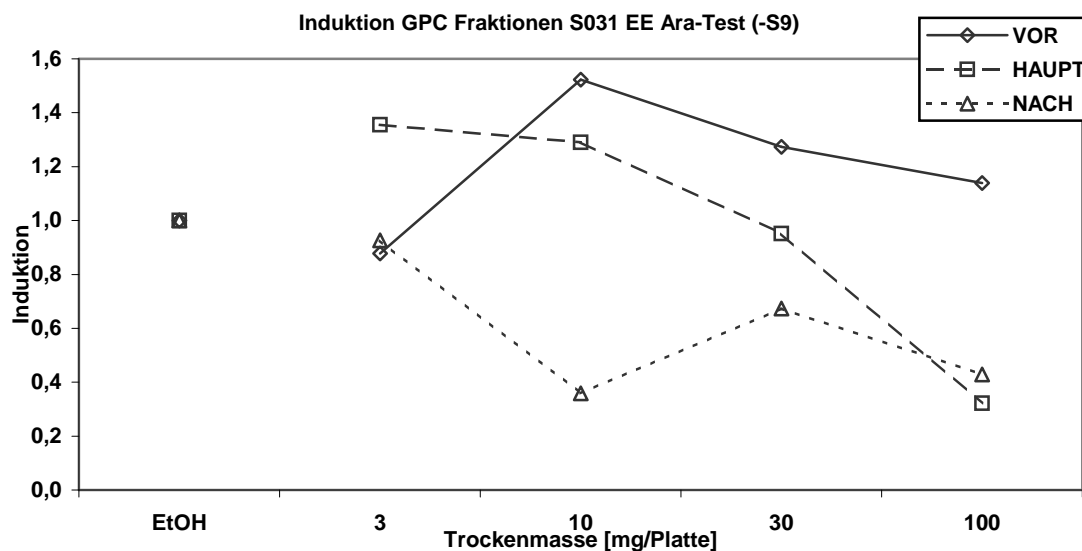


Abbildung 9-47: Fraktionen des Extraktes S031 Ethylacetat

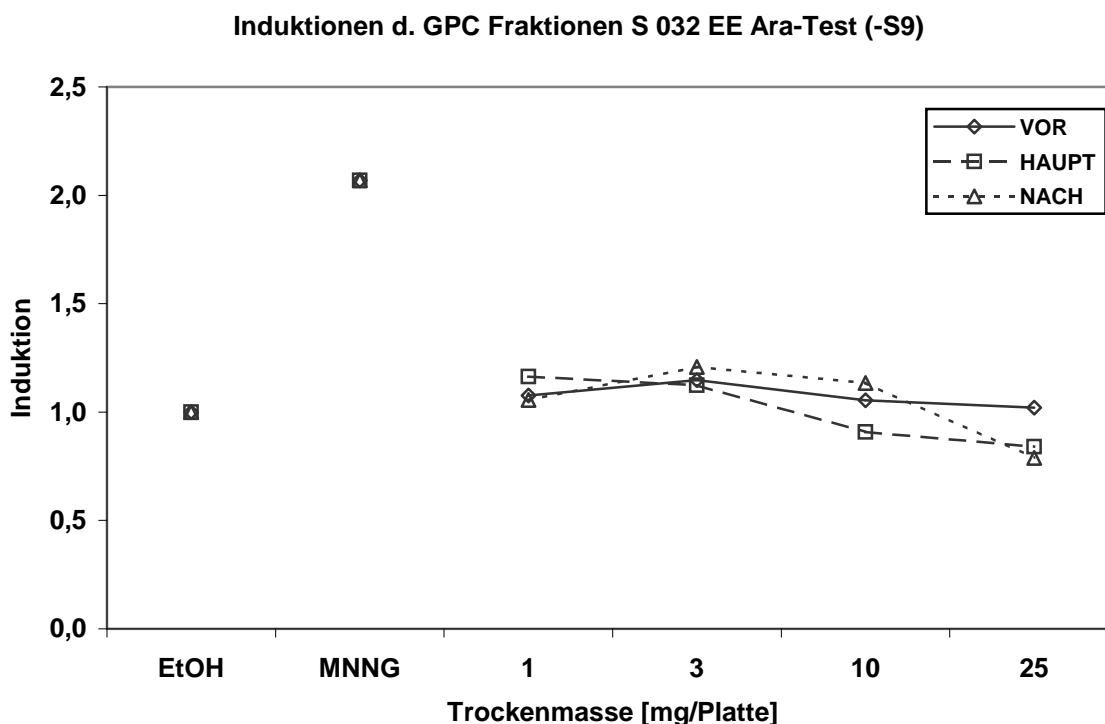
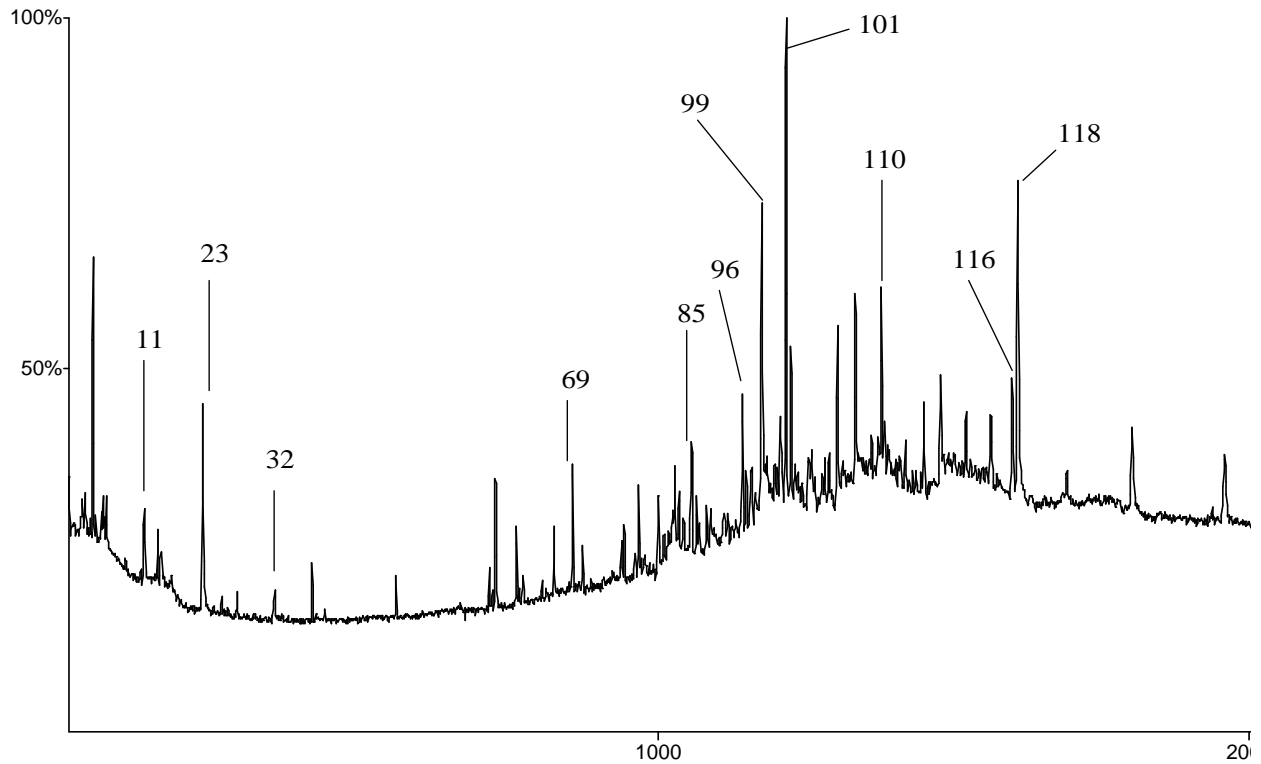


Abbildung 9-48: Fraktionen des Extraktes S032 Ethylacetat; MNNG: N-Methyl-N'-nitrosoguanidin

Die Zusammensetzung der Ethylacetat-Extrakte unterschied sich nicht wesentlich von den Hexan/Aceton-Extrakten, wie sich dies aus dem Vergleich der TIC ergibt. Ebenfalls konnte neben dem 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol („4-tert.-Octylphenol“)^a eine Reihe weiterer Alkylphenole nachgewiesen werden, die Diageneseprodukte der APnEOs darstellen.^[113] Daneben traten ebenso auch langkettige Alkane als auch Fettsäuren auf.

^a GC/MS als Reinheitsnachweis der Referenzsubstanz, vgl. Abbildung 9-57

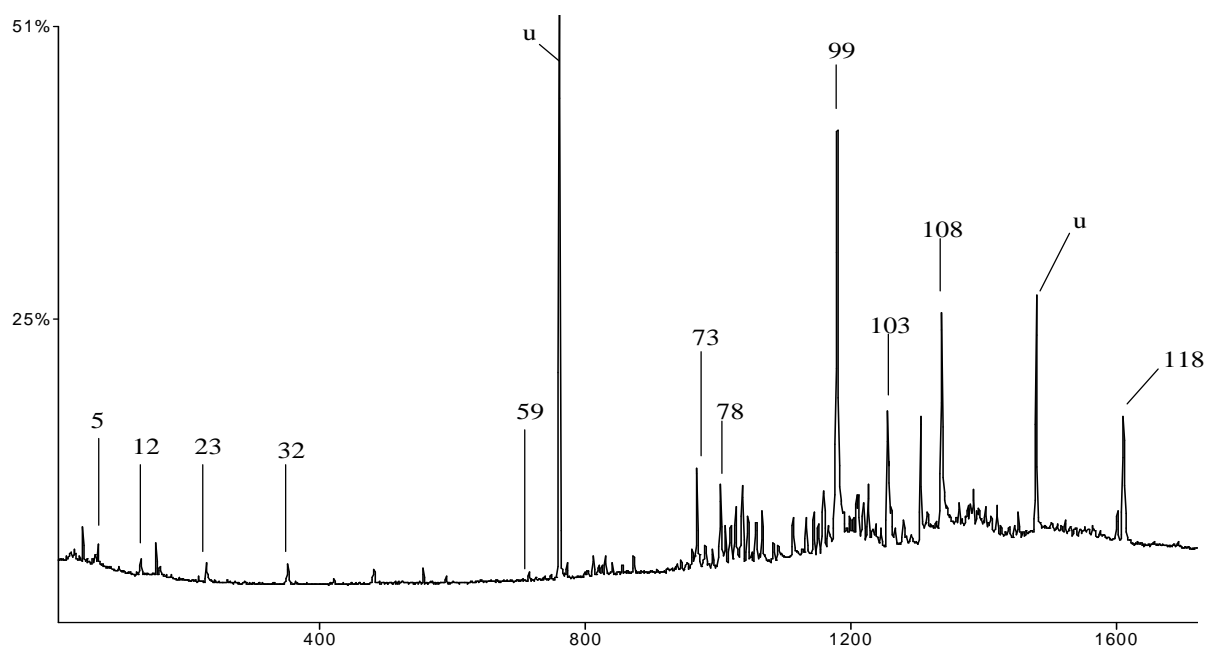
Mulde Sediment S032 Essigester (VOR)



11: Phenol; 23: Acetophenon; 32: Benzoesäure; 69: 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol; 85: Octadecan; 96: Nonadecan; 99: Hexadecansäure; 101: S₈; 110: Docosan; 116: Pentacosan; 118: Dioctylphthalat

Abbildung 9-49: TIC der Vorfaktion des Ethylacetat-Extraktes der Probe S032

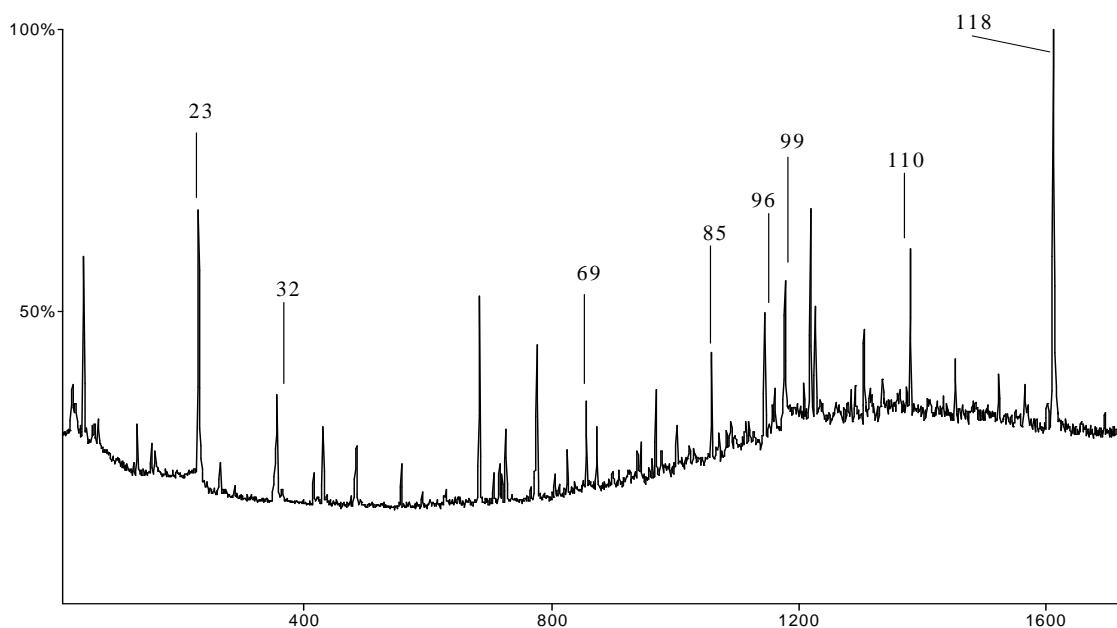
Mulde Sediment S032 Essigester (HAUPT)



5: Heptan-2-on; 12: Hexansäure; 23: Acetophenon; 32: Benzoesäure; 59: 2,6-Di-tert.-Butyl-4-methylphenol (BHT); 73: Heptadecan; 78: Tetradecansäure; 99: Hexadecansäure; 103: 6,9,12,15-Heneicosatetraen; 108: Stearinsäure; 118: Dioctylphthalat; u: unbekannt

Abbildung 9-50: TIC der Hauptfraktion des Ethylacetat-Extraktes der Probe S032

Mulde Sediment S032 Essigester (NACH)



23: Acetophenon; 32: Benzoesäure; 69: 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol; 85: Octadecan; 96: Nonadecan; 99: Hexadecansäure; 110: Docosan; 118: Dioctylphthalat;

Abbildung 9-51: TIC der Nachfraktion des Ethylacetat-Extraktes der Probe S032

In Konsequenz dessen, dass die Extrakte eine Reihe an alkylierten Phenolen aufwiesen, wurden Experimente zur Affinität zu den Östrogenrezeptoren ER α und ER β durchgeführt. Stellvertretend wurde für das 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol eine Dosis-Wirkungsabhängigkeit näher untersucht, um dies mit den bekannten Xenoöstrogenen wie z.B. Nonylphenol vergleichen zu können. Auf diese Ergebnisse wird im Kapitel 9.2.10. näher eingegangen.

9.2.7. EROD-Test

Ergänzend zu den Untersuchungen zur Mutagenität und Zytotoxizität wurde ein EROD-Test gemacht, um die mutagenen Sedimentextrakte auch hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zur Induktion von CYP-450 1A1 zu untersuchen. Deshalb wurden diesbezüglich die im Ara-Test mutagenen Sedimentextrakte S031 (H/A), S031 (EE), S032 (H/A), S032 (EE) und S035 (EE) getestet. Die Induktion des CYP-450 1A1 in Abhängigkeit vom prozentualen Anteil des Extraktes im Nährmedium ist Abbildung 9-52 wiedergegeben.

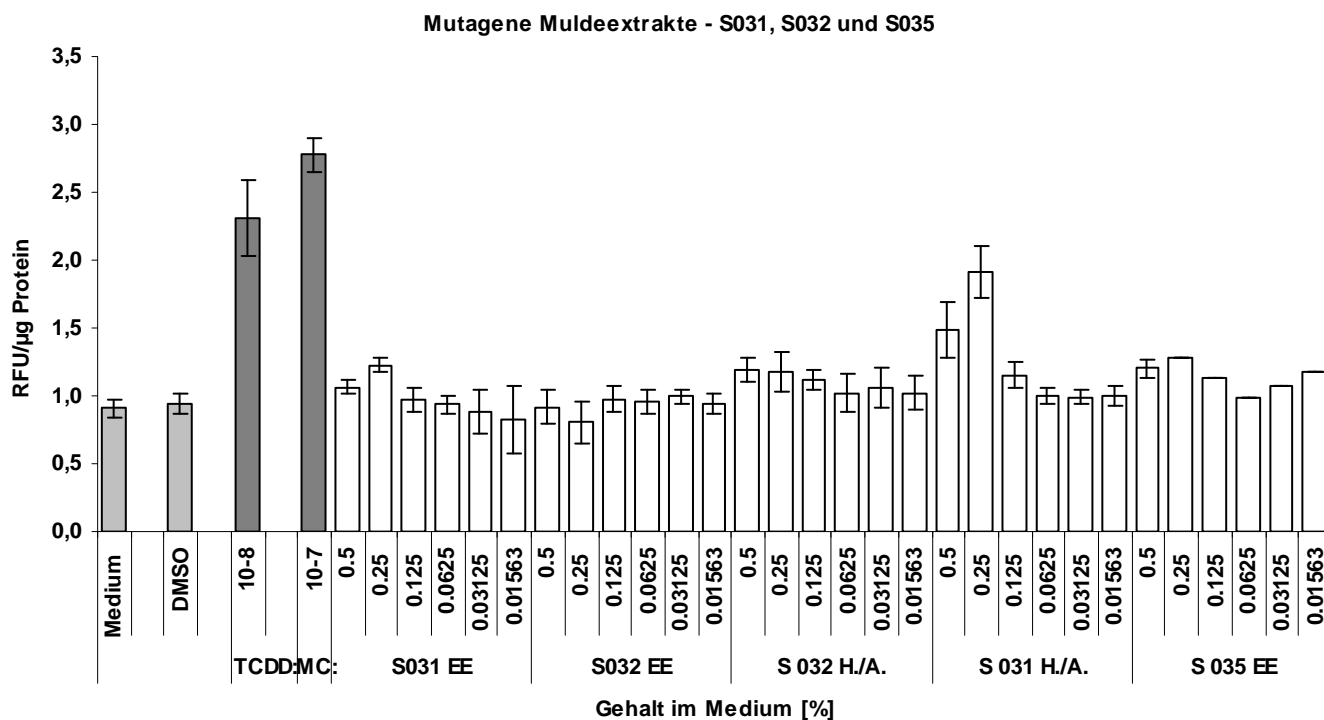


Abbildung 9-52: Dosis/Wirkungskurve des EROD-Test mutagener Sedimentextrakte (MC Methylcholanthren, TCDD: 2,3,7,8-Kongener)

Wie sich aus der D/W-Kurve ergibt, liegen alle Induktionswerte deutlich im Bereich der Negativkontrollen (Lösungsmittel- bzw. Medium) und liefern somit keine Hinweise auf die Anwesenheit von 2,3,7,8-TCDD- oder PAH-wirkähnlichen Substanzklassen. Eine Ausnahme hiervon bildet lediglich die Probe S031 (H/A), deren Induktionswerte für die höheren Konzentrationen deutlich oberhalb der Kontrollwerte liegen.

9.2.8. Östrogene Wirkung ausgewählter Sedimentextrakte

Wie aus den Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung der mutagenen Sedimentextrakte erhalten wurde, konnten Abbauprodukte der APnEOs^[113], stellvertretend das 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol, identifiziert werden.

Es wurde daraufhin die Untersuchung der Sedimentextrakte auf deren östrogene Wirkung in Betracht gezogen, und diese sowohl im Östradiol-Verdrängungsassay (Abbildung 9-53) als auch dem Luciferase-Assay (Abbildung 9-55, S. 171 und 9-57, S. 172) getestet.

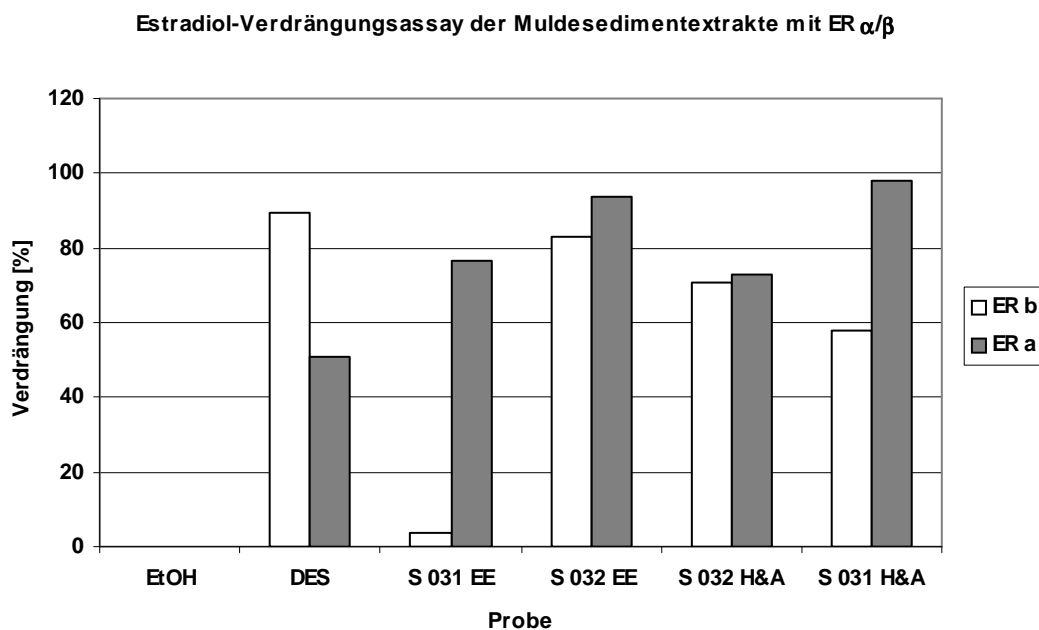


Abbildung 9-53: Östradiol-Verdrängungsassay der mutagenen Muldesedimente (Bezogen auf 1 mg Trockenmasse); DES: Diethylstilbestrol (Positivivkontrolle)

Wie sich aus der Abbildung 9-53 entnehmen lässt, zeigen – mit Ausnahme des Extraktes S031EE für den β -Rezeptor - alle Extrakte für beide Rezeptoren eine Verdrängung von mindestens 60% und damit eine Affinität zu den Estrogenrezeptoren. Die Extrakte wurden auf deren östrogene Wirkung im Luciferase-Assay weiter untersucht (Abbildung 9-55 und 9-56). Zunächst sei jedoch die D/W-Kurve des Östradiols im Luciferase-Assay aufgezeigt, um die wirksame Konzentration des Östradiols in diesem Testsystem vorzustellen (Abbildung 9-55).

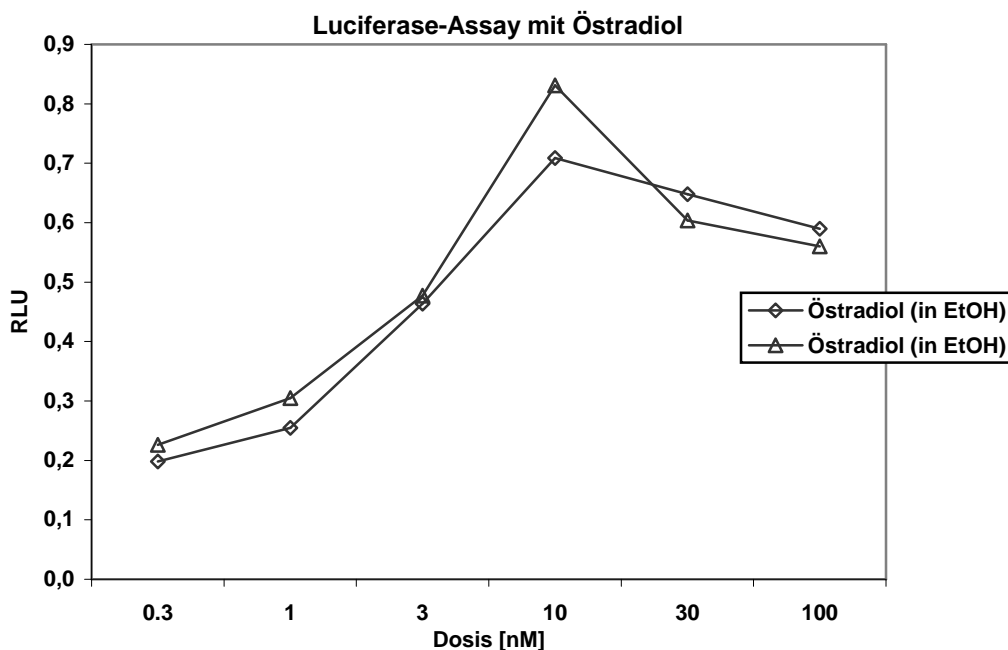


Abbildung 9-54: Vergleich zweier Versuchsreihen mit Östradiol-Standard im Luciferase-Assay

Aus der D/W-Kurve (Abbildung 9-54) des Östradiols im Luciferase-Assay ergibt sich die wirksame Konzentration des Östradiols zu 10 nmol/l.

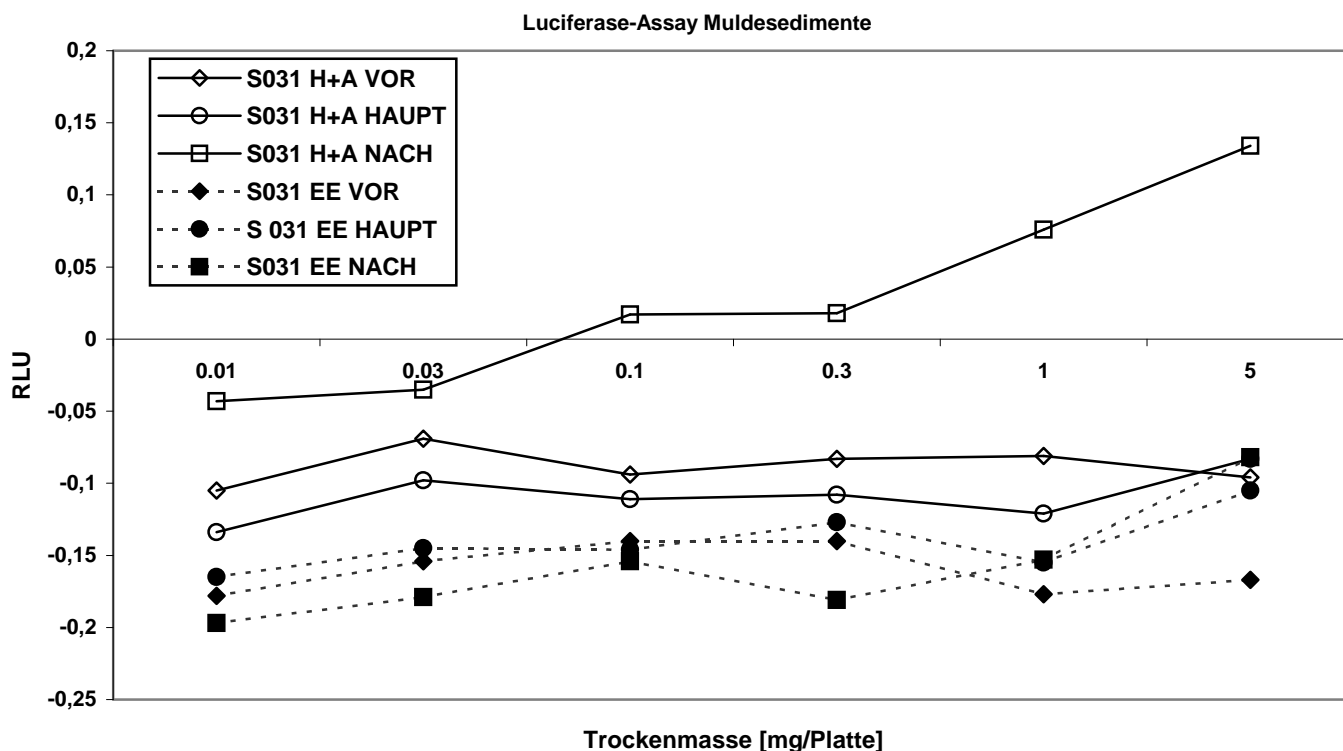


Abbildung 9-55: Luciferase-Assay der Muldesedimentprobe S031

Die östrogene Wirksamkeit einer Substanz wird durch dessen Potenz^a, relativ zum Östradiol angegeben. Dazu werden die ED₅₀-Werte, die man aus der jeweiligen D/W-Kurve erhält, ins Verhältnis gesetzt. Im Folgenden seien die D/W-Kurven der einzelnen Fraktionen angegeben.

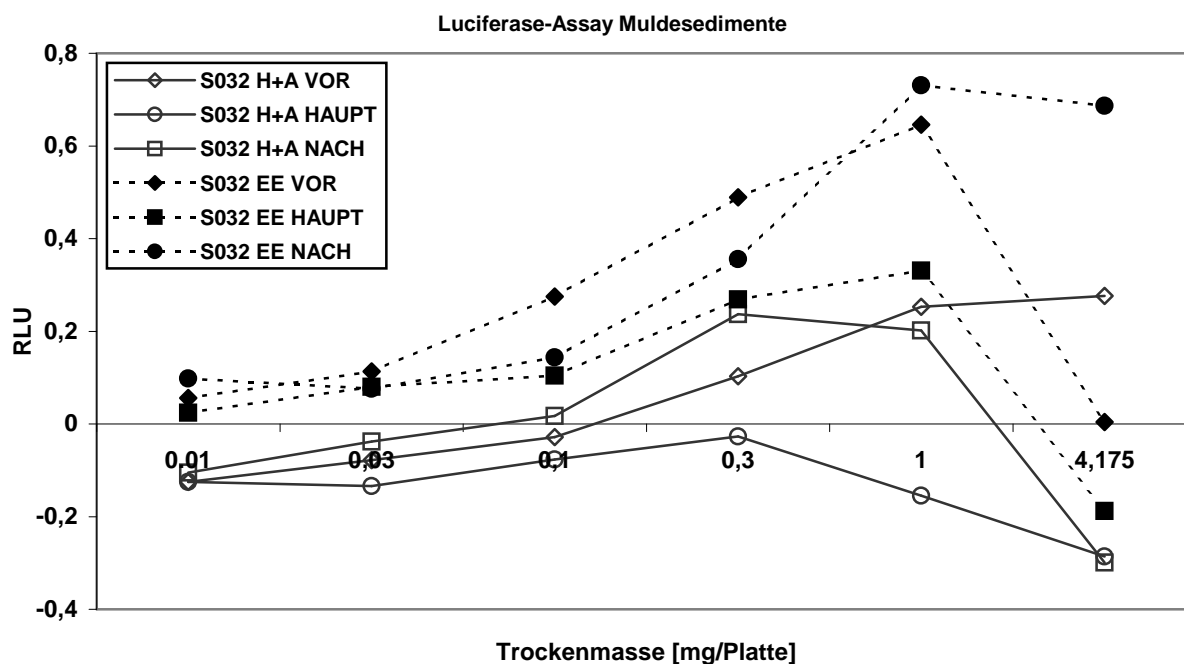


Abbildung 9-56: Luciferase-Assay der Muldesedimentprobe S032

Aus dem Vergleich der D/W-Kurven der Probe S031 bzw. S032 geht deutlich hervor, dass für die Probe S031 kaum eine östrogene Wirkung im untersuchten Dosisbereich gefunden werden konnte (vgl. Abbildung 9-55). Hingegen zeigt Probe S032, dass für die Haupt- und Nachfraktion des Ethylacetat-Extraktes eine östrogene Wirkung vorliegt (vgl. Abbildung 9-56).

^a Als Potenz wird hier das Verhältnis der Wirkung der östrogen wirksamen Testsubstanz relativ zum Östradiol verstanden

Dieser Effekt liegt in der Größenordnung des Östradiols: vergleicht man die RLU-Werte für die ED₅₀-Werte so entspricht die Wirkung von 0,1 mg Trockenmasse des Extraktes "S032EE Nach" einer Östradiolkonzentration von etwa 3 nmol/L.

9.2.9. Ara-Test mit 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol

Die GC/MS Analysen (vgl. Kap. 9.2.4.) der mutagenen GPC-Fractionen zeigten, dass diverse mikrobiologische Abbauprodukte der Alkylphenoethoxylate (APnEOs)^[113] in den Extrakten enthalten sind, zu denen vor allem Alkylphenole unterschiedlicher Konstitution wie z.B. das 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol zählen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Alkylphenole für die im Ara-Test gefundene Mutagenität verantwortlich seien. Als Konsequenz dessen wurde das 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol im Ara-Test auf dessen mutagene Wirkung untersucht. Die D/W-Kurven sollen im Folgenden aufgezeigt und Unterschiede zu den Sedimentextrakten in Abschnitt 11.3.2. diskutiert werden. Zuvor wurde die Reinheit des 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenols im GC/MS-Experiment überprüft (vgl. Abbildung 9-57), da Alkylphenole häufig als technische Gemische vorliegen und in Abhängigkeit vom eingesetzten Isomer, d.h. der Verzweigung der Alkylkette, unterschiedliche östrogene Wirkungen entfalten können.^[114,115]

Spezieller Teil

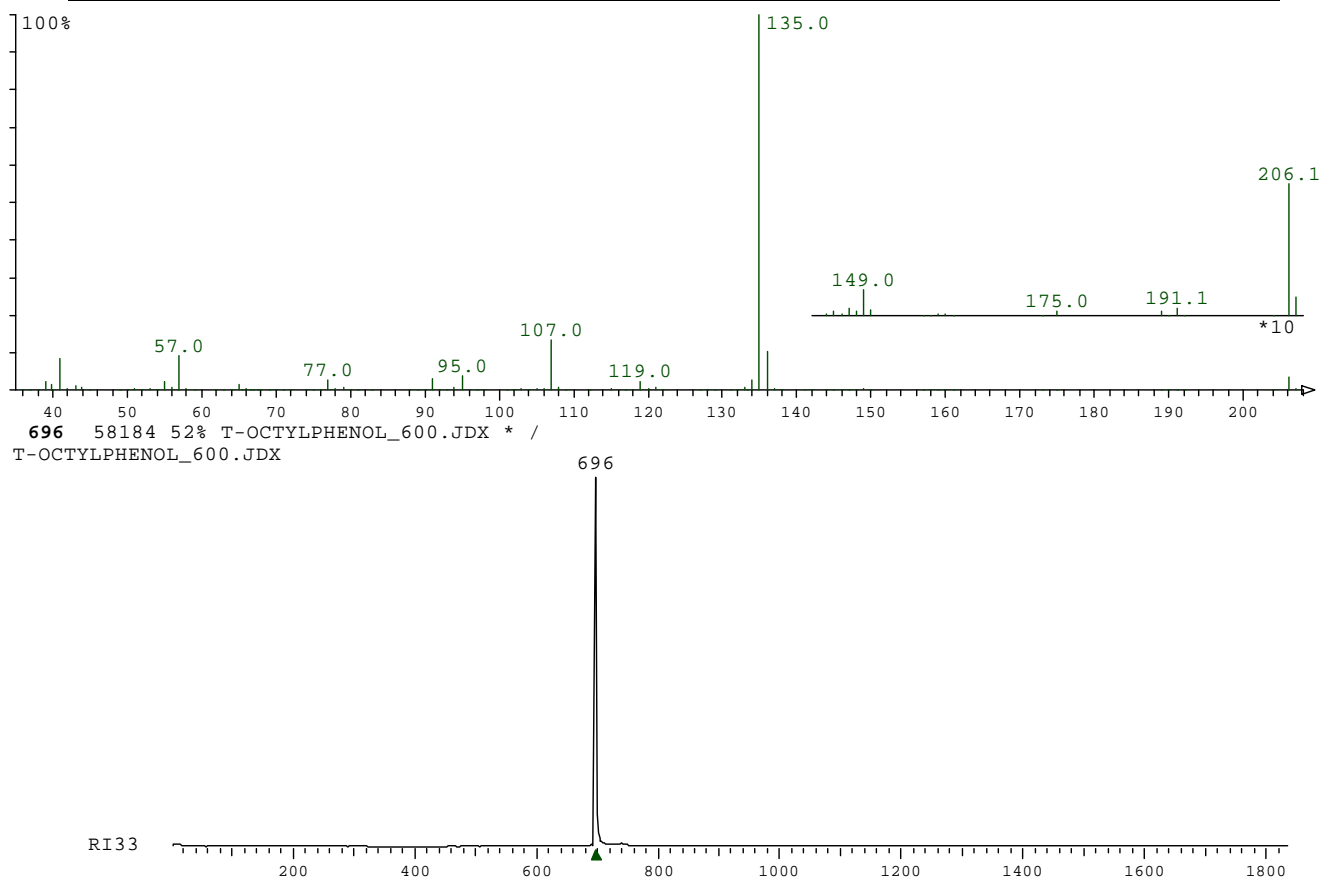


Abbildung 9-57: GC/MS des 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenols der Referenzsubstanz für den Luciferase- und den Östradiol-Verdrängungsassay

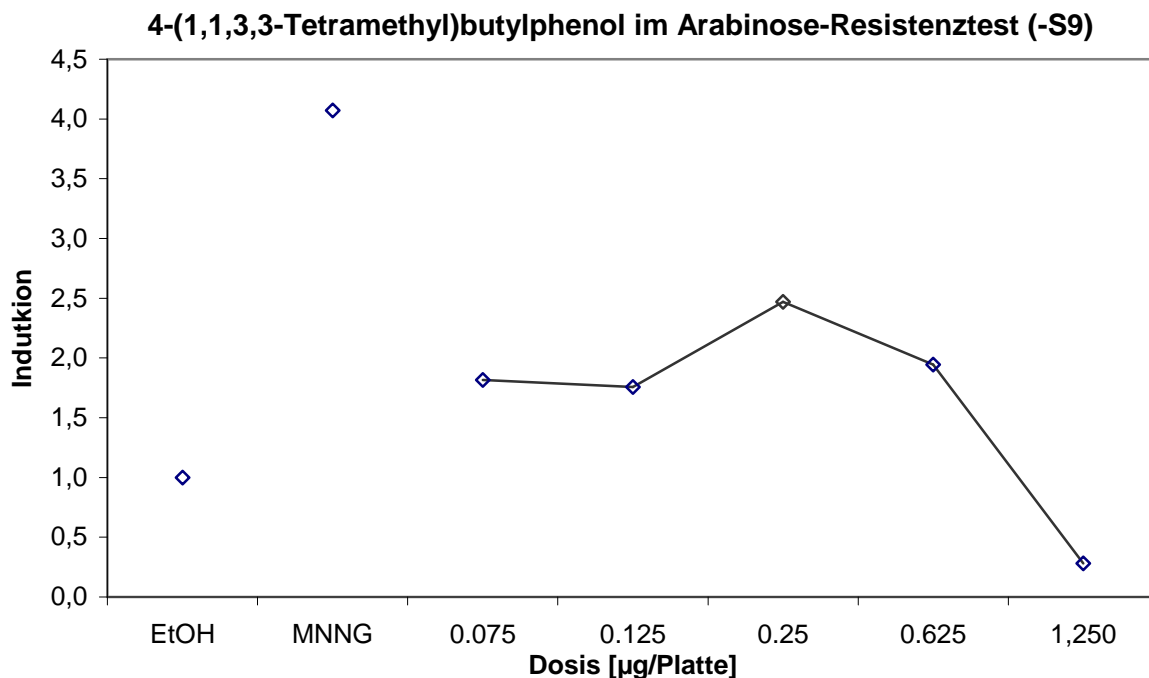


Abbildung 9-58: D/W-Kurve für 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol im Ara-Test ohne metabolische Aktivierung; MNNG: N-Methyl-N'-nitrosoguanidin

Wie sich aus der D/W-Kurve (Abbildung 9-58) zunächst ableiten lässt, konnte für eine Dosis von 0.25 µg ein schwach mutagener Effekt gefunden werden (Induktionswert: 2.0), der jedoch in keinem Verhältnis zu den in den Sedimentproben gefundenen Induktionswerten steht. Um diesen Befund zu reproduzieren wurde eine Reihe weiterer Mutagenese-Experimente durchgeführt, deren D/W-Kurven gemittelt wurden (Abbildung 9-59).

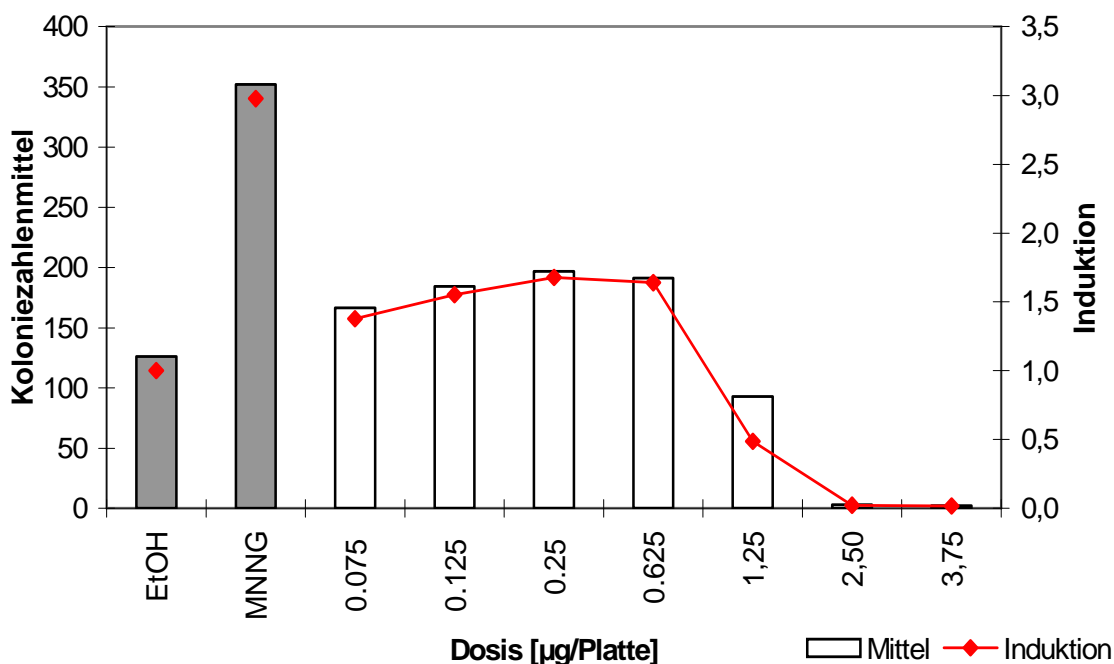


Abbildung 9-59: Gemittelte Induktionen im Ara-Test für 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol (-S9); MNNG: N-Methyl-N'-nitronitrosoguanidin

Die D/W-Kurve in Abbildung 9-58 zeigt im Dosisbereich von 0.125-0.625 µg einen ähnlichen Verlauf wie die in Abbildung 9-59, jedoch läßt sich daraus auf keinen mutagenen Effekt schließen. Tendenziell ergibt sich schon ab einer Dosis von 0.625 µg eine starke Abnahme der Koloniezahl, die aus einer Toxizität der Substanz resultiert.

9.2.10. 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol: Östradiol-Verdrängungs- und Luciferase-Assay

Ähnlich wie für Nonylphenol ist davon auszugehen, dass auch 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol als Xenoöstrogen wirkt.^[116] Um diese Hypothese zu belegen, wurde für das 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol eine D/W-Kurve im Östradiol-Verdrängungsassay aufgenommen (Abbildung 9-60). Vergleichend dazu wurden mit der Referenzsubstanz ebenfalls Experimente im LUC-Assay gemacht, um Aufschluss über dessen biologische Wirkung im Organismus zu erhalten.

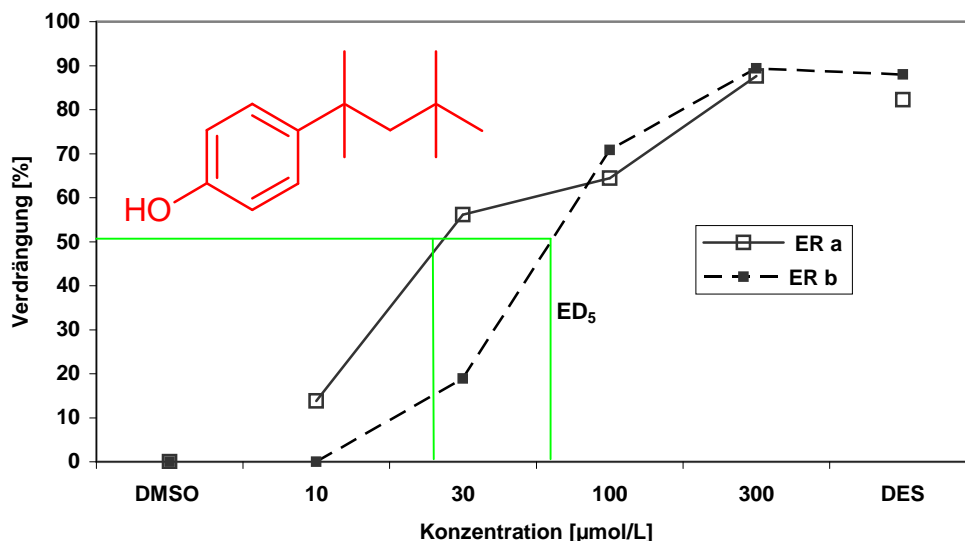


Abbildung 9-60: Östradiol-Verdrängungsassay mit 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol für ER α und ER β

Erwartungsgemäß konnte für das 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol eine Bindungsaffinität sowohl für den α - als auch für den β -Östrogenrezeptor gefunden werden. So zeigt sich bei einer Konzentration von 300 $\mu\text{mol/L}$ eine nahezu vollständige Verdrängung des Östradiols aus den Rezeptoren. Für den β -Rezeptor wird eine 50%-ige Verdrängung bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ gefunden, für den α -Rezeptor liegt sie bei etwa 30 $\mu\text{mol/L}$. Aus der D/W-Kurve ergibt sich somit ein leichter Unterschied der ED_{50} -Werte, der im Zusammenhang mit der Geometrie der Bindungsregion beider Rezeptoren stehen könnte (siehe Abbildung 5-1, S. 34). Wie sich aus der Abbildung 5-1 ergibt, stimmt die Aminosäuresequenz in der Bindungsregion der jeweiligen Estrogenrezeptoren nur zu 53% überein. Hieraus resultieren dann die unterschiedlichen Affinitäten, die sich auch schon in den Experimenten mit den Wasser und Sedimentproben bemerkbar machten.

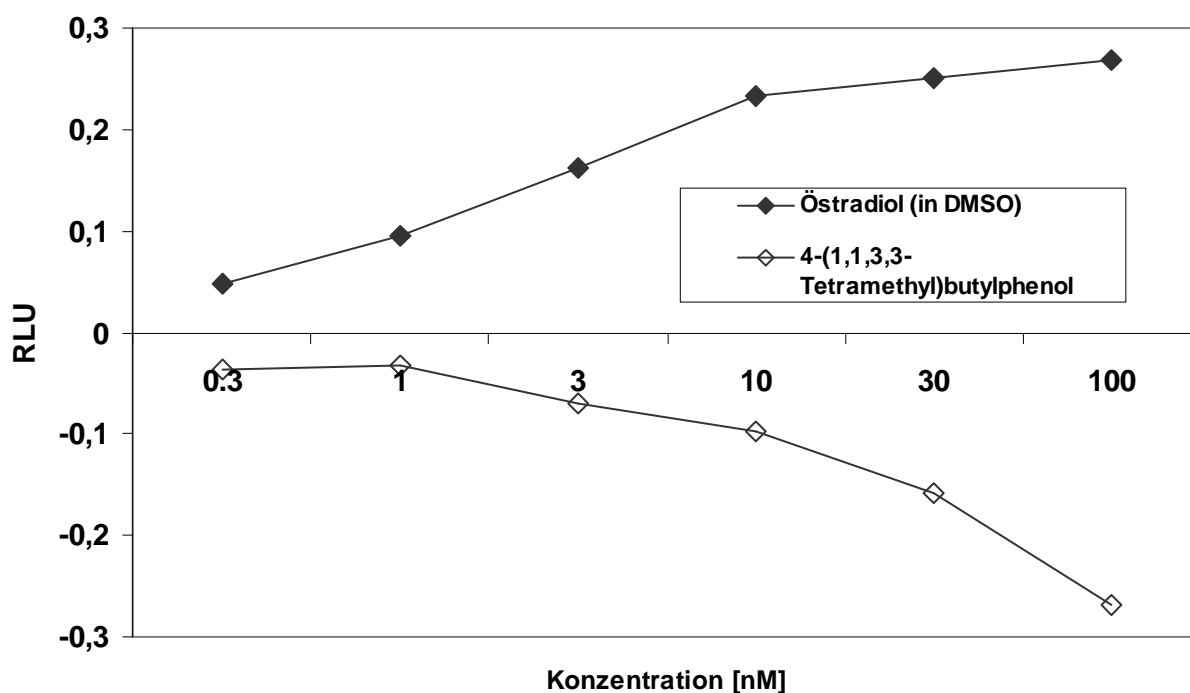


Abbildung 9-61: Vergleich der östrogenen Wirkung von 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol und Östradiol (E2) im Luciferase-Assay

Der D/W-Kurve (Abbildung 9-61) lässt sich entnehmen, dass im Gegensatz zum Östradiol, das 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol kaum eine Wirkung entfaltet. Eine Abschätzung der Qualität dieses Luciferase-Assays gewinnt man durch den Vergleich mit der D/W-Kurve für das Östradiol in Abbildung 9-54, S. 185.

Es ist eine deutliche Minderung der Empfindlichkeit der MVLEN-Zellen, ausgedrückt in der Steigung der Kurve ($dRLU/d[\text{Östradiol}]$), gegenüber dem Östradiol zu erkennen.

Der Grund für diese unterschiedliche Wirkung kann darin gesehen werden, dass für die Kalibrationsexperimente (Abbildung 9-54, S. 185) eine ethanolische Lösung des Östradiols verwendet wurde, wohingegen in diesem Experiment eine DMSO-Lösung benutzt wurde. Dies kann durchaus eine plausible Erklärung für die herabgesetzte Empfindlichkeit der Zellen für die östrogene Wirkung sein.

Anzunehmen ist, dass die MVLN-Zellen auf DMSO empfindlich reagierten und eine lösungsmittelabhängige Toxizität resultiert, was auch z.T. in den Kontrollen zum Ausdruck kam. DMSO wurde aus dem Grund als Lösungsmittel in diesem Experiment eingesetzt, weil sich DMSO als das einzige Lösungsmittel erwies, indem sich das 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol einigermaßen gut löste. Daher ließ sich in diesem Testsystem keinerlei hormonelle Aktivität für das 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol nachweisen.

Aus dem positiven Verlauf des Luciferase-Assays für Östradiol läßt sich deshalb sagen, dass zwar eine Bindung an den Rezeptor erfolgt (Abbildung 9-61), eine östrogene Wirkung wohl auszuschließen ist und damit eine Expression der Gene nicht erfolgt. Dass diese Aussage trotz der verminderten Qualität des Assays Gültigkeit hat, beweist die, zwar herabgesetzte jedoch vorhandene Wirkung des Östradiols. Wie sich nach mehrfacher Wiederholung des Luciferase-Experiments zeigte, konnte die östrogene Wirkung des 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol nicht zweifelsfrei gezeigt werden.

Die im Östradiol-Verdrängungsassay sowie die im Luciferase-Assay für den Gesamtextrakt (Ethylacetat) und die Fraktionen der Probe S032 gefundenen Effekte lassen sich also nicht allein durch das identifizierte 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol zufriedenstellend erklären. Es ist aber sicherlich denkbar, dass die Mischung, die unterschiedlich alkylierte Phenole enthält, eine andere Wirkung entfaltet als die Reinsubstanz.

10. Toxikologie bromierter Indole

10.1. Hintergrund und Zielsetzung

In verschiedenen Arbeiten wurden Bromindole als neue Inhaltsstoffe von Sedimenten beschrieben.^[117, 118] Hierbei handelt es sich, wie abgeleitete Strukturvorschläge aus Massenspektren vermuten lassen, hauptsächlich um die 3,4-; 3,5-; 3,6- und 3,7-Derivate des Dibromindols. Bislang wurden das 5- und das 6-Monobromindol sowie das 4,6-Dibromindol im Leuchtbakterientest, Fischeitest^[38] sowie im Bakterienmutagenesetest (Ara-Test) untersucht. Im Ara-Test zeigte sich z.B., dass im untersuchten Dosisbereich für das 5-Bromindol eine Zytotoxizität überlagert ist.^[20] Weitergehende toxikologische Untersuchungen mit Dibromindolen sowie mit höher bromierten Indolen lagen bislang nicht vor. Es bestand daher das Interesse, diese in unterschiedlichen toxikologischen Testsystemen systematisch zu erfassen. Neben den synthetisch hergestellten 3,x-Dibromindolen (x = 4, 5, 6, 7) wurden auch höher bromierte Bromindole auf deren Toxizität und Mutagenität im Arabinoseresistenztest sowie deren potenzielle Fähigkeit zur Induktion von CYP-450 1A1 im EROD-Test eingehend untersucht.

Unter anderem wurden Experimente zur Metabolisierung der Bromindole mit Rattenleberhomogenat gemacht, da dies eine Modellierung des Metabolismus in höheren Organismen darstellt und Rückschlüsse auf potenziell genotoxische Wirkungen ermöglicht. Die Inkubate mit dem Rattenleberhomogenat wurden nach Aufarbeitung mithilfe der GC/MS untersucht und die entstandenen Metabolite durch Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit Referenzsubstanzen charakterisiert.

10.2. Synthese der Dibromindole

Bromierungen des Indols mit N-Bromsuccinimid führen, in Abhängigkeit vom gewählten Reaktionsmedium, zu Bromierungen in 3-Position oder 2-Position.^[119,120] Eine Bromierung des Sechsringsystems wird unter diesen Bedingungen nicht erhalten. Die Bromindole, die am Sechsring bromiert sind, werden durch Reaktionen erhalten, die den annelierten Pyrrolring schrittweise aufbauen. Dieses Prinzip ist erstmals in den Arbeiten von G. Bartoli aufgezeigt worden.^[121] Im Zuge der Bartoli-Synthese wird zunächst ein Nitroaromat mit einem Vinyl-Grignard-Reagenz zu einer Nitroso-Verbindung reduziert. In einer 1,2-Addition mit einem weiteren Mol des Vinyl-Grignards reagiert die Nitroso-Verbindung dann zu einem N-Aryl-O-vinylhydroxylamino-Magnesiumsalz. Dieses lagert sich in einer sigmatropen Umlagerung zu einem Aldehyd um. Abschließend tritt Ringschluß ein und die Re-Aromatisierung erfolgt nach Reduktion mit einem dritten Molekül des Vinyl-Grignard-Reagenz (vgl. Abbildung 10-1).

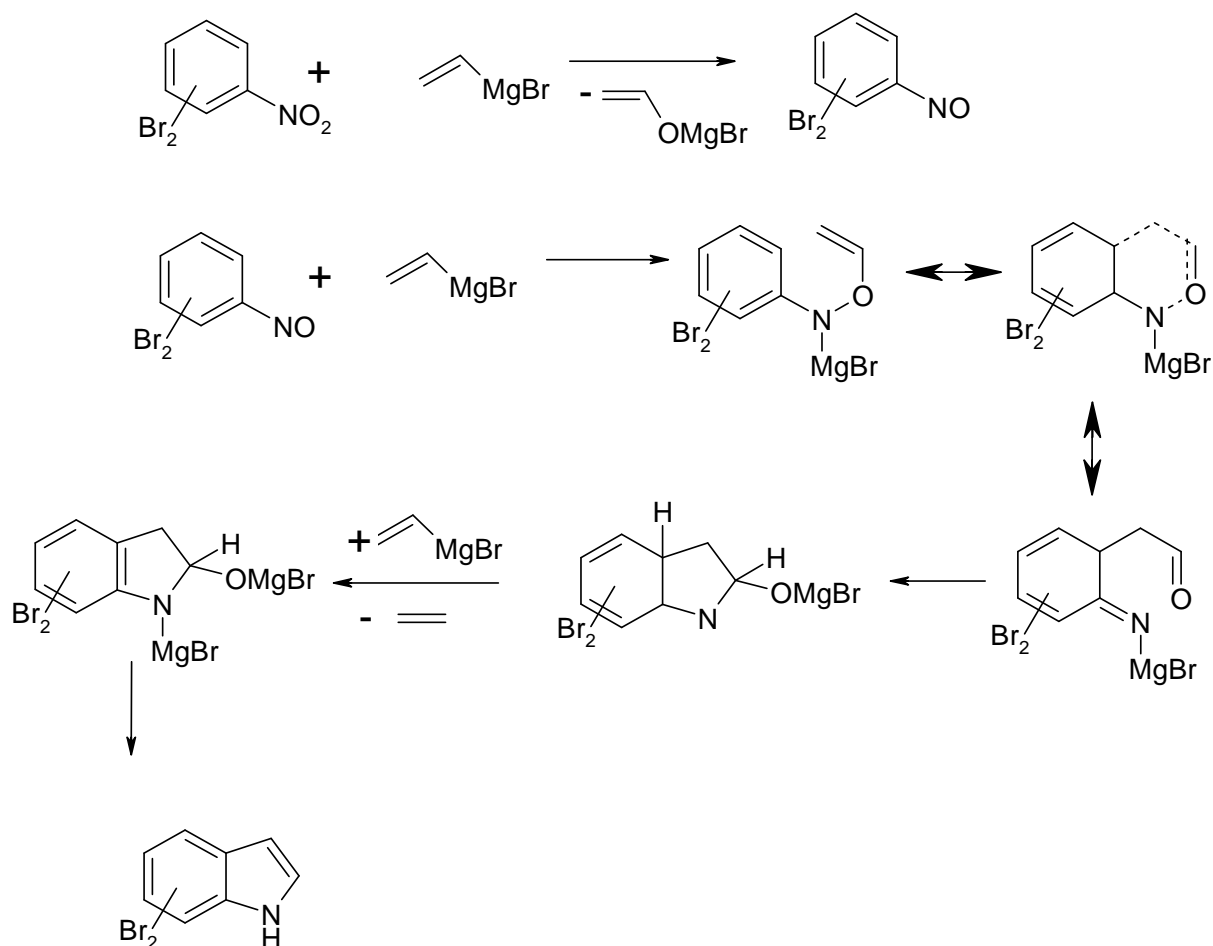


Abbildung 10-1: Synthese der Bromindole nach Bartoli^[121]

Für die Synthese der 3,x-Dibromindole geht man von Bromindolen aus, die am Sechsring bromiert sind (vgl. Abbildung 10-2). Das Dibromindol kann dabei durch Reaktion mit Pyridiniumbromid perbromid in DMF oder durch Brom in DMF erhalten werden^[122,123,124], wobei die Bromierung mit Pyridiniumbromid-Perbromid eine deutlich bessere Ausbeute liefert und der Aufwand bei der Reinigung geringer ist. Als weiterer Vorteil erweist sich, dass es als gut dosierbares Salz vorliegt und man das Arbeiten mit flüssigen Brom vermeiden kann. Zudem hat sich Pyridiniumbromid-Perbromid als gutes Bromierungsreagenz für die Bromierung von Acetalen sowie von schwach basischen Aromaten erwiesen. Die Synthese der 4,x- sowie 5,x- Dibromindole (mit $x \neq 3$) gestaltet sich dagegen weitaus schwieriger und erfordert den Aufbau der Ringe.^[128]

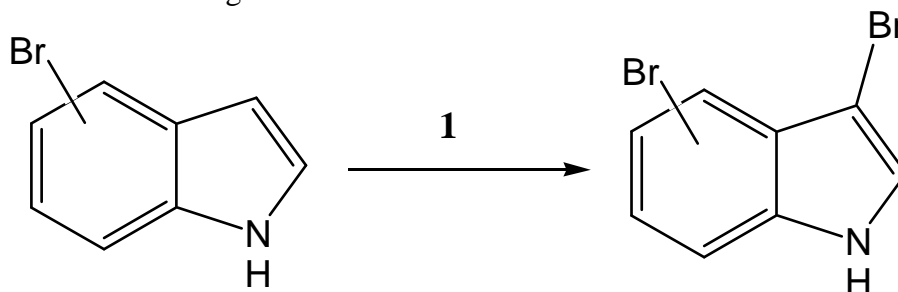


Abbildung 10-2 Darstellung der 3,x-Dibromindole aus Monobromindolen,
1: Pyridiniumbromid perbromid, DMF

10.3. Toxikologische Untersuchungen an unterschiedlich substituierten Bromindolen

Untersucht wurden die eigens synthetisierten 3,4-, 3,5-, 3,6- 3,7-Dibromindole, die nach der Pyridiniumbromid Perbromid-Variante dargestellt wurden. Des weiteren wurden das 4,5-, 4,7-, 5,6-, 5,7-Dibromindol und höher bromierte Indole (vgl. Diplomarbeit A. Josupeit^[118]) dankeswerter Weise durch A. Josupeit zur Verfügung gestellt. Besonderes Interesse galt jedoch dem 3,6-Isomer, das im Nordseesediment nachgewiesen wurde.^[117]

10.3.1. Toxizität in Bakterien

Im Vorfeld wurde für die Di-, Tri- und Tetrabromindole der tolerierbare Dosis-Wirkungsbereich im Zytotoxizitätstest (+/- S9) ermittelt und ein Dosis-Wirkungsbereich von 0.1-15 µg gefunden (Abbildung 10-3). In diesem Dosisbereich lagen somit auch alle Mutagenese-Experimente mit den Dibromindolen. Im Folgenden sollen exemplarisch einige der gewonnenen D/W-Kurven präsentiert und diskutiert werden. Dabei sollen die Unterschiede zwischen dem Bromierungsgrad, stereochemische Einflüsse des getesteten Kongeners sowie die Wirkung des metabolisierenden Systems aufgezeigt werden.

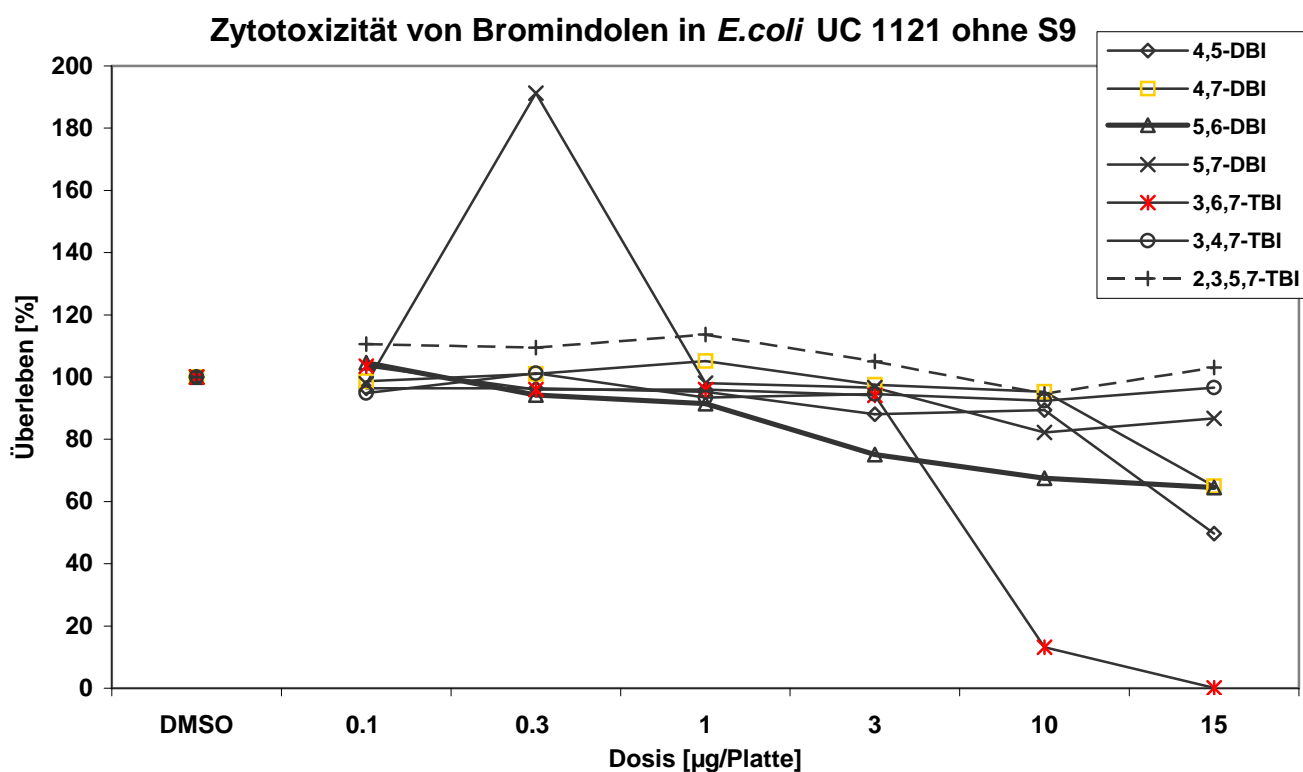


Abbildung 10-3 Zytotoxizitätsexperiment mit dem Bakterienstamm *E. coli* UC 1121 (wt) ohne metabolischer Aktivierung

Wie sich aus der Abbildung 10-3 erkennen lässt, zeigen die meisten Dibromindole im untersuchten Dosisbereich kaum toxische Wirkungen. Eine Ausnahme findet man für das 5,6-Dibromindol und noch ausgeprägter für das 3,6,7-Tribromindol. Dieses zeigt eine sehr starke Abhängigkeit der Toxizität von der Dosis, und man findet ein vollständiges Ausbleiben des Koloniewachstums bei Erreichen der höchsten Dosis. Die übrigen Dibromindole zeigen im Verhältnis nur eine schwach ausgeprägte Dosisabhängigkeit der Toxizität. Hier können nur in den höchsten Dosen eine zunehmende toxische Wirkung beobachtet werden. Einen eindeutigen

Hinweis für die Abhängigkeit der Toxizität vom Bromierungsgrad sowie der Stellung der Bromatome im Bromindol, lässt sich aus diesen Daten nicht ableiten.

Wie sich zeigte, konnten sogar für das 2,3,5,7-Tetrabromindol im gesamten Dosis-Wirkungsbereich keine Anzeichen für eine toxische Wirkung gefunden werden.

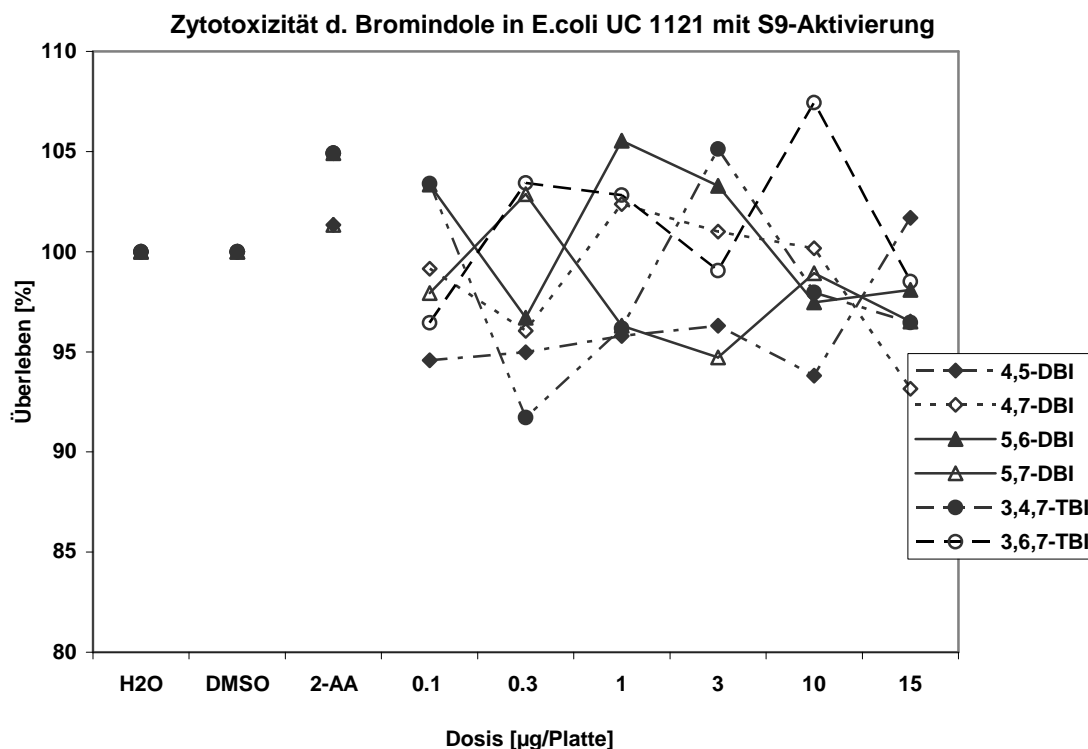


Abbildung 10-4 Zytotoxizität der Bromindole in *E. coli* UC 1121 nach metabolischer Aktivierung; 2-AA: 2-Aminoanthracen

Ein etwas anderes Bild zeigen die Experimente zur Zytotoxizität der Dibromindole nach metabolischer Aktivierung (Abbildung 10-4). Im Gegensatz zur D/W-Kurve der Abbildung 10-3 erscheint diese über den gesamten Dosisbereich mit einem sehr viel uneinheitlicheren Verlauf, der größeren Schwankungen unterlegen ist. Insgesamt zeigen die Experimente, dass nach metabolischer Aktivierung die toxische Wirkung der Bromindole scheinbar "aufgehoben" ist. So lässt sich sogar für das 3,6,7-Kongener, das ohne Verwendung des S9-Mix stark toxisch wirkte, keine Toxizität mehr feststellen. Dieses Resultat lässt sich so deuten, dass entweder Plasmaproteine im metabolisierenden Homogenat das Bromindol gut binden (absorbiert) und folglich keine Metaboliten durch die Bakterienzellen aufgenommen werden können oder aber die Metabolite eine vergleichsweise niedrigere Zytotoxizität aufweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Zytotoxizität (in *E. coli* UC 1121) keine Abhängigkeit vom Bromierungsgrad erkennbar war. So zeigte zwar das 3,6,7-Kongener in der höchsten Dosis einen stärker ausgeprägten zytotoxischen Effekt als z.B. das 4,7-Dibromindol.

Jedoch konnte sowohl für das 3,4,7-Kongener als auch das 2,3,5,7-Kongener keine Steigerung der Zytotoxizität festgestellt werden. Einzelne Bromindole wie z.B. das 3,6,7-Tribromindol zeigten eine starke Zytotoxizität, nicht jedoch das 3,4,7-Kongener. Ähnliches konnte im Falle des 4,5- und 4,7-Kongeners, wenn auch nicht so stark ausgeprägt, gefunden werden. Dies kann als ein Hinweis auf eine Abhängigkeit der Zytotoxizität vom Substitutionsmuster gedeutet werden. Die Verwendung des Rattenleberhomogenats ergab in allen Fällen einen schwächeren bzw. keinen Effekt.

10.3.2. Bakterienmutagenese-Test (Ara-Test)

Die Untersuchungen zur Mutagenität wurden sowohl mit als auch ohne metabolischer Aktivierung durchgeführt. Neben den im vorhergehenden Abschnitt behandelten Bromindolen wurden auch die Syntheseprodukte der 3,x-Dibromindole (x = 4, 5, 6, 7) getestet.

Untersuchungen an Dibromindolen (-S9)

Die D/W-Kurve (Abbildung 10-5) gibt die Mutagenität der 3,x-Dibromindole (x= 4, 5, 6, 7) für den untersuchten Dosisbereich ohne metabolische Aktivierung wieder. Mit Ausnahme des 3,5-Kongeners zeigen alle Isomere eine dosisabhängige Zunahme der zytotoxischen Wirkung, die zwar schwach aber deutlich zunehmend ist.

Die Unterschiede in der Stärke der toxischen Wirkung des 3,6- und 3,7-Kongeners sind nahezu vergleichbar; so kann für das 3,7-Kongener über den gesamten Dosisbereich ein gemittelter Induktionswert angegeben werden, der deutlich unter dem Wert der Lösungsmittelkontrollen liegt. Erst für die Konzentration von 15 µg liegt nur das 3,6-Kongener deutlich unter dem gemittelten Induktionswert des 3,7-Kongeners.

Es konnte sowohl für das 3,4- als auch das 3,6-Kongener zwar kein mutagener Effekt im untersuchten Dosisbereich gefunden werden, jedoch zeigten beide Kongenere ab einer Dosis von 3 µg eine zunehmende Zytotoxizität (Abbildung 10-5). Dieser Sachverhalt ist vergleichbar mit den bisher beschriebenen Ergebnissen zur Zytotoxizität des 5-Bromindols.^[20,39]

Für das 3,5-Kongener kann man eine dosisabhängige Zunahme der Koloniezahl erkennen. Der Effekt liegt jedoch noch unter einer Verdopplung der Koloniezahl relativ zur Spontanmutationsrate (Lösungsmittelkontrolle). Definitionsgemäß kann also davon ausgegangen werden, dass keine mutagene Wirkung vorhanden ist. Insgesamt ist festzustellen, dass für die 3,x-Dibromindole ohne metabolische Aktivierung keine mutagene Wirkung festgestellt werden konnte.

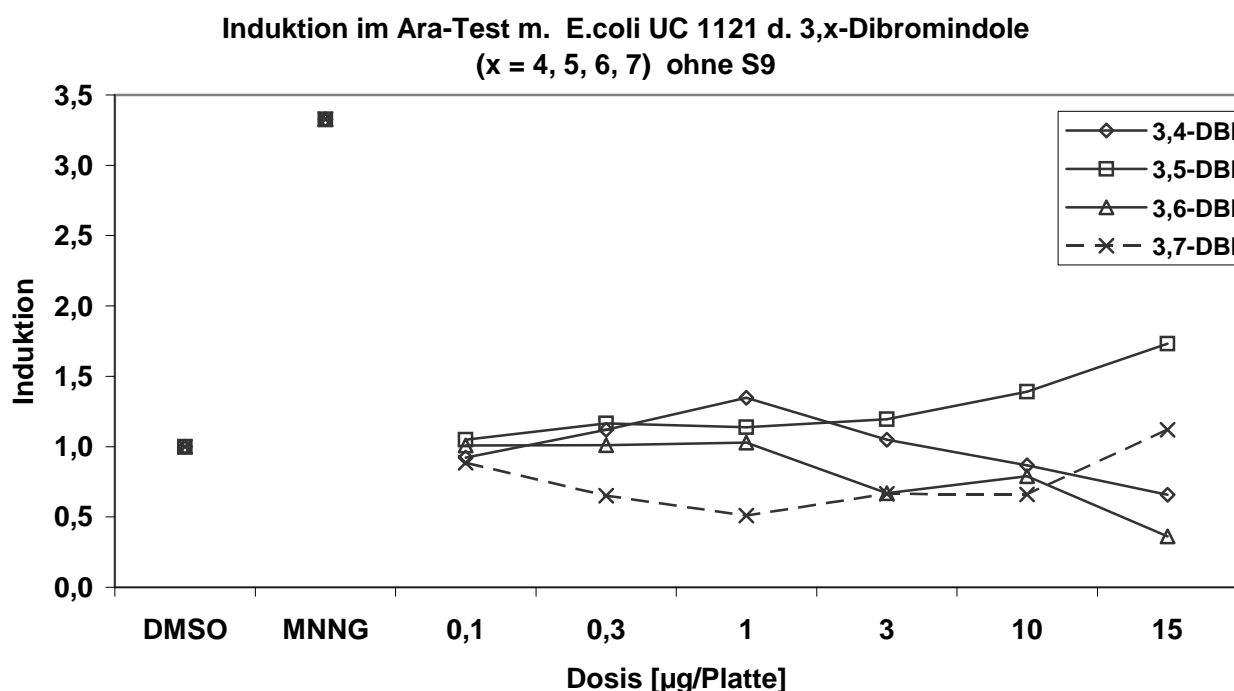


Abbildung 10-5 Mutagenese-Experiment mit dem Bakterienstamm *E. coli* UC 1121 (wt) ohne metabolische Aktivierung; MNNG: N-Methyl-N'-nitronitrosoguanidin

Abweichend von den Ergebnissen der Zytotoxizitätsuntersuchungen, in denen das 4,7- und das 5,6-Dibromindol eine (schwache) Zytotoxizität aufwies, war dies im Mutagenese-Experiment nicht der Fall (Abbildung 10-6).

Prinzipiell wäre für diese Isomere ein toxischer Effekt eher im Mutagenese-Experiment aufgrund des geringeren Nährstoffangebots zu erwarten als im Zytotoxizitätstest. Dies wurde jedoch nicht beobachtet. Die 4, x- und 5, x-Dibromindolisomere zeigten im gesamten Dosisbereich keine signifikante Veränderung der Koloniezahl gegenüber den Lösungsmittelkontrollen, so dass nur von einer schwach toxischen Wirkung, wie sie im Toxizitätstest gefunden wurde (vgl. Abbildung 10-3), ausgegangen werden kann.

Induktionen im Ara-Test d. Dibromindole (-S9)

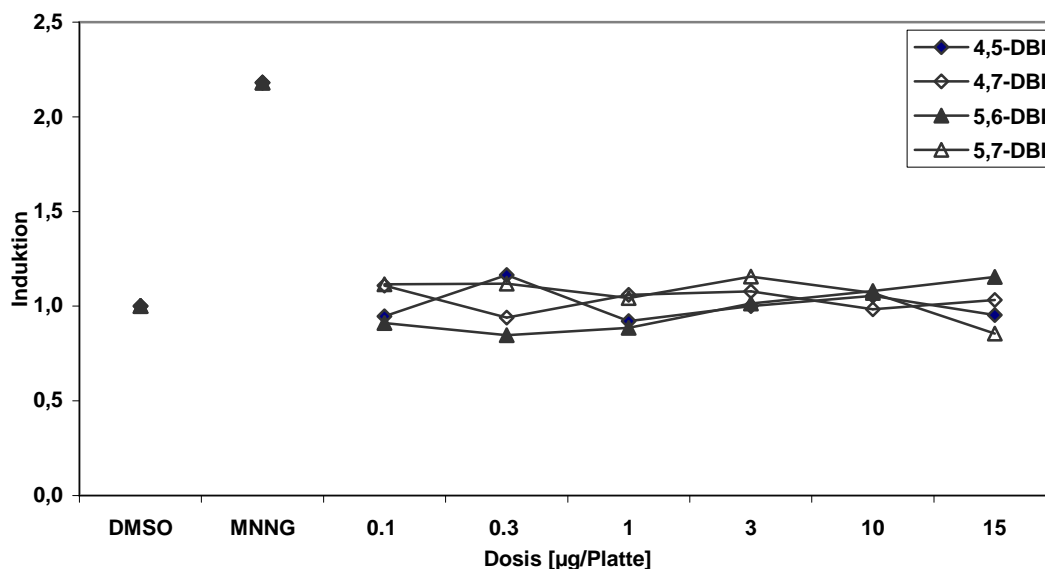


Abbildung 10-6 Mutagenese-Experiment mit dem Bakterienstamm *E. coli* UC 1121 (wt) ohne metabolischer Aktivierung; MNNG: N-Methyl-N'-nitronitrosoguanidin

3,4,7- , 3,6,7-Tribromindol und 2,3,5,7-Tetrabromindol

In Abbildung 10- ist die D/W-Kurve des Ara-Tests der höher bromierten Bromindole dargestellt. Interessant ist das Ergebnis, dass auch in diesem Experiment das 3,6,7-Kongener, ähnlich dem Zytotoxizitätstest (vgl. Abbildung 10-3), das gleiche zytotoxische Verhalten aufweist. So findet man auch in diesem Fall ab einer Dosis von 3 µg eine starke Abnahme der Koloniezahl und damit eine zytotoxische Wirkung.

Induktion im Ara-Test (-S9) für höher bromierte Bromindole

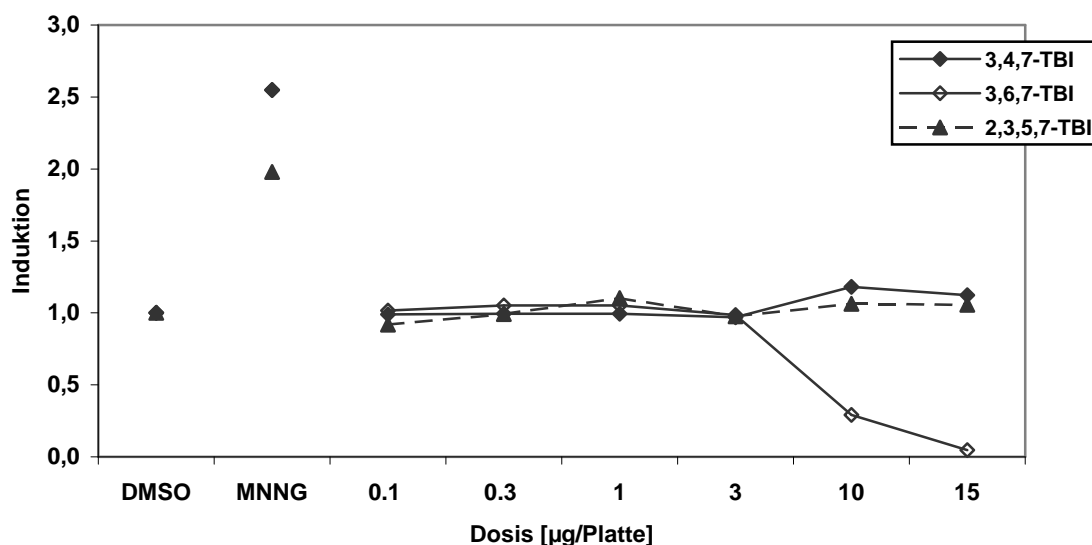


Abbildung 10-7 Induktionen im Ara-Test höher bromierter Bromindole; MNNG: N-Methyl-N'-nitronitrosoguanidin

Auch für das 2,3,5,7-Tetrabromindol muss eine Zytotoxizität diskutiert werden, jedoch ist dies nur mit Vorsicht zu formulieren, da nicht alle Mutagenese-Experimente mit dem Tetrabromindol einen eindeutigen Effekt ergaben. In diesem Fall ist die Stärke des Effektes geringer als für die zuvor besprochenen Bromindole.

10.3.3. Untersuchungen zur Mutagenität nach metabolischer Aktivierung

Vergleicht man wieder das Erscheinungsbild der D/W-Kurven mit und ohne Zusatz des metabolisierenden Homogenats, so fällt wieder, wie im Falle der Untersuchungen zur Zytotoxizität, der uneinheitliche Verlauf der D/W-Kurven nach Zusatz des Homogenats auf. Untersuchungen mit metabolischer Aktivierung wurden ausschließlich mit den 3,x-Dibromindolen ($x = 4, 5, 6, 7$) durchgeführt. Eine schwache Induktion im Dosisbereich von 0,3-1 µg konnte nur für das 3,6-Derivat gefunden werden (Abbildung 10-8).

Betrachtet man die D/W-Kurve für das 3,6-Derivat über den gesamten Dosisbereich, so muß dieser Effekt eher als Außreißer gewertet werden. Für die übrigen Derivate konnte im untersuchten Dosisbereich keine Induktion der Mutagenität festgestellt werden.

Ara-Test (+S9) der 3,x- Dibromindole (x = 4, 5, 6, 7)

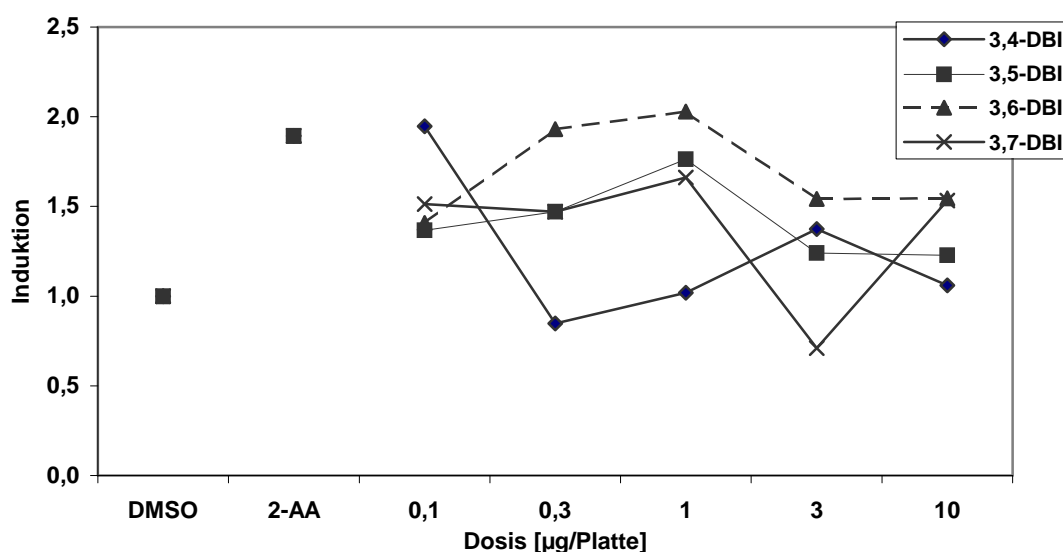


Abbildung 10-8 Mutagenese-Experiment der Dibromindole mit dem Bakterienstamm *E. coli* UC 1121 (wt) und metabolischer Aktivierung; 2-AA: 2-Aminoanthracen

3,4,7-, 3,6,7-Tribromindol und 2,3,5,7-Tetrabromindol Mutagenese-Experimente mit metabolischer Aktivierung ergaben weder für die Tribromderivate noch für das Tetrabromderivat einen Effekt.

10.3.4. EROD-Test

Die D/W-Kurve des EROD-Tests (vgl. Abbildung 10-9) gibt die gebildete Menge des CYP-450 1A1, ausgedrückt als Konzentration des gebildetem Resorufin pro µg Protein (RFU/µg Protein), in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentrationen der Bromindole wieder. Es wurde für den Konzentrationsbereich von 0,5% - 0,03 % Bromindol (1 mg/ml) im Medium getestet.

Aus der Abbildung 10-9 geht zunächst hervor, dass für einige der Bromindole die Induktion des CYP-450 1A1 eine dem 2,3,7,8-TCDDs vergleichbare Induktionsstärke aufweist (gestrichelte, horizontale Linie als Referenzwert). Hierbei zeigte sich, dass das 3,6- und das 3,7-Dibromindol sowie das 3,4,7-Tribromindol und das 2,3,5,7-Tetrabromindol einen deutlichen Anstieg des CYP-450 1A1 Spiegels ergaben. Die Darstellung zeigt, dass sich für das 3,6-Isomer die höchste Induktion bei einem Anteil von 0,5% im Medium (entsprechend 1,81 mM) einstellt und über den Dosisbereich rasch abfällt. Bei dieser Dosis zeigte sich gegenüber den anderen Isomeren auch die stärkste Induktion überhaupt. Das 3,7-Isomer wies eine ähnliche Dosis-Wirkungsabhängigkeit wie das 3,6-Isomer auf, jedoch mit einer insgesamt schwächer ausgeprägten Induktion. Die höher bromierten Indole ergaben eine untereinander vergleichbare Induktion, die in den höchsten Dosen deutlich unter denen des 3,6- und 3,7-Dibromindols lagen. Es scheint also, dass die gefundenen Effekte in der Stärke mit dem des 2,3,7,8-TCDDs gut vergleichbar sind. Jedoch muss hervorgehoben werden, dass die Induktion stark konzentrationsabhängig ist. Explizit bedeutet dies, dass es zum Erreichen eines dem 2,3,7,8-TCDD vergleichbaren Induktionswerts einer weitaus höheren Konzentration an Dibromindol bedarf.

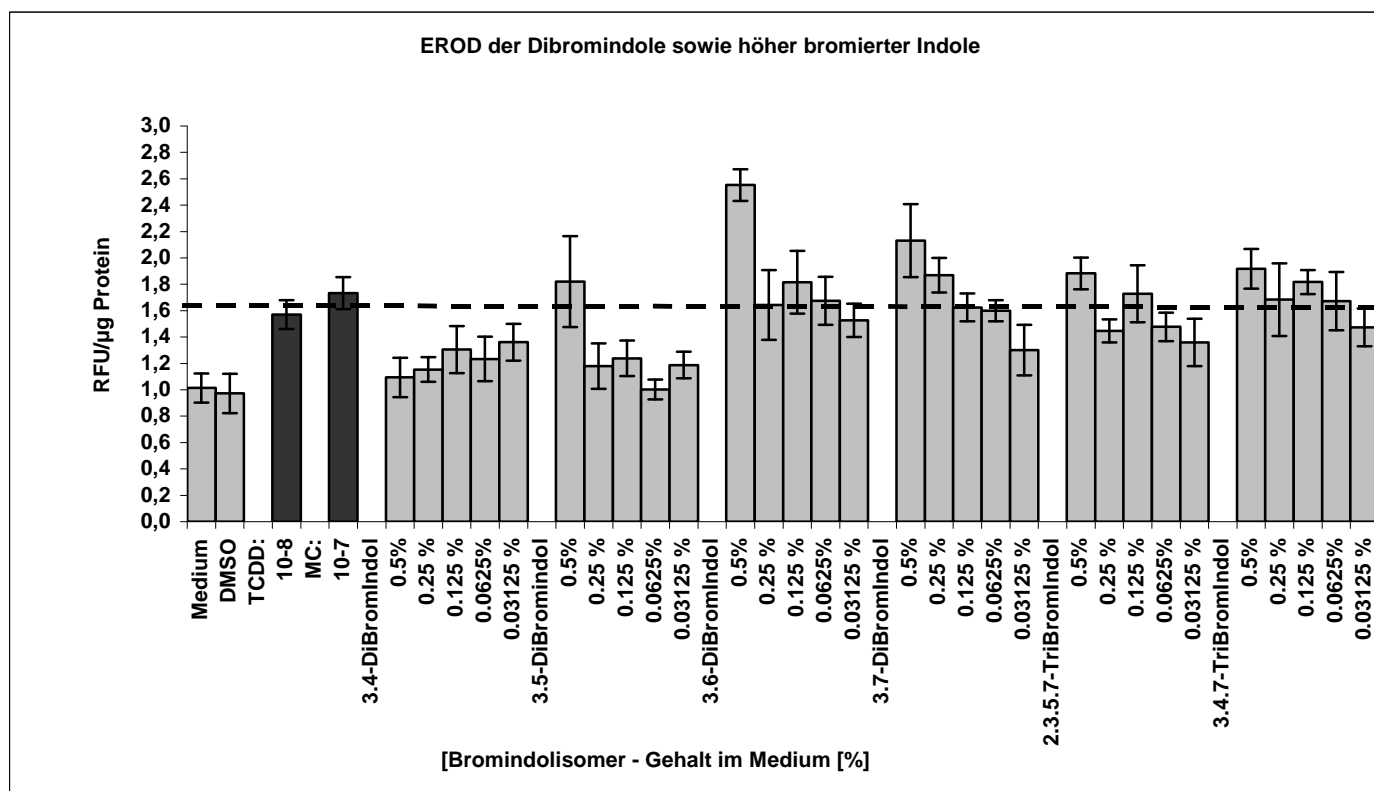


Abbildung 10-9: EROD-Test der Bromindole; MC: Methylcholanthren; 2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-Kongener

Der Effekt des 2,3,7,8-TCDDs ist sehr schwach gegenüber der Kontrolle ausgefallen und somit ist keine Aussage zur Potenz der Bromindole möglich. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die verwendeten Zellen nicht die optimale „Fitness“ aufwiesen wie sich auch anhand des Induktionswertes von Methylcholanthren ablesen lässt. Man erkennt jedoch aus der D/W-Kurve, dass insbesondere das 3,6-Dibromindolkongener eine deutliche Erhöhung der Induktionsrate und somit einen deutlichen Effekt zeigte, der denjenigen von 2,3,7,8-TCDD übertraf. Die Untersuchung weiterer Dibromindolkongener (4,5-, 4,7-, 5,6-, 5,7-) sowie einiger Tribromindole (3,6,7-, 3,4,7-) im EROD-Test ergab keine messbare Induktion des CYP-450 1A1 im untersuchten Dosisbereich, so dass auf die Darstellung dieser Ergebnisse hier verzichtet wurde.

10.3.5. Extraktion & Charakterisierung von Dibromindolmetaboliten nach Inkubation mit Rattenleberhomogenat

Um die metabolischen Transformationen von Xenobiotika im Menschen *in vitro* zu simulieren wurden Metabolisierungsexperimente mit den 3,x-Dibromindolen (x = 4, 5, 6, 7) unter Zusatz von Rattenleberhomogenat (S9) durchgeführt. Die Ergebnisse werden im Folgenden präsentiert. In diesem Zusammenhang soll auf die Unterschiede der Metabolisierung der einzelnen Kongener eingegangen werden. Die Aufmerksamkeit gilt vor allem den Kongeneren, für die in dem Bakterienmutagenese-Experiment und dem EROD-Test (s.u.) ein Effekt gefunden wurde, insbesondere dem 3,6-Isomer.

Blindwert

Zur Bestimmung extrahierbarer Komponenten aus dem S9-Mix wurde ein Ansatz, bestehend aus DMSO und S9-Mix, mit Ethylacetat extrahiert und per GC/MS vermessen. Dieser Ansatz wurde unter gleichen Bedingungen wie die Inkubationsansätze der 3,x-Dibromindole (x = 4,...,7) behandelt. Wie sich zeigte, wurde eine Substanz extrahiert, bei der es sich wahrscheinlich um das Nicotinamid (3-Pyridincarboxamid) handeln dürfte.

Dieses dürfte aus dem dem Inkubationsansatz beigefügten Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) durch Hydrolyse entstanden sein.

Metabolite des 3,4-Dibromindols

Die GC-FID- und GC/MS-Analyse des Inkubats zeigte, dass neben dem 3,4-Dibromindol zwei bromierte Verbindungen auftreten. Durch Vergleich der Retentionsindices mit bekannten Monobromindolen konnte eine der bromierten Verbindungen als 3-Bromindol identifiziert werden (Abbildung 10-10). Wie sich aus dem Vergleich der GC/MS-Analyse des 3,4-Dibromindol-Inkubats mit dem vom 3,6-Dibromindol herausstellte, bildet sich in beiden Fällen das 3-Bromindol.

3,4-DBI Metabolit.JDX *
MaxE2 SumE3
RI 23759 39604

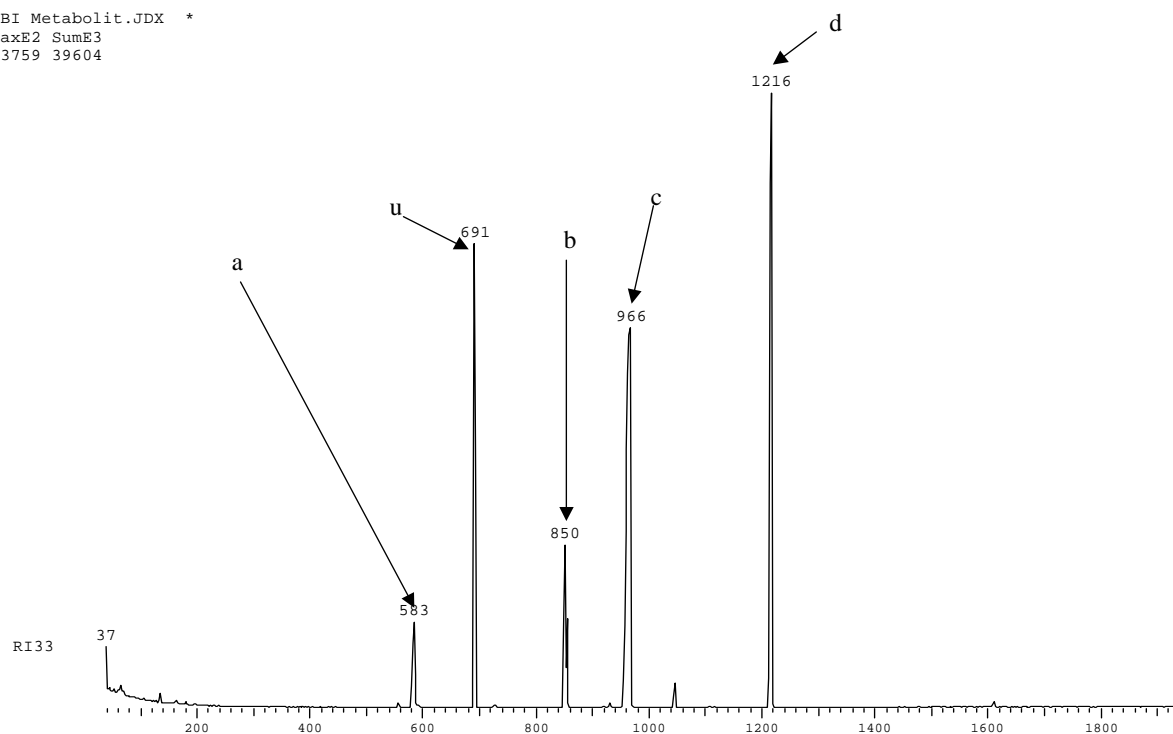


Abbildung 10-10 TIC des Inkubats von 3,4-DBI; a: 3-Pyridincarboxamid (MS); b:3-Bromindol; c:unbekannt(2); d: 3,4-Dibromindol; u:unbekannt

In Abbildung 10-11 sind die Massenspektren der unbekannt Verbindungen (Scan-Nr. 691) und (Scan-Nr. 964) aus dem Inkubat des 3,4-Dibromindols wiedergegeben.

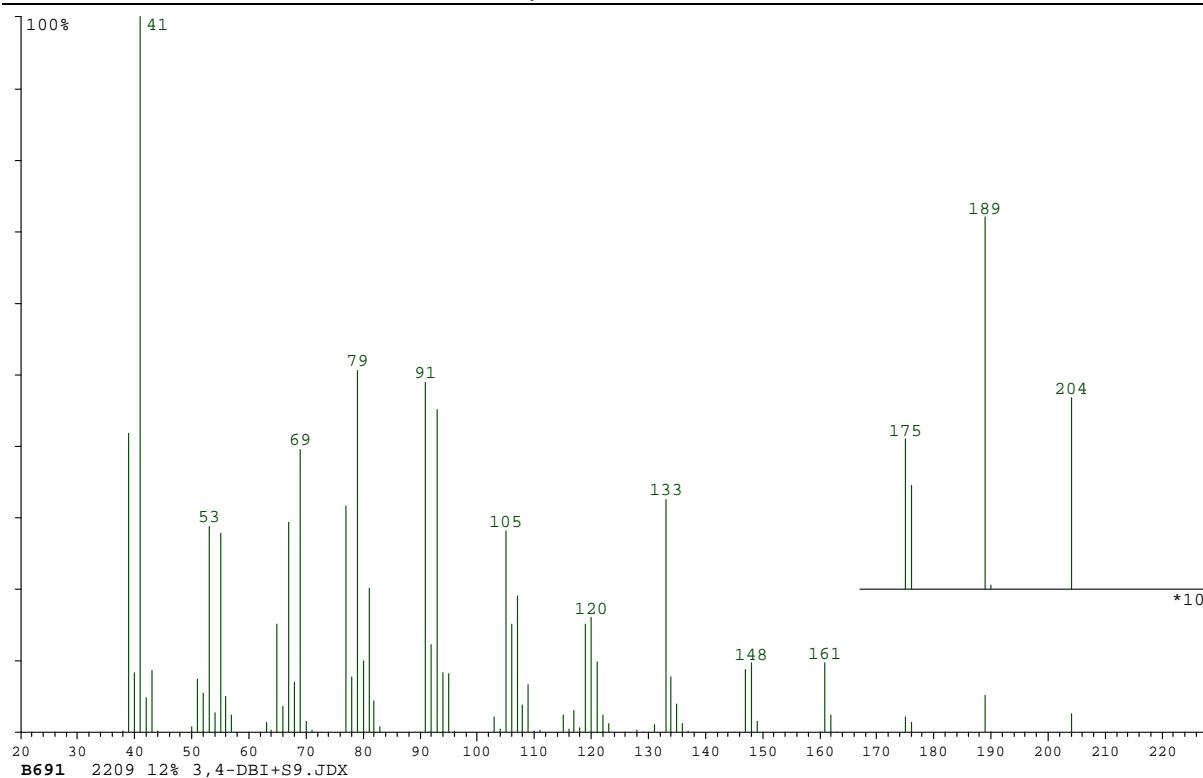


Abbildung 10-11 Massenspektrum der unbekanntes Verbindung (San-Nr. 691) im Inkubat des 3,4-Dibromindols

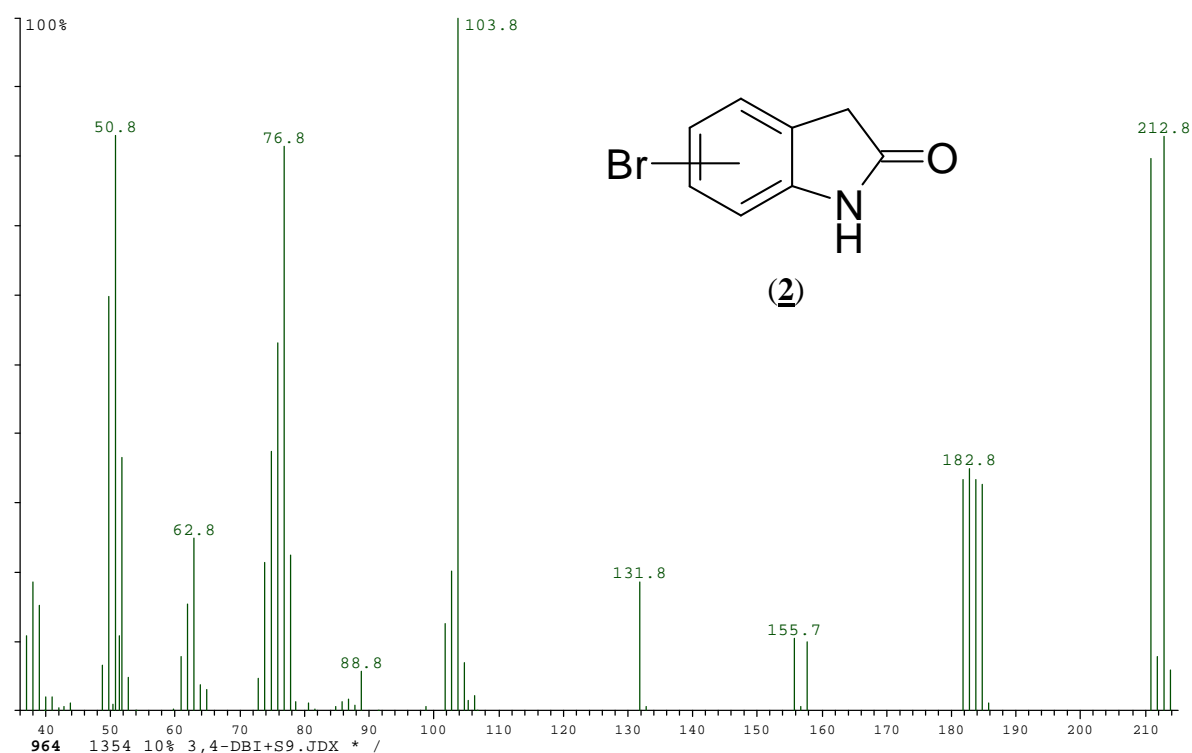


Abbildung 10-11 (Forts.) Massenspektrum der unbekanntes(2) (Scan-Nr. 964) im Inkubat des 3,4-Dibromindols mit der wahrscheinlichen Struktur (2)

Aus dem Fragmentierungsmuster des Massenspektrums ließen sich folgende Information ableiten: das Moleküllion hat die Masse 211, enthält ein Brom- sowie ein Stickstoffatom und spaltet m/z 28 Massen ab. Die Abspaltung von m/z 28 Massen ($211 \rightarrow 182$) entspricht einer Abspaltung von CO, so dass es sich wahrscheinlich um ein Oxindolsystem handeln muss.

Vergleicht man diese Fragmentierung mit der des Oxindols^[125], so findet man für das Oxindol eine Abspaltung von m/z 29 Massen, was formell einem protonierten CO entspricht. Diese Fragmentierung ist also in beiden Fällen, bezogen auf die Abspaltung von CO, ähnlich. Das Isotopenmuster des Fragments der Masse m/z 182 zeigt, dass noch Brom enthalten sein muss (Abbildung 10-12). Der Basispeak der Masse m/z 104 weist kein Brom auf und hat wahrscheinlich die Struktur:

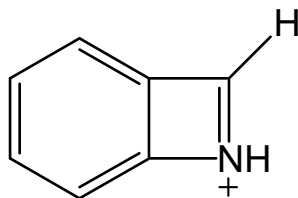


Abbildung 10-12 Wahrscheinliche Struktur des Fragments der Masse m/z 104

Interessant ist das Fragment der Masse m/z 156, das noch Brom aufweist. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Brombenzol, das aus dem Oxindol wie folgt entstanden sein könnte:

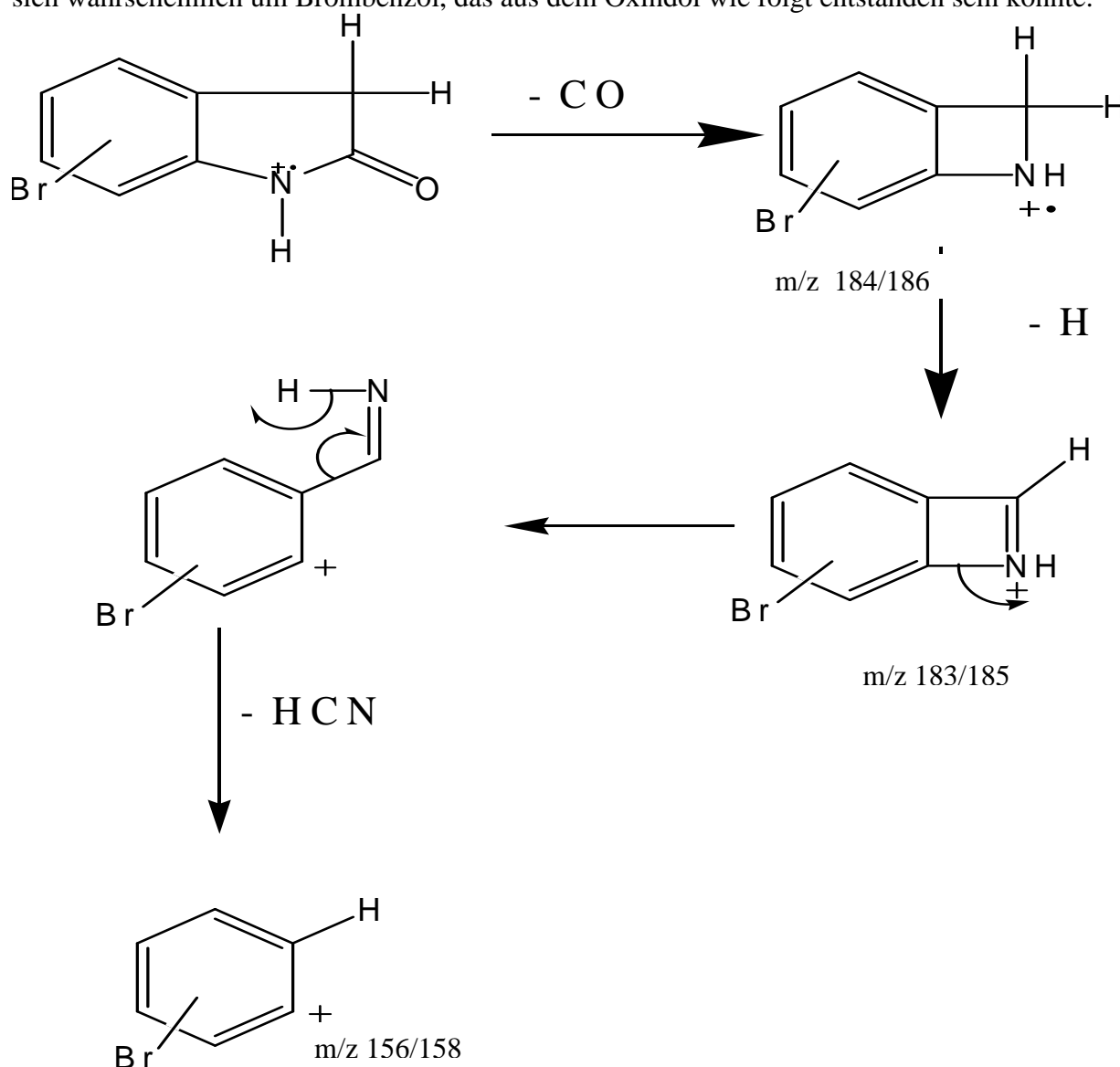


Abbildung 10-13 Mechanismus der Fragmentierung eines Oxindols nach ^[125]

Interessant ist die Frage nach der Position des Bromatoms. Es kann entweder in der 3-Position sein oder aber im annelierten Sechsringsystem.

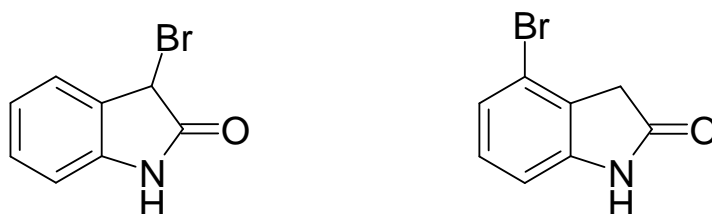


Abbildung 10-14: Mögliche Strukturen für den Metaboliten (Scan 964)

Gegen eine Substitution in der 3-Position spricht das Fragment der Masse m/z 156, für das die Struktur des Brombenzols postuliert wurde.

Um polarere Komponenten zu erfassen, die durch Hydroxylierung durch das Leberhomogenat entstanden sein könnten, wurde der Extrakt mit Diazomethan versetzt. Die GC-FID Analyse des Extrakts nach Derivatisierung mit Diazomethan zeigte aber keine wesentlichen Veränderungen in der Zusammensetzung gegenüber dem underivatisierten Inkubat.

Weiterhin fällt beim Vergleich der Peakfläche des Dibromindols mit den anderen Kongeneren auf, dass eine deutliche Abnahme der relativen Konzentration des Dibromindols erfolgte. Dies kann so gedeutet werden, dass das 3,4-Kongener deutlich besser metabolisiert wird als die übrigen.

Metabolite des 3,5-Dibromindols

Im Gegensatz zum 3,4-Dibromindol zeigte dieses Kongener kaum Metabolite und das TIC zeigt als Hauptkomponente nur das Dibromindol (Abbildung 10-15). Diese lagen in deutlich geringerer, relativer Konzentration vor als beim 3,4-Kongener. Wie sich jedoch aus dem Vergleich der Ionenspuren des Inkubats mit denen des 3- bzw. 5-Bromindols ergibt, entstehen auch diese in geringer Menge (Abbildung 10-16 und 10-17). Weiterhin wurde ein monobromiertes Produkt mit bislang unbekannter Struktur (Scan 997) gefunden.

P020605B.JDX

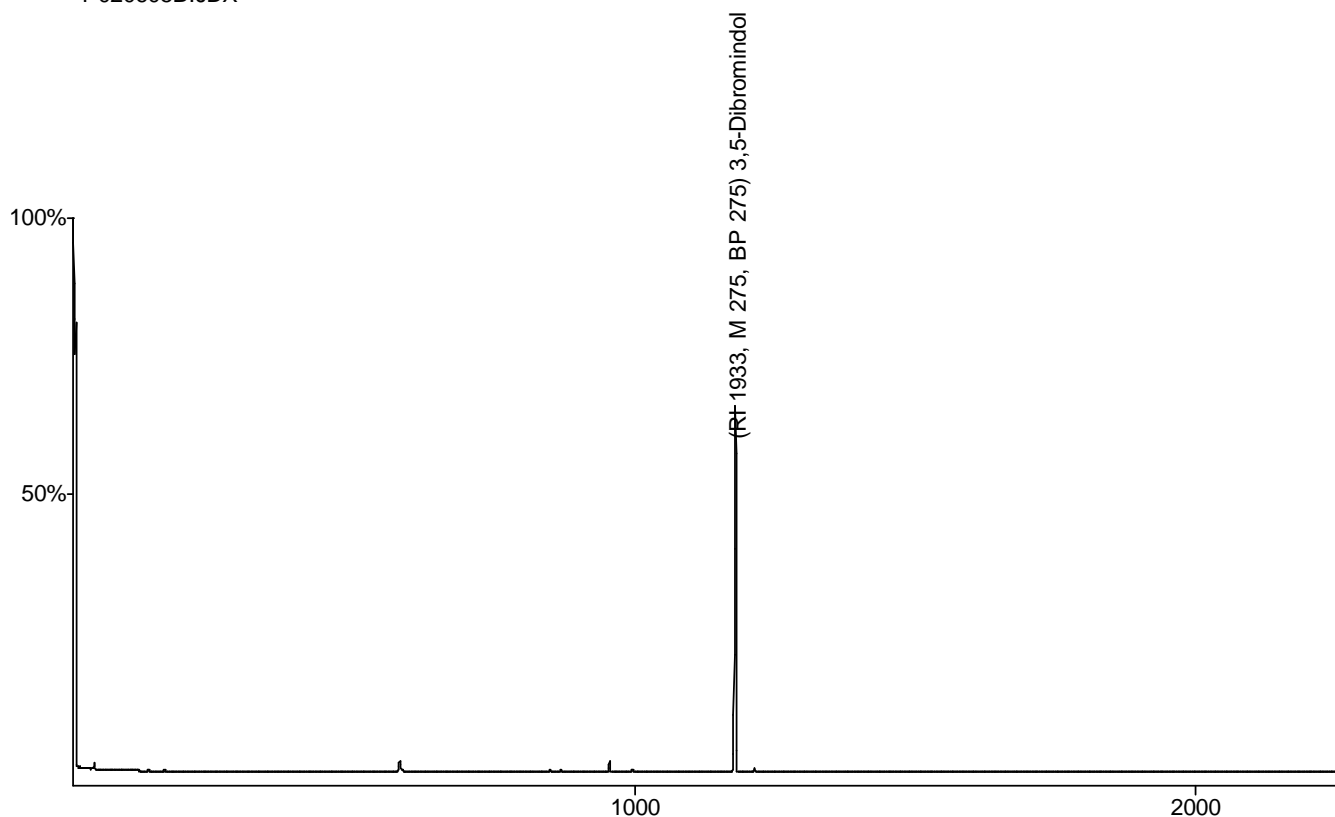


Abbildung 10-15: TIC des Inkubats vom 3,5-Dibromindol

S9-35DBI.JDX *
 MaxE2 SumE4
 RI 2563 343
 RI 44708 20201

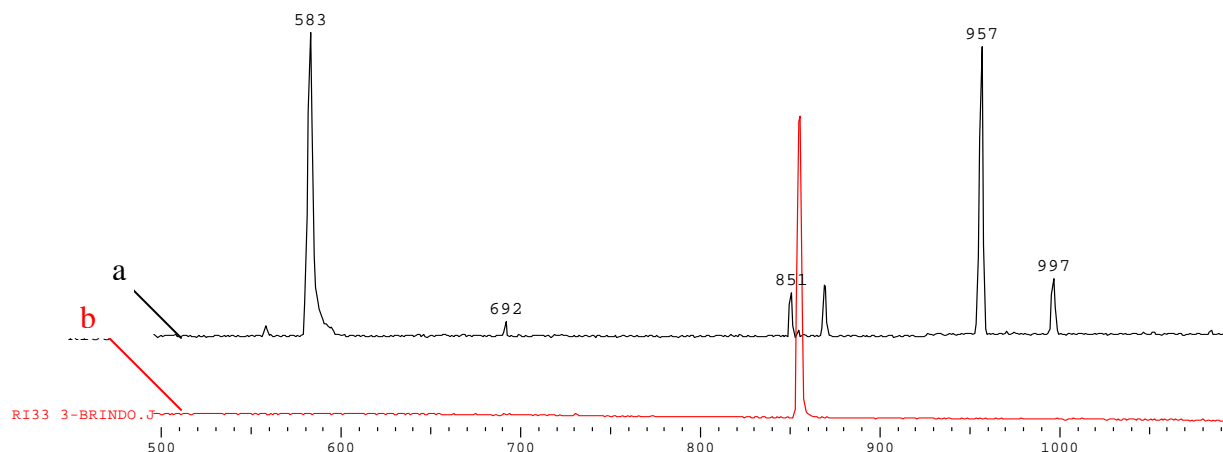


Abbildung 10-16 Vergleich der TIC des Inkubats vom 3,5-Dibromindol (a) mit dem Standard des 3-Bromindols (b) Scan-Nr. 583: 3-Pyridincarboxamid (MS?); 957: 4-Bromoxindol (??); 997: 5-Bromoxindol (??)

S9-35DBI.JDX *
 MaxE2 SumE3
 RI 2563 3431
 RI 29014 10407

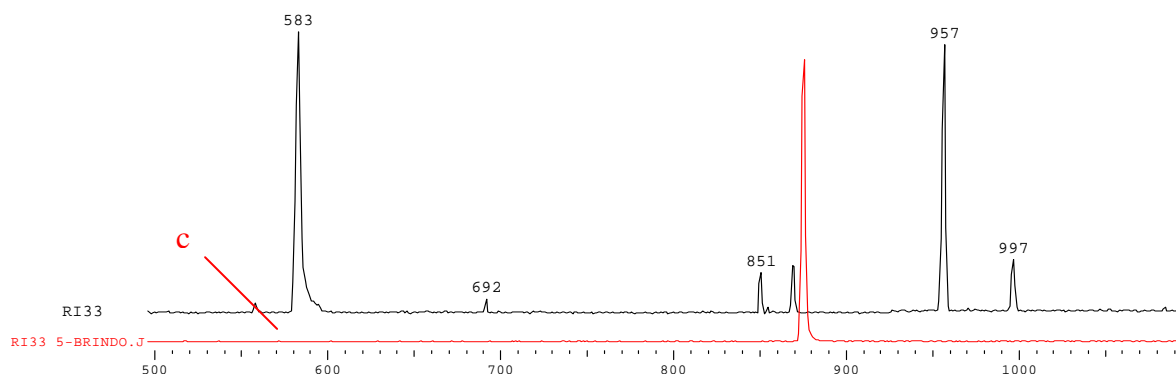


Abbildung 10-17 Vergleich der TIC des Inkubats vom 3,5-Dibromindol mit dem Standard des 5-Bromindols (c) Scan-Nr.:583: 3-Pyridincarboxamid (MS); 957: 4-Bromoxindol (??); 997: 5-Bromoxindol(??)

In geringerer Konzentration als die Metabolite 3- bzw. 5-Bromindol konnte ein weiterer Metabolit nachgewiesen werden (Abbildung 10-18), der ähnlich dem 4-Bromoxindol (2), wohl ebenfalls ein oxigeniertes Bromindol darstellt.

Bei dem Metaboliten der Scannummer 957 dürfte es sich, ähnlich wie bei dem 3,4-Dibromindol, auch um das 4-Bromoxindol handeln. Der zweite Metabolit (Scan 997) dürfte das 5-Bromoxindol sein.

Auffällig im Massenspektrum des Metaboliten (Scan-Nr. 997) ist die Intensität des Fragmentations der Masse m/z 104, die gegenüber dem des 4-Bromoxindols deutlich niedriger ist. Es ist anzunehmen, dass hier ein anderer Fragmentierungsmechanismus eine Rolle spielt, für den eine andere Struktur zu postulieren ist.

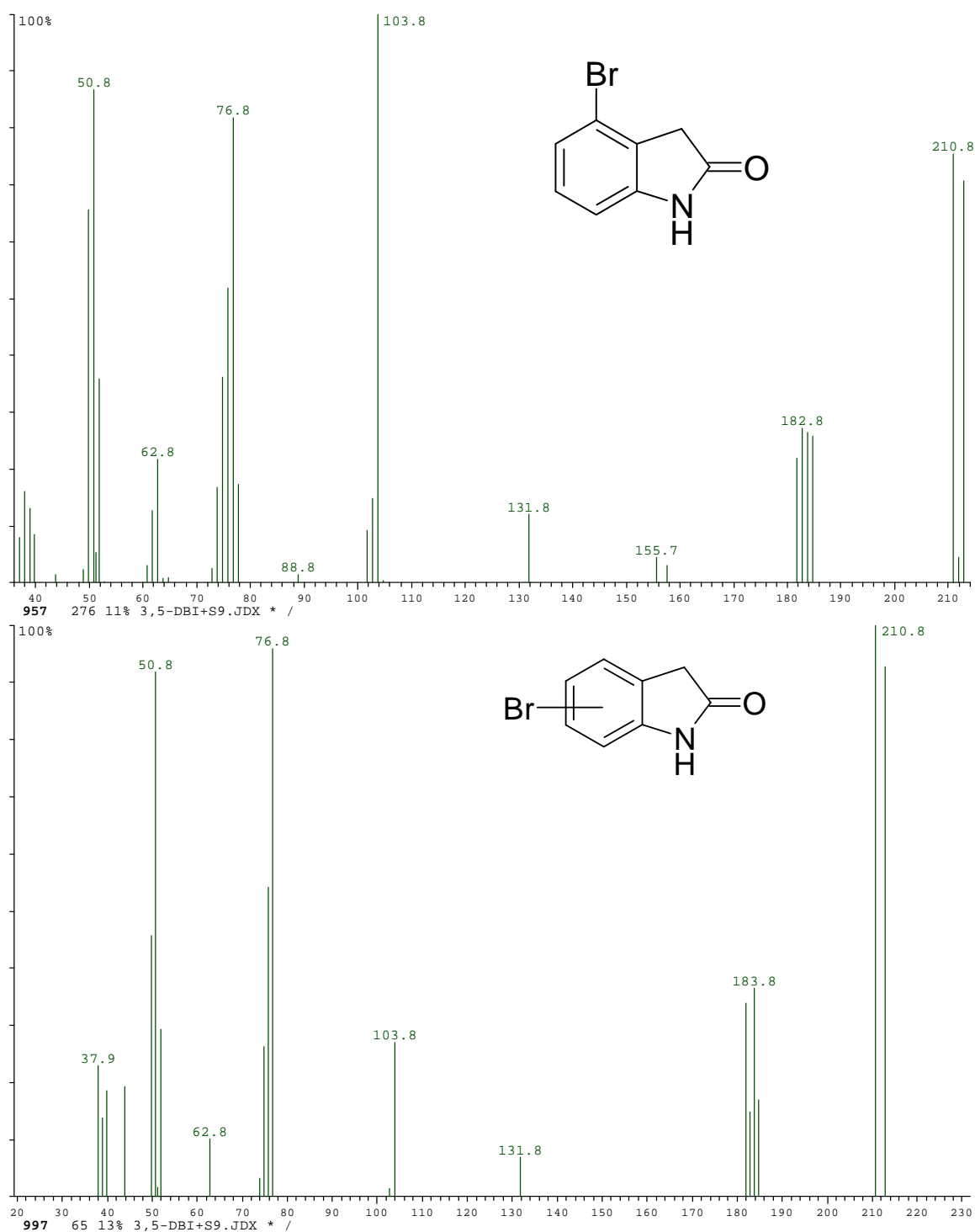


Abbildung 10-18: Massenspektren der Metaboliten mit den Scan-Nr 957 (oben) und 997 aus 3,5-Dibromindol

Metabolite des 3,6-Dibromindols

Ein Vergleich der TIC des GC/MS-Laufs des 3,6-Derivats mit dem 3,4-Derivat, ergab einen deutlich höheren Anteil an Substanzen, die früher eluieren. Neben nicht umgesetztem 3,6-Dibromindol wurde 3- und 6-Bromindol gebildet (vgl. Abbildung 10-19 und 10-20).

Im Vergleich zum 3,4-Kongener entstand das 3-Bromindol jedoch in deutlich niedrigerer Konzentration. Eine Bildung des 3-Bromoxindols wurde hier nicht gefunden. Die Derivatisierung mit Diazomethan ergab keinerlei Veränderungen im Gaschromatogramm. Somit konnte das 3-Bromindol als Metabolit nach Behandlung des 3,4- und 3,6-Dibromindols mit Rattenleberhomogenat eindeutig identifiziert werden.

S9-36DBI.JDX *
MaxE2 SumE4
RI 2344 255
RI 44708 18527

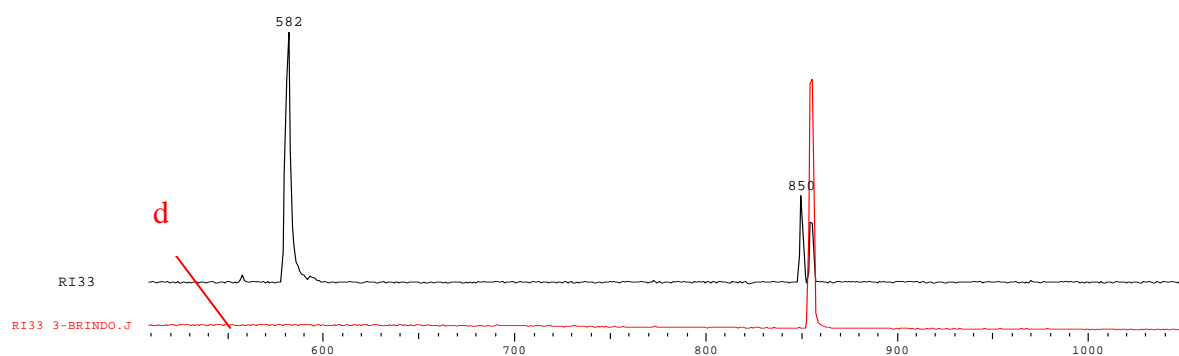


Abbildung 10-19 Vergleich des TIC des Inkubats von 3,6-Dibromindol mit dem Standard des 3-Bromindols (d); Scan-Nr. 582: 3-Pyridincarboxamid (MS)

S9-36DBI.JDX *
MaxE1 SumE2
RI 23439 25527
RI 18828 31443

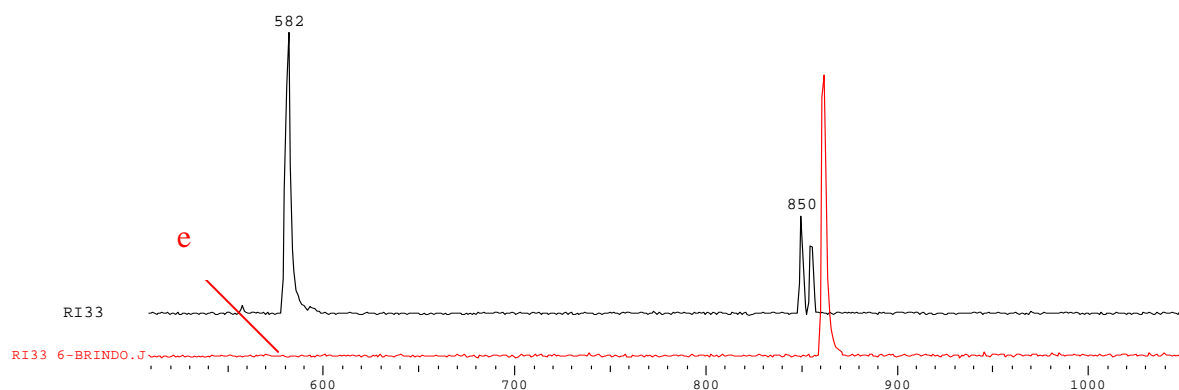


Abbildung 10-20 Vergleich des TIC des Inkubats von 3,6-Dibromindol mit dem Standard des 6-Bromindols (e) Scan-Nr. 582: 3-Pyridincarboxamid (MS)

Metabolite des 3,7-Dibromindols

Neben dem 3,7-Dibromindol konnte im TIC (Abbildung 10-21) eine weitere Substanz (Scan-Nr. 697) aufgezeigt werden, die wesentlich früher als das 3,7-Dibromindol eluierte. Zu dem Zeitpunkt wurde aufgrund der bislang erhaltenen Ergebnisse für das 3,4- und das 3,6-Kongener postuliert, dass nach Metabolisierung ausschließlich der Metabolit 3-Bromindol entsteht. Der Vergleich der Retentionsindices des Inkubats zeigte jedoch, dass eine Übereinstimmung mit den dargestellten Ergebnissen nicht vorlag und ein anderer Metabolit entstanden sein muss. Die GC/MS Analyse ergab nach Vergleich mit der Referenzsubstanz für diesen Metaboliten eindeutig das 7-Bromindol (Abbildung 10-22).

```
S9-37DBI.JDX *
MaxE3 SumE4
RI 10729 12689
RI 42191 16957
```

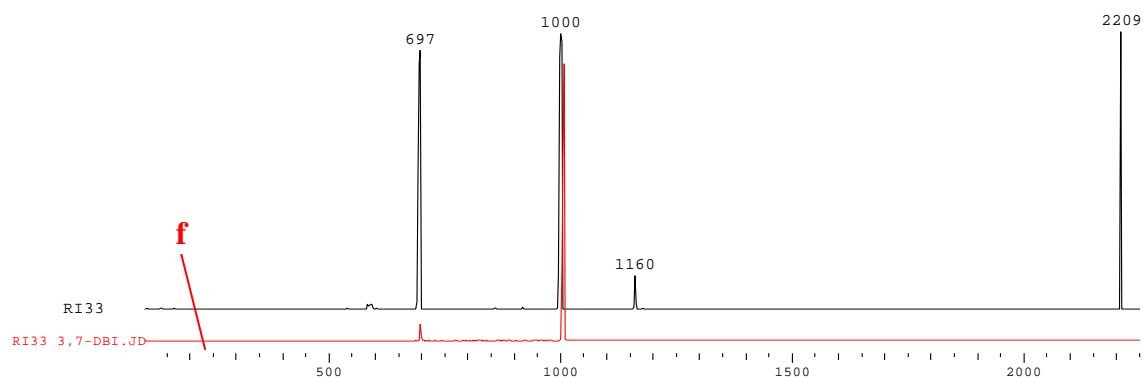


Abbildung 10-21 Vergleich des TIC des Inkubats von 3,7-Dibromindol mit dem Standard des 3,7-Dibromindols (f)

S9-37DBI.JDX *
 MaxE3 SumE4
 RI 10729 12570
 RI 38894 15051

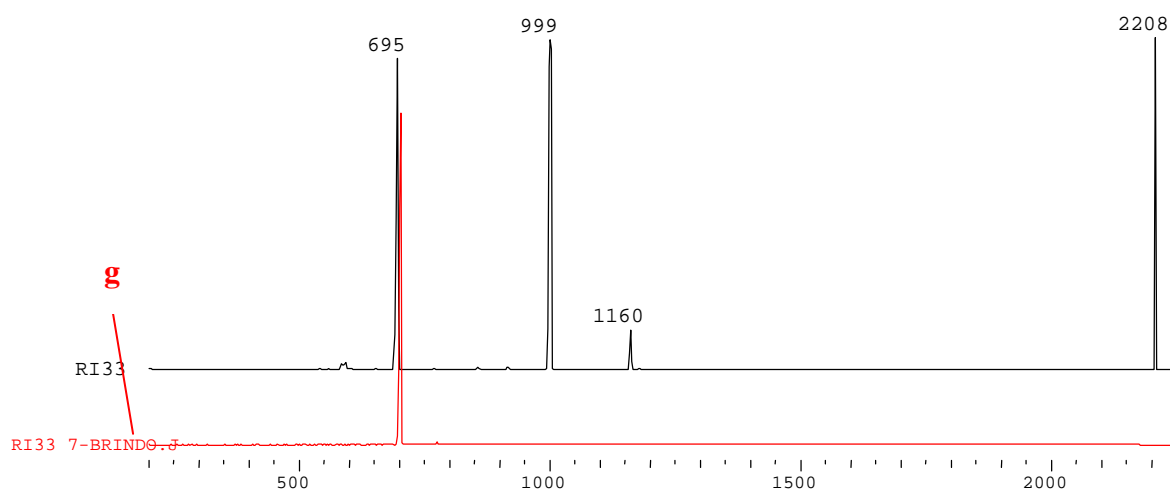


Abbildung 10-22 Vergleich des TIC des Inkubats von 3,7-Dibromindol mit dem Standard des 7-Bromindols (g)

Im Gegensatz zu den bisherigen Metabolisierungsreaktionen, in denen die Monobromindole einen eher marginalen Anteil im Inkubat aufwiesen, konnte für die Metabolisierung des 3,7-Dibromindols ein wesentlich größerer Anteil an Monobromindol im Inkubat nachgewiesen werden.

Precursor	RI des Dibromindols	RI der Metaboliten
3,4-Dibromindol	1977	1952 (Oxindol?), 1784 (3-Bromindol)
3,5-Dibromindol	1933	1784 (3-Bromindol) , 1810 (5-Bromindol) 1938 (Oxindol?)
3,6-Dibromindol	1913	1784 (3-Bromindol), 1790 (6-Bromindol)
3,7-Dibromindol	1728	1579 (7-Bromindol)

¹: Gemessen am FID mit den im exp. Teil angegebenen Bedingungen

Tabelle 10-1: Retentionsindices der Dibromindole und deren Metaboliten

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Inkubationsexperimente mit Rattenleberhomogenat (S9-Mix) wiederholt gezeigt haben, dass für die 3,x-Dibromindole zwei wesentliche Metabolite gefunden werden konnten. Es stellte sich heraus, dass die Metabolisierung der Dibromindole in Abhängigkeit von der Stellung des Broms in unterschiedlichem Maße zu den in der Abbildung 10-23 wiedergegebenen Metaboliten führt. Durch die Synthese des 3-Bromindols (**1**) konnte dieses als Metabolit belegt werden. Dagegen stellt die Bildung des 4-Bromoxindols (**2**) bzw. 5-Bromoxindols eine vorläufige Hypothese dar, die es noch durch Koinjektion mit Referenzsubstanzen zu beweisen gilt. Im Zusammenhang mit der Bildung des 4-Bromoxindols aus dem 3,5-Dibromindol ergibt sich eine interessante Frage. Die Zusammenhänge der Metabolite sind in der Abbildung 10-23 zusammengefasst.

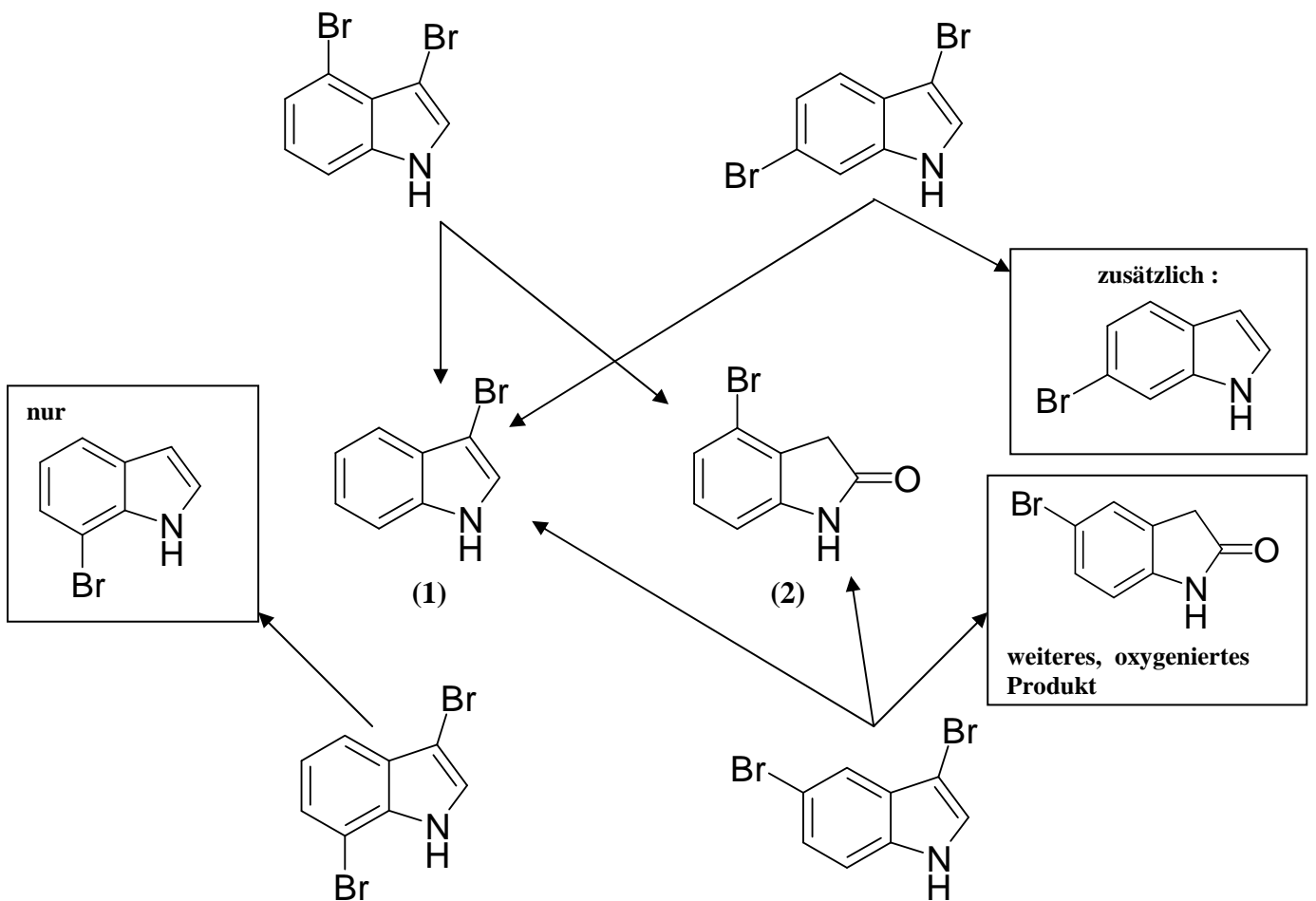


Abbildung 10-23: Metabolisierung von 3,x-Dibromindolen

Der endgültige Beweis für die Bildung des 4- bzw. 5-Bromoxindols (Abbildung 10-17) konnte bislang nicht erbracht werden, dessen Synthese steht noch aus.

11. Diskussion

11.1. Biologische Testsysteme

Die Verwendung bakterieller Testsysteme zur Untersuchung genotoxischer Inhaltsstoffe in Umweltmedien bietet zwei Vorteile. Einerseits gestaltet sich der Einsatz dieser Testorganismen gegenüber Säugerzellen vom experimentellen Aufwand recht einfach und liefert zudem in kurzer Zeit Ergebnisse. Deshalb lassen sich bakterielle Kurzzeit-Mutagenesetestsysteme für Screening-Untersuchungen einsetzen, die eine schnelle Abschätzung des genotoxischen Potentials von z.B. Umweltproben erfordern. Zum anderen können durch die parallele Verwendung verschiedener, genetisch modifizierter Bakterienstämme unterschiedliche genotoxische Wirkmechanismen erfasst werden. Dies wurde durch die Verwendung des Ames-Tests realisiert, mit dessen Hilfe eine Detektion des Mutationstyps möglich ist.

Weiterhin ist eine Vielzahl von Substanzen erst nach metabolischer Aktivierung mutagen wirksam. Wie sich jedoch in dieser Arbeit zeigte, kann der Zusatz des metabolisierenden Systems (S9-Mix) die mutagenen und toxischen Eigenschaften auch drastisch herabsetzen. Infolge der Bindung an Plasmaproteine kann die Wirkung des Agens ausbleiben, so dass dieses als nicht mutagen (bedenklich) eingestuft werden könnte.

Obschon die bakteriellen Testsysteme eine schnelle Einschätzung des genotoxischen Potentials von Umweltproben im Rahmen von Screening-Untersuchungen ermöglichen, haben sie auch den Nachteil, dass die Resultate nur erste Hinweise auf eine potenzielle Gefährdung für den Menschen geben können.

Bei einer positiven Reaktion müssen Untersuchungen mit Säugerzellen weitere Informationen über die genotoxische Wirksamkeit der Inhaltsstoffe von Umweltproben liefern. Dies wurde am Beispiel der Muldeproben mit dem Zytotoxizitätstest in H4IIE Zellen (Rattenhepatozyten) deutlich gemacht.

Eine wesentliche Eigenschaft der verwendeten biologischen Testsysteme ist die hohe Sensitivität. Die Nachweisempfindlichkeit, ausgedrückt als Dosis ab der sich ein deutlicher Effekt anzeigt, ist substanzspezifisch und abhängig vom Zellsystem. Dies ergibt sich z.B. aus dem Vergleich der mutagen wirksamen Dosis von MNNG (10 µg/Platte) und Natriumazid (2 µg/Platte) im Bakterienmutagenesetest.

Die Zellsysteme unterliegen zudem einer "Fitness", d.h. in welchem Zustand sich die Zellen befinden. Je nach Zustand des Zellsystems resultiert eine unterschiedlich hohe Koloniezahl und damit entsprechend zwischen den Parallelen eine unterschiedlich starke Schwankung. Insbesondere zeigen Säugerzellen (EROD, LUC-Assay) dies, wenn mehrere Passagen^a erfolgten und die verwendeten Zellen schon die x-te Generation darstellt. Man ist deshalb bestrebt, diese (Schwankungen) durch mehrfache Wiederholung der Experimente auszugleichen, um so den statistischen Fehler klein zu halten und deutliche Tendenzen der biologischen Wirkung ablesen zu können. So wurden auch in dieser Arbeit die Experimente mindestens dreimal wiederholt, bis sich eine eindeutige Tendenz abzeichnete. Selbst bei kontrolliertem Einhalten aller Versuchsbedingungen, kann jedoch eine hohe Reproduzierbarkeit, wie sie z.B. durch physikalische Meßmethoden erreicht wird, nicht erzielt werden.

Für die Untersuchungen mit biologischen Testsystemen ist die Wahl des Lösungsmittels, in dem die zu untersuchende Substanz getestet wird, eingeschränkt. Verwendung finden deshalb vorwiegend Wasser bzw. hydrophile Lösemittel (wie z.B. Aceton, Ethanol, DMSO).

^a Unter einer Passage wird die Folgeneration einer Zellkolonie verstanden

Zudem liegt die tolerable Grenze des Lösungsmittelanteils bis zu maximal 10% des Testvolumens, unterhalb derer toxische Effekte durch Absterben der Zellen nicht beobachtet werden.

DMSO ist aufgrund seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften für weitere chemische Untersuchungen, insbesondere wenn diese physikalische Trennverfahren beinhalten, nur eingeschränkt anwendbar. In dieser Arbeit wurden deshalb für alle toxikologischen sowie chemischen Untersuchungen Ethanol eingesetzt. Als Vorteil erwies sich, dass diese Lösungen mittels GC/MS untersucht werden konnten, was direkt Aufschluss über wirksame, flüchtige Inhaltsstoffe gab, und die Extrakte direkt zeigten, mit welchen Substanzklassen die Zellsysteme in Kontakt kamen. Durch den Lösungsmittelwechsel nach Extraktion kann eine Abnahme der Analytkonzentration sowie ein Verlust von Substanzen, die aus der veränderten Lösungsmittelpolarität resultiert, nicht ausgeschlossen werden.

11.2. Taihu

Die Ergebnisse der toxikologisch-chemischen Untersuchungen dieser Arbeit geben eindrucksvoll die Belastungssituation des Taihus wieder und stimmen eindeutig mit den von den Arbeitsgruppen Hühnerfuß und Westendorf bislang publizierten Ergebnisse überein.^[2, 126, 127] Die Mutagenität der Probe #0 ließ sich anhand identifizierter Inhaltsstoffe befriedigend deuten. So konnten die im Mutageneseexperiment untersuchten Substanzen (z.B. Reten, lineare Alkylbenzole, etc.), die als Inhaltsstoffe im Extrakt identifiziert wurden, als Ursache für die mutagenen Effekte ausgeschlossen und die Mutagenität z.T. auf die im Extrakt nachgewiesenen PAKs eingegrenzt werden.

In Zusammenhang mit der räumlichen Verteilung der PAKs in Taihu-Sedimenten erschien eine Arbeit zur Verteilung (Muster) und Herkunft der PAK der Arbeitsgruppen Wenchuan und Chenwei et al.^[128] Hierin zeigte sich ein regionales PAK-Muster in Abhängigkeit von der Probenahmestelle. Sedimentproben, die in räumlicher Nähe zur Großstadt Wuxi genommen wurden, wiesen besonders hohe PAK-Einträge auf und lagen in der Größenordnung von 5000 µg/kg Trockenmasse. Als Quelle der PAK konnte nach Quantifizierung mit internem PAK-Standard und Berechnung der Indices eine feuchte Deposition ausgeschlossen und die Einträge auf petrogene Quellen zurückgeführt werden. Die Kernaussage dieser Ergebnisse ist eine räumliche Abhängigkeit des resultierenden Konzentrationsverlaufs der PAKs, die sich in den eigenen Untersuchungen zu den jeweiligen Probenahmestellen in der Mutagenität und Induktion von CYP-450 1A1 im EROD-Test widerspiegelt. Unklar blieb in diesem Zusammenhang bislang die Deutung der toxikologischen Ergebnisse für die Probenahmestellen #1 und #6. Obschon diese räumlich nicht allzu weit auseinander liegen, konnte aus den GC/MS-Untersuchungen sowohl die Mutagenität als auch die Induktion von CYP-450 nicht zweifelsfrei erklärt werden. Vergleiche mit dem EPA PAK-Standardreferenzgemisch ergaben keinerlei Hinweise auf die Anwesenheit von PAK oder Molekülen planarer Geometrie in den mutagenen Proben #1 und #6. Ebenso konnten in den übrigen Proben PAKs nicht nachgewiesen werden, die die Mutagenität sowie die Induktion des CYP-450 1A1 der Proben hinreichend erklären könnten. In dem ebenfalls mutagenen Sedimentextrakt der Probe #1 konnten dagegen einige bislang nicht näher identifizierte Substanzen entdeckt werden. Es bleibt offen, ob diese bislang noch nicht eindeutig identifizierten Inhaltsstoffe, die in diesem Extrakt einen wesentlichen Anteil ausmachen, als Mutagene in Frage kommen.

Vorzug des EROD-Tests ist, dass eine Induktion des CYP-450 1A1 empfindlich genug ist, um auch in Gemischen z.B. PAKs, "non-ortho"-PCBs, Dibenzodioxine und Furane nachzuweisen.^[129] Die Ergebnisse des EROD-Tests zeigen die Wirkung der Substanzgemische im Organismus auf und somit die Interaktion der Inhaltsstoffe mit den physiologischen Regulationsmechanismen. Es muss jedoch betont werden, dass dieses Testsystem isolierte Säugerzellen verwendet, so dass eine Abschätzung des resultierenden Gefahrenpotentials für den Menschen nicht ohne weiteres möglich ist. Die Fähigkeit zur Induktion und damit zur Regulation der CYP-450 1A1-Konzentration im Organismus zeigt deutlich die biologische Wirkung der Extraktinhaltsstoffe. Es ist davon auszugehen, dass die Inhaltsstoffe der Gesamtextrakte eine biologische Wirkung in Säugerzellen entfalten können und somit von einer potenziellen "Gefahrenquelle" ausgegangen werden kann. Insbesondere haben die Inhaltsstoffe dann Relevanz, wenn sie in die Nahrungskette gelangen und für den Menschen wirksame Dosen erreicht werden. Weitergehende Experimente z.B. in Form von Experimenten an Tieren wie z.B. an Regenbogenforellen müssten zum EROD-Test ergänzende Befunde zur Wirksamkeit der Gesamtextrakte liefern.

Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl PAK als auch Hetero-PAK, wie z.B. Dibenzod[b]thiophen, im Ames-Test nach metabolischer Aktivierung (vgl. Kapitel 3.2, S.29 ff.) mutagen wirksam sind^[130], wobei sich die Mutagenität der Hetero-PAKs nicht wesentlich von denen der Kohlenstoff-Analoga unterscheidet. Die Mutagenität der PAK ist aber stark von deren Struktur, (sowie u.a. dem Expositionsweg und dem Organismus) abhängig. So zeigen z.B. PAKs mit weniger als 3 Ringen keine, mit Ausnahme des Benzols, mutagene bzw. kanzerogene Wirkung. Eine starke kanzerogene Wirkung wird vor allem bei PAKs mit sogenannter "Bay-Region" gefunden. Darunter versteht man die Kondensation der Ringe wie sie in Abbildung 11-1 dargestellt ist.^[131, 132]

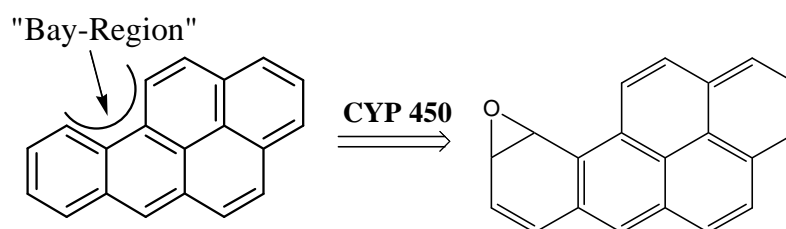


Abbildung 11-1 Bildung des mutagen wirksamen Epoxids in der Nähe der "Bay-Region"

Diese Anordnung der Ringe bedingt eine bevorzugte Bildung der Diolepoxide, die im Verlauf der Metabolisierung entstehen, als Elektrophile an nucleophile Zentren der DNA (am Stickstoff der Pyrimidinbasen) addiert werden und sogenannte Addukte bilden.

Die Mutagenität der Alkyl-PAKs dagegen verläuft uneinheitlich. So ist z.B. das 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen ein stark mutagen wirksames Alkyl-PAK. Reten, das ebenfalls im Extrakt nachgewiesen wurde und ein Alkyl-PAK darstellt, zeigt dagegen im untersuchten Dosisbereich von 1 µg bis 100 µg pro Platte mit den Ames Stämmen TA 98/100 nach metabolischer Aktivierung keine mutagene Wirkung^[107] (vgl. Abbildung 8-41, S. 116). Es ist somit davon auszugehen, dass das Reten keinen Beitrag zur Mutagenität des Gesamtextraktes leistet. Im genannten Dosis-Bereich konnte lediglich eine dosisabhängige Zytotoxizität, die für den Stamm TA 100 wesentlich stärker ausgeprägt war, nachgewiesen werden.

Unterschiedliche Studien zur Toxikologie von Reten haben u.a. dessen Fähigkeit zur Induktion von CYP-450 1A1 aufgezeigt.^[133] Unter anderem wurde in Studien mit Regenbogenforellen, die sich im Entwicklungsstadium befanden und gegenüber Reten exponiert wurden, erhöhte Leberwerte für CYP-450 1A1 gefunden^[134].

Es ist somit davon auszugehen, dass Reten einen nicht unwesentlichen Beitrag zur nachgewiesenen Induktion des Gesamtextraktes im EROD-Test leistet. Reten leitet sich von der Abietensäure ab (vgl. Abbildung 11-2). Diese ist ein Inhaltsstoff von Koniferenharzen, wobei im Verlauf von Diagenese Prozessen u.a. das Tetrahydroreten entsteht.

Bei Ethylbenzol und den Xylenen ist wegen der etwas höheren K_{OW} -Werte mit einer geringen Anreicherung zu rechnen. Die Abbaubarkeit innerhalb der BTEX-Aromaten nimmt mit der zunehmenden Zahl der Alkylsubstituenten ab. Xylole sind am schlechtesten abbaubar.^[92,93] Ein biologischer Abbau von Ethylbenzol in belasteten Gewässern wurde mittels Laborversuchen festgestellt.^[138]

Daten aus systematischen Untersuchungen zu biotischen als auch abiotischen Abbauvorgängen an langkettigen Alkylbenzolen liegen bislang nicht vor. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass diese eine lange Verweilzeit haben und sich in ihrem Abbauverhalten nicht wesentlich von den langkettigen Kohlenwasserstoffen unterscheiden.

Unter anderem wurden auch Kohlenwasserstoffe unterschiedlicher Kettenlänge nachgewiesen, die ubiquitäre Inhaltsstoffe von Sedimenten darstellen. Ein direkter Einfluss auf die nachgewiesenen toxikologischen Effekte bleibt fraglich; vorstellbar ist jedoch die Funktion als Lösungsvermittler, so dass ein Passieren der Fremdstoffe durch die Zellmembran erleichtert wird. Bislang sind nur einige Kohlenwasserstoffe hinsichtlich akut-toxischer Wirkungen, wie z.B. die Wirkung als Cokarzinogen auf der Mäusehaut^[41], beschrieben. Eine karzinogene bzw. mutagene Wirkung von Alkanen für den Menschen zeigt keine einheitliche Tendenz. Hexan bildet z.B. im Zuge der metabolischen Oxidation u.a. das mutagen wirksame 3-Methylcyclopent-2-en-1-on (vgl. Abbildung 11-3)^[139]. Im Verlauf der Diagenese des Hexans, wobei u.a. 2,5-Hexandion gebildet wird (vgl. Abbildung 11-4), entsteht das Cyclopentenon durch intramolekulare Aldolkondensation. 1,3-Butadien wurde aber von der deutschen Forschungsgemeinschaft als Humankarzinogen eingestuft.^[140]

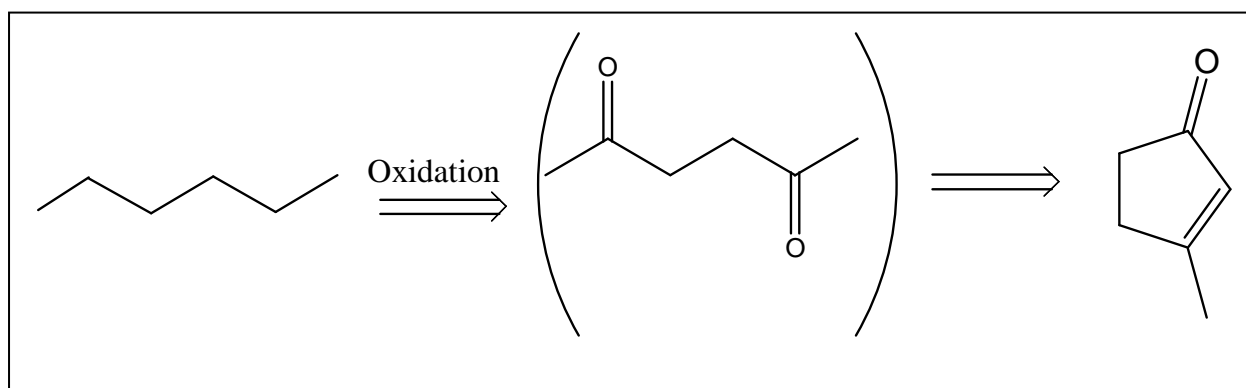


Abbildung 11-3: Metabolismus von Hexan in Säugern unter Bildung des Mutagens 3-Methyl-cyclopent-2-enon^[139]

Diese wurden durch sequentielle Extraktion erhalten und sind von daher unter prinzipiell unterschiedlichen Bedingungen entstanden. Um eine stringente Diskussion der toxikologischen Ergebnisse auf Basis chemischer Untersuchungen zu führen, wäre gegebenenfalls eine parallele Extraktion der Sedimentproben mit unterschiedlichen Lösungsmitteln angebracht.

Qualitativ kann jedoch festgehalten werden, dass die Untersuchungen zur Zusammensetzung der Extrakte deutlich gezeigt haben, dass die Dichlormethan-Extrakte eine größere Vielfalt an Umweltchemikalien enthielten.

Dies kann im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Lösungsmittelpolaritäten stehen, eine eindeutige "Verifikation" läßt sich jedoch unter den experimentellen Bedingungen nicht durchführen. Unter den Bedingungen der sequentiellen Extraktion ist eine Interpretation der Differenzen in der Extraktzusammensetzung, basierend auf den Unterschieden der Lösungsmittelpolarität hypothetisch. Eine Interpretation, die auf der Annahme der Unterschiede der Lösungsmittelpolaritäten basiert, setzt voraus, dass beide Extrakte unter gleichen Bedingungen gewonnen wurden. Dies ist durch die Methode der sequentiellen Extraktion aber *per se* schon nicht gegeben, sondern wäre durch eine parallele Extraktion erfüllt.

Zwar wurden bereits im Rahmen früherer Arbeiten^[z.B. 82] verschiedene Lösungsmittel zur vollständigen Extraktion eingesetzt, jedoch wurden auch diese zumeist sequentiell verwendet, so dass sich ein direkter Vergleich schwierig gestaltet. Diese Untersuchungen zeigten zwar ebenso eindrucksvoll die Differenzen in der chemischen Zusammensetzung auf, gingen jedoch auf das Problem der vergleichbaren Versuchsbedingungen nicht näher ein.

11.3. Mulde

11.3.1. Brunnenwasserproben (BVV)

Zytotoxizität in der Rattenhepatozyten-Zelllinie (H4IIE)

Das Ergebnis, dass die Toxizität im modifizierten bakteriellen Testsystem wesentlich weniger stark ausgeprägt erscheint, weist daraufhin, dass die Rattenhepatozyten (H4IIE-Zellen) wesentlich empfindlicher auf die Wasserinhaltsstoffe reagieren, als die Bakterien. Da die höheren Zellen über einen komplexeren Stoffwechsel verfügen als die Bakterien, können diese die Wasserinhaltsstoffe zu stärker toxisch wirksamen Metaboliten umsetzen.

Es steht deshalb zur Diskussion, ob die in den Proben nachgewiesenen Di - und Trichlorphenole für die beobachtete Toxizität in Frage kommen. Eine genauere Analyse der Toxizität in diesem Testsystem anhand von Subfraktionen der betreffenden Grundwasserproben wäre nötig, um dies zu klären.

Der höheren Toxizität in den Säugerzellen muss demnach ein höherer Stellenwert beigemessen werden, als der Bakterientoxizität, da diese eher Hinweise auf die Wirkung im Säugerorganismus ermöglichen. So wurden auch für wesentlich niedrigere Konzentrationen Effekte gefunden, was ebenfalls darauf hindeutet, dass die H4IIE-Zellen empfindlicher reagieren. Dennoch darf aus den Resultaten der Experimente mit den H4IIE-Zellen nicht voreilig der Schluß gezogen werden, dass eine Abschätzung des resultierenden Gefährdungspotentials (z.B. für den Menschen) möglich wäre. Dies ist darin begründet, dass es sich hierbei stets um ein isoliertes Zellsystem handelt und die Wirkungen in einem intakten Organismus sich grundlegend hiervon unterscheiden können.

Toxizität in Bakterien

Wie die Ergebnisse der Bakterientoxizität mit Hinblick auf die nachgewiesenen Chlorphenole zu deuten sind, ist fragwürdig, denn die direkte Einwirkung der Chlorphenole, die stark bakterizid wirken^[101], sollte erwartungsgemäß zu einem starken Rückgang der Bakterienkoloniezahl führen. Offensichtlich ist die Dosis der Chlorphenole in den Proben nicht ausreichend, um das Bakterienwachstum zu hemmen. Ökotoxikologisch relevant jedoch sind Chlorphenole aufgrund der Persistenz und Toxizität, die mit zunehmendem Chlorierungsgrad steigt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die toxischen Proben BVV 511 und BVV 513 in den Untersuchungen der Arbeitsgruppe Michaelis^a ebenfalls auffällig waren.

Hierbei ging es um die Frage, ob eine bakterielle Umsetzung der im Grundwasser vorhandenen Xenobiotika am Entnahmeort selbst stattgefunden hat. Hierzu wurde das Isotopenverhältnis $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ in den Proben bestimmt.

Bei einer bakteriellen Umsetzung des Schadstoffes kommt es zu einer Anreicherung des Isotops C-12. Wie die Ergebnisse deutlich zeigten, befindet sich im Bereich des Brunnens BVV 513 eine Quelle mit nichtmetabolisierten Schadstoffen (nicht genannt). Diese traten neben Metaboliten des Trichlormethans und Trichlorethens auf. Somit kommt dem Bereich des Brunnens BVV 513 die Bedeutung einer Quelle zu, die Ausspülungen in die "benachbarten" Bereiche der anderen Brunnen liefert. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Zytotoxizität zeigen vor diesem Hintergrund, dass die Toxizität der Wasserprobe dieses Brunnens einerseits durch Einträge aus anderen Brunnen bedingt ist und andererseits durch eine Quelle, die direkt im Bereich dieses Brunnens liegt und diverse, nicht-metabolisierte Schadstoffe aufweist.

Östrogene Wirkungen

Der Östradiol-Verdrängungsassay der Hexan/Dichlormethan--Extrakte zeigte, dass die extrahierbaren Inhaltsstoffe eine Verdrängung von mindest. 90% am Estrogenrezeptor ER β aufwiesen und diese somit effektiv am Estrogenrezeptor binden. Da die Extrakte jedoch im Luciferase-Assay nicht eingehend untersucht wurden, sind auch keine Aussagen zur intrinsischen östrogenen Wirkung ableitbar. Aufgrund der Tatsache, dass die Wasserproben aus Brunnen entnommen wurden, die der Trinkwasserversorgung dienen, sind die beschriebenen toxikologischen Effekte als bedenklich einzustufen. Dies wird insbesondere durch den ED₅₀-Wert anschaulich. Für ein Erreichen der vollständigen Verdrängung sind 50 μL der Wasserprobe bereits völlig ausreichend.

Aus der D/W-Kurve des Synthesegemisches des 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenols (Abbildung 11-5) läßt sich ein ED₅₀-Wert (50% Verdrängung) ablesen, der deutlich über 300 $\mu\text{mol/L}$ liegen dürfte. Dieser Wert ist wesentlich höher als die in der Literatur beschriebenen Werte der bekannten Xenoöstrogene.^[116]

^a AG Prof. Dr. Michaelis, Institut für Biogeochemie, Universität Hamburg

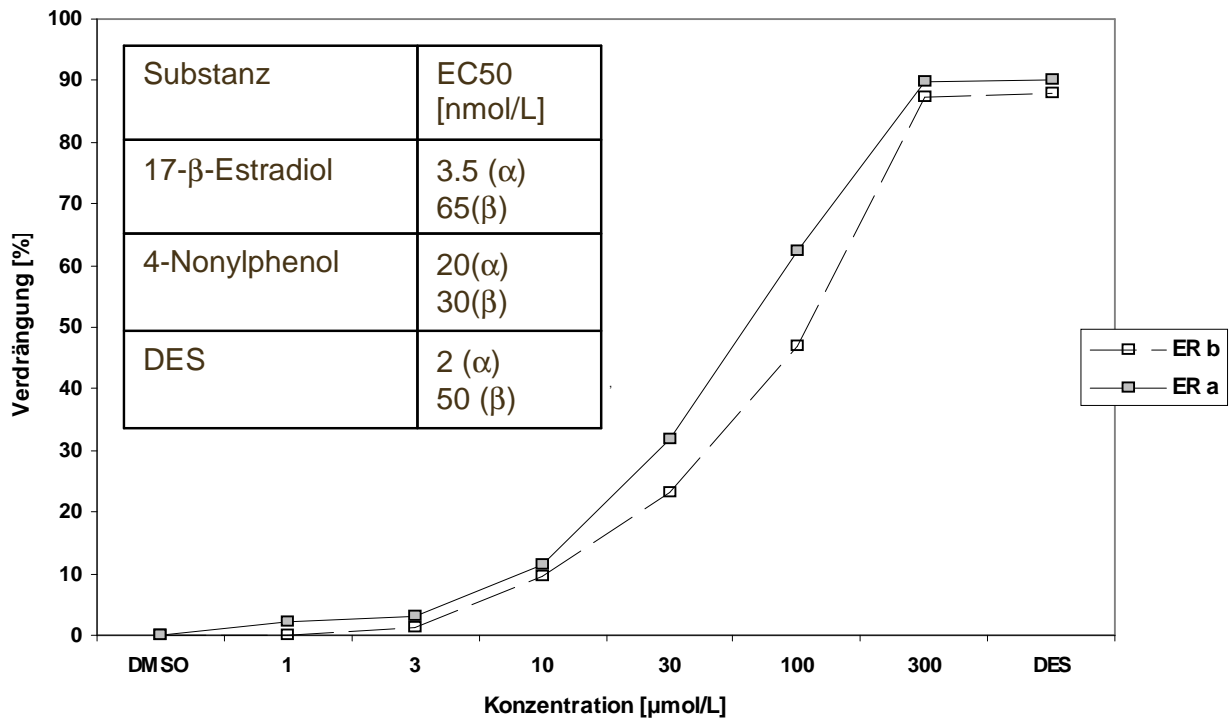


Abbildung 11-5: Dosis-Wirkungskurve von 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol im Östradiol-Verdrängungsassay. Ebenso liegt dieser Wert auch eindeutig über dem experimentell bestimmten Wert des 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol. Eine mögliche Ursache hierfür kann im Zusammenhang mit dem sterischen Anspruch der beiden Phenylreste gesehen werden, die eine effektive Bindung an den Östrogenrezeptor erschweren (Abbildung 11-6).

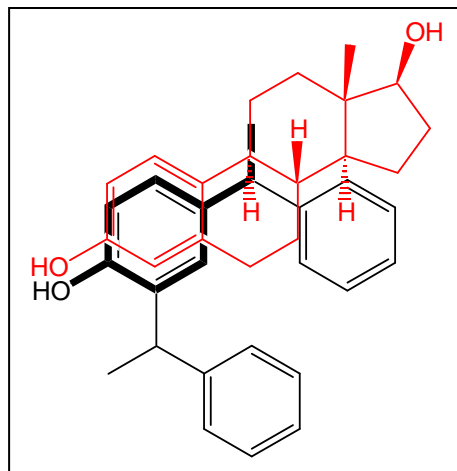


Abbildung 11-6: Strukturvergleich von 17β-Östradiol mit 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol

Analytisch-chemische Untersuchungen

Im zytotoxisch wirksamen Extrakt BVV 513 wurden neben 4-Chlorphenol, 2,5- sowie 2,6-Dichlorphenol und 2,4,5-Trichlorphenol^[5] auch Kohlenwasserstoffe nachgewiesen.^[91,95] Eine aus toxikologischer als auch chemischer Hinsicht interessante Komponente ist das 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol, das sich durch seine Konstitution mit den zwei Phenylgruppen gegenüber den bislang bekannten östrogen wirksamen Alkylphenolen wie z.B. Nonylphenol unterscheidet und somit eine neue östrogen wirksame Struktur darstellt.

11.3.2. Sedimentproben der Mulde

Toxizität in Bakterien

Die Toxizität der Sedimente (403.628.027 – 403.628.044^a) ließ sich im *E. coli* - Zytotoxizitätstest grundsätzlich nur in Abwesenheit von S9-Mix nachweisen. Dieses Phänomen wird oft bei Zusatz des metabolisierenden Systems beobachtet und wird dadurch erklärt, dass an sich mutagene Substanzen an die Plasmaproteine im S9-Mix gebunden werden, so dass diese von den Bakterienzellen nicht mehr aufgenommen werden können.

Ara-/Ames-Test

Die meisten Proben zeigten im höheren Dosisbereich einen zytotoxischen Effekt, d.h. eine relative Erhöhung der Mutationsrate blieb aus. Lediglich die Proben S031, S032 und S035 zeigten einen Induktionswert von 2.4, 3.5 bzw. 5.8 bezogen auf jeweils 100 mg Trockenmasse und Negativkontrolle (Abbildung 9-28, S.149 bzw. Abbildung 9-29, S.150), so dass diese Proben als mutagen zu bewerten sind.

Die Untersuchungen mit dem Ames-Test der Proben im gleichen Dosisbereich zeigten keine Mutagenität, sondern waren z.T. stark zytotoxisch (vgl. Abbildung 9-31, S. 154 bzw. Abbildung 9-32, S. 155). Die Interpretation dieser Ergebnisse ergibt sich aus der unterschiedlichen Empfindlichkeit, die aus dem genetischen Phänotyp der verwendeten Bakterienstämme resultiert. Zudem zeigt dieses Ergebnis, dass eine Überprüfung toxikologischer Daten mit unterschiedlichen Organismen sinnvoll erscheint. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Verwendung von bakteriellen Mutagenesetestsytymen einen vorläufigen Charakter hat, so dass die gewonnenen Ergebnisse nur einen Überblick über die potenziellen Gefahren liefern können.

Insbesondere müssen diese Ergebnisse im Rahmen weitergehender Untersuchungen, die unterschiedliche toxikologische Aspekte berücksichtigen, wie z.B. Dauer des Experiments (chronische Schäden), Organismus und Exposition, detailliert überprüft werden.

Interessant ist insbesondere, dass die Ethylacetat-Extrakte ohne Zusatz des metabolisierenden Systems deutlich mutagene Effekte zeigten, die zudem gegenüber den mit Hexan gewonnenen stärker waren. Ein vergleichbares Resultat wurde schon in einer früheren Arbeit beschrieben.^[83] Wie dieses Ergebnis, insbesondere mit Hinblick auf die Ergebnisse der GC/MS-Untersuchungen zu interpretieren ist, ist fraglich. Demnach wirken dessen Inhaltsstoffe im Arabinose-Testsystem wie „direct acting mutagens“, also als Mutagene, die keiner metabolischen Aktivierung bedürfen.

In diesem Extrakt wurden ausschließlich langkettige Kohlenwasserstoffe und Ester sowie unterschiedliche Abbauprodukte der Alkylphenolpolyethoxylate (APnEOs) gefunden, die nicht zu den klassischen Mutagenen wie z.B. Nitroaromaten (sowie deren Metabolite) oder PAK zu zählen sind und nicht über entsprechende reaktive Stellen im Molekül verfügen. Untersuchungen zur Mutagenität des 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol mit dem Ara-Test ergaben abweichende Ergebnisse von denen der Sedimentextrakte. Es konnte die für die Sedimentextrakte gefundene mutagene Wirkung nicht auf das darin identifizierte 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol zurückgeführt werden.

Östrogene Wirkung

Die Untersuchungen der mutagenen Proben S031 und S032 im Östradiol-Verdrängungsassay zeigten deutlich eine Verdrängung (bis zu 70%). Zudem wiesen die Inhaltsstoffe der Probe S032EE agonistische Effekte im Luciferase-Test auf.

^a Im folgenden werden die ersten sechs Ziffern weggelassen

Das 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol wurde in beiden Testsystemen auf dessen östrogene Wirkung untersucht. Es ließen sich nur im Östradiol-Verdrängungsassay eindeutig östrogene Wirkungen nachweisen, wobei eine 50%-ige Verdrängung noch bis zu einer Konzentration von 30 bzw. 100 μM /L (je nachdem, ob $\text{ER}\alpha$ oder $\text{ER}\beta$ verwendet wurde) bestimmt werden konnte. Die östrogene Wirkung der Sedimentextrakte kann somit zum Teil auf das in den Sedimentextrakten identifizierte 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol zurückgeführt werden. Um die östrogene Wirkung einer Substanz bewerten zu können, ist zunächst das Testsystem zu diskutieren, mit dem dessen östrogene Wirkung nachgewiesen wurde. Wie sich in einer methodischen Arbeit zeigte^[116], konnte eine Abhängigkeit der östrogenen Wirkung, ausgedrückt durch deren EC_{50} -Wert, sowohl vom verwendeten Testsystem als auch von der getesteten östrogen wirksamen Verbindung gefunden werden. So zeigen sich z.T. starke Unterschiede zwischen den natürlichen, synthetischen und den Xenoöstrogenen. Der Vergleich des EC_{50} -Werts im Östradiol-Verdrängungsassay von 4-Nonylphenol mit dem natürlichen Östradiol zeigt, dass das Östradiol gegenüber dem 4-Nonylphenol eine niedrigere Konzentration zur Verdrängung erfordert (3.5 nM für $\text{ER}\alpha$ bzw. 65 nM für $\text{ER}\beta$ im Gegensatz zu 20 μM ($\text{ER}\alpha$) bzw. 30 μM ($\text{ER}\beta$) für Nonylphenol).^[116] Der EC_{50} -Wert von Nonylphenol ist damit etwa identisch mit dem ermittelten Verdrängungswert für 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol im α -Rezeptor (30 μM). Eine geringe Abweichung dagegen zeigt der EC_{50} -Wert im $\text{ER}\beta$ (100 μM).

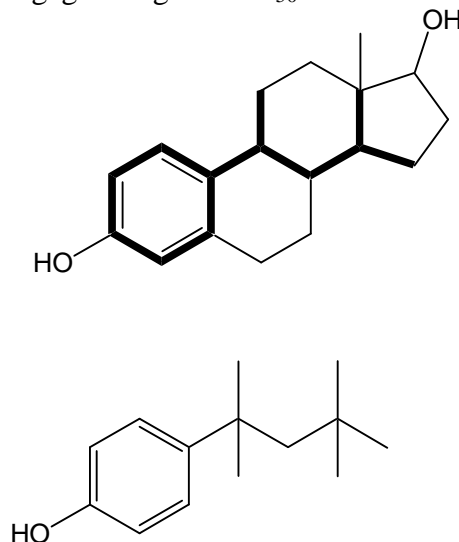


Abbildung 11-5 Strukturelle Analogie des 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenols (unten) zum Östradiol (oben)
 Aus der strukturellen Analogie des 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenols zum Östradiol (Abbildung 11-5) – dargestellt durch fett markierte Bindungen im Östradiol - läßt sich eine ähnliche Affinität des 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenols zu den Östrogenrezeptoren ableiten.

Interessant jedoch ist, dass der EC_{50} -Wert des Nonylphenols prinzipiell von der gleichen Größenordnung^[116] ist wie der des 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenols. Dies zeigt, dass die geringfügigen strukturellen Unterschiede des 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenols gegenüber dem Nonylphenol wenig ausschlaggebend für die Bindung an den Östrogenrezeptor sind.

11.4. Bromindole - Toxikologie und Metabolismus

In Zusammenhang mit Mutageneseexperimenten nach metabolischer Aktivierung, konnten unterschiedliche Metabolite der 3, x-Bromindole (x = 4, 5, 6, 7) identifiziert werden. Es zeigte sich zunächst, dass die Metabolisierung durch das Rattenleberhomogenat zu zwei Klassen von Metaboliten führt:

- die Dibromindolkongeneren 3,4- und 3,5-Dibromindol werden zu identischen Metaboliten umgesetzt: neben dem 3-Bromindol wird auch jeweils das entsprechende Bromoxindol gebildet (Abbildung 10-11 (Forts.), S. 193 und 10-18, S.199). Dessen Strukturvorschlag basiert bislang auf dem Fragmentierungsmuster des Massenspektrums, die eindeutige Identifizierung durch Vergleich mit einer Referenzsubstanz steht noch aus.
- die übrigen Dibromindolkongeneren bilden das entsprechende Monobromindol: also 3,7-Dibromindol bildet das 7-Monobromindol und 3,6-Dibromindol bildet neben 3-Bromindol noch das 6-Bromindol.

Die Stärke der Induktion von CYP-450 1A1 scheint vom Substitutionsmuster abzuhängen. Vergleicht man die Induktion in der höchsten applizierten Dosis, so erwiesen sich das 3,6- und das 3,7-Kongener als die am stärksten induzierenden Isomere. In Bezug auf das 2,3,7,8-TCDD ist die Induktion durch das 3,6- bzw. 3,7-Isomer nicht relevant.

Dies ergibt sich aus dem Vergleich der erforderlichen Dosis des induzierenden Dibromindols, die etwa um den Faktor $2 \cdot 10^5$ gegenüber dem 2,3,7,8-TCDD niedriger ist. Die übrigen Dibromindole ergaben Induktionswerte, die deutlich unter denen des 3,6- bzw. 3,7-Isomers lagen. Dagegen konnten für das 2,3,5,7-Tetrabromindol und das 3,4,7-Tribromindol Induktionen gefunden werden, die in der Größenordnung des 3,7-Isomers lagen.

Die Ergebnisse des EROD-Tests gestatten einige Aussagen zur strukturellen Ähnlichkeit der Dibromindole mit dem 2,3,7,8-TCDD. Aus der Fähigkeit der Dibromindole, die Cytochrom CYP-450 1A1 Bildung zu induzieren, lässt sich ableiten, dass diese ähnlich gut an den Arylkohlenwasserstoffrezeptor (ArH-Rezeptor) binden und so die Signaltransduktionskaskade für die Transkription der Gene induzieren. Die Fähigkeit der Dibromindole, an den ArH-Rezeptor zu binden, lässt auf eine mit den planaren Molekülen (PAK, PCBs, etc.) vergleichbare elektronische Struktur und Geometrie schließen. Zudem lässt sich aus dem Ergebnis des EROD-Tests ableiten, dass von einer Wirkung der Bromindole im Säugerorganismus auszugehen ist.

Im Mutagenese-Experiment zeigten die Dibromindole keine (starke) Mutagenität. Es ist zu vermuten, dass sie als potenzielle nicht-mutagene Kanzerogene wirken, die, ähnlich dem 2,3,7,8-TCDD, tumorpromovierende Eigenschaften aufweisen. Weitere Erkenntnisse zur Toxikologie der Dibromindole könnten z.B. Experimente zur Tumorpromotion liefern.

Im Zusammenhang mit dem Metabolismus und der Biogenese der Bromindole sind weitere Fragen von Interesse:

- Im Rahmen der Diageneseuntersuchungen unter Verwendung des Rattenleberhomogenats an Dibromindol-Kongeneren ließen sich unterschiedliche Metabolite nachweisen. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die Frage nach den Enzymen, die diese Reaktionen katalysieren, und dem Mechanismus von Interesse.
Dies ist insbesondere in der Beziehung zum Metabolismus anderer halogener Verbindungen wie z.B. CCl_4 , CHCl_3 oder 2,3,7,8-TCDD relevant.
- Aus den Induktionsexperimenten im EROD-Test ging eindeutig hervor, dass sowohl das 3,6- als auch das 3,7-Dibromindolkongener eine stärkere Induktion als das 2,3,7,8-TCDD bewirkt.

Eine Hypothese zur Deutung dieser Befunde wäre, dass die stärkere Induktion des CYP-450 1A1 durch eine bessere Bindung der Bromindole in das aktive Zentrum des Arylkohlenwasserstoffrezeptors resultiert.

Hier müsste, basierend auf Röntgenstrukturanalyse-Daten, ein Modelling des Rezeptors erfolgen, das das „Docking“ der Bromindole mit dem 2,3,7,8-TCDD vergleicht.

- Bislang wurden unterschiedliche Bromverbindungen als sekundäre Naturstoffe in marinen Organismen nachgewiesen^[141, 142, 143], die zur Biogenese die vanadiumhaltige Bromoperoxidase verwenden.^[143] In Form einer biomimetischen Reaktion an isolierter Bromoperoxidase bzw. Modellkomplexen wäre es interessant zu klären, nach welchem Mechanismus die Synthese im Organismus erfolgt. Bislang existieren unterschiedliche Vanadiumkomplexe, die synthetisch hergestellt wurden, jedoch nur die Struktur des aktiven Zentrums der Bromoperoxidase modellieren.^[144, 145]

Sicherlich kann aufgrund des 2,3,7,8-TCDD-analogen Verhaltens der Dibromindole hinsichtlich der Induktion von CYP-450 1A1 angenommen werden, dass diese Substanzklasse weitere ökotoxikologische Aktivitäten, wie z.B. hormonelle Aktivität besitzt. Bislang wurden nur einige Vertreter dieser Substanzklasse auf ihre Fähigkeit zur Induktion von CYP-450 1A1 untersucht. So wurden z.B. die Metabolite, Monobromindole sowie weitere Kongenere bislang nicht untersucht. Ziel dieser weitergehenden Untersuchungen wäre die Einordnung der Induktionsstärke der bisher untersuchten Vertreter in eine homologe Reihe der induzierenden Bromindolderivate.

Um die Ergebnisse des EROD-Tests im ökologischen Maßstab vernünftig zu interpretieren, wären Experimente z.B. mit Fischen erforderlich, um die Induktion des CYP-450 1A1 zu verifizieren und die ökotoxikologische Bedeutung dieser Substanzklasse besser einschätzen zu können. Dies würde zudem u.a. Hinweise auf deren biologische Wirksamkeit liefern.

Bislang konnten für die Dibromindole in den Kurzzeit-Experimenten keine bedeutsamen toxikologischen Eigenschaften, abgesehen von der Fähigkeit zur Induktion von CYP-450 1A1, nachgewiesen werden.

Dennoch besitzen sie aufgrund ihrer guten Fettlöslichkeit eine lange biologische Halbwertszeit, werden im Fettgewebe angereichert und persistieren dort über längere Zeiträume. Aus diesen können sie infolge von Nahrungskarenz wieder freigesetzt werden und z.B. in den Hormonhaushalt des Organismus eingreifen oder als Tumorpromotoren wirksam werden.

12. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Sediment- und Wasserproben mit Hilfe toxikologischer Methoden auf deren Wirkungsspektrum untersucht und für toxikologisch relevante Proben diese Ergebnisse mit denen der analytisch-chemischen Untersuchungen korreliert. Im Zusammenhang mit den toxikologischen Untersuchungen waren neben genotoxischen Wirkungen auch Einflüsse zur Induktion des CYP-450 1A1-Systems von Interesse sowie die hormonelle Wirkung der Umweltchemikalien. Für die Untersuchungen zur Mutagenität wurde ein bakterielles Kurzzeit-Mutagenesetestsystem eingesetzt (Ara-/Ames-Test), das sich zur Durchführung des Screenings vor allem durch seine einfache Handhabung und die schnelle Verfügbarkeit der Ergebnisse bewährt hat. Die Induktion von Cytochrom P450 wurde unter Verwendung des EROD-Tests untersucht. Die Affinität zu den Östrogenrezeptoren konnte schnell und sicher mit einem Östradiol-Verdrängungsassay erfasst werden. Die intrinsische östrogene Wirkung der im Östradiol-Verdrängungsassay positiv erfassten Substanzen wurde anschließend im Luciferase-Test geprüft.

Sedimentproben des Taihu-Sees, die in räumlicher Nähe zu Industriezentren wie Shanghai genommen wurden, zeigten im Bakterien-Kurzzeitmutagenesetest nach metabolischer Aktivierung z.T. stark mutagene Wirkungen und zudem eine Induktion im EROD-Test. Eine besonders starke Induktion im EROD-Test konnte für die Proben gefunden werden, die auch im Mutagenesetest auffällig waren.

Die chemische Analyse mutagener Sedimentextrakte zeigte eine Vielzahl an Umweltchemikalien. Um die mutagenen Effekte der Gesamtextrakte einzugrenzen, wurden einzelne, identifizierte (Rein-) Substanzen sowie ein technisches Alkylbenzolgemisch auf dessen mutagene Wirkung untersucht und so die mutagene Wirkung der Sedimentproben auf die darin

enthaltenen PAKs, Hetero-PAKs sowie alkylierten PAKs zurückgeführt.

Im Weiteren konnten u.a. Chlorbenzole und Dibenzod, b]thiophen nachgewiesen werden. Die Einträge lassen sich sowohl auf industrielle als auch häusliche Quellen zurückführen. Wie die Untersuchungen zur Mutagenität weiterhin gezeigt haben, konnte eine Abhängigkeit der mutagenen Wirkung von der räumlichen Nähe des Probenahmestandortes zu Großstädten und vom verwendeten Extraktionsmittel nachgewiesen werden. Diese Abhängigkeit konnte ebenso im EROD-Test gefunden werden.

Die Sedimentproben des Industriestandortes Bitterfeld (Mulde) wiesen mutagene und östrogene Wirkungen auf. Die östrogene Aktivität der Sedimentproben konnte auf mikrobielle Abbauprodukte der Alkylphenylethoxylate (APEOs) zurückgeführt werden. Exemplarisch konnte für das im Extrakt nachgewiesene 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol im Östradiol-Verdrängungsassay ein Effekt nachgewiesen werden. Im Luciferaseassay zeigte sich hingegen keine intrinsische Aktivität. Die Wasserproben zeigten ebenfalls Effekte im Östradiol-Verdrängungsassay, die sich z.T. auf das in Umweltproben bislang unbekannte 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol zurückführen ließen. Dieses wurde in dieser Arbeit synthetisiert, das gereinigte Produkt spektroskopisch charakterisiert und im Östradiol-Verdrängungsassay untersucht.

Untersuchungen zur Bindungsaffinität an den Östrogenrezeptoren ergaben eine deutliche Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit und wurden mit den bekannten Xenooestrogenen verglichen.

Das 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol zeigte im Vergleich mit bekannten endokrin wirksamen Substanzen eine geringere Affinität zu den Östrogenrezeptoren. Dennoch kann vermutet werden, dass diese Verbindung auch im Organismus östrogene Wirkungen entfalten kann.

Zudem konnten in den Wasserproben unterschiedlich chlorierte Phenole nachgewiesen werden, die für die z.T. starke zytotoxische Wirkung in H4IIE-Zellen verantwortlich sind.

Es wurden vier Dibromindolkongener synthetisiert, die als Inhaltsstoffe von Nordseesedimenten identifiziert wurden. Diese wurden zunächst nach der Brom-Dimethylformamid-Variante als auch der Pyridiniumbromid-Perbromid Variante dargestellt. Sie wurden in dieser Arbeit erstmals toxikologisch systematisch erfasst, wobei sich die Untersuchungen auf die zytotoxischen und mutagenen Eigenschaften in bakteriellen Testsystemen, dem Metabolismus (Diagenese) in Hepatocyten und auf die potenzielle Fähigkeit zur Induktion von CYP-450 1A1 erstreckte.

Einzig für das 3,6-Kongener wurde eine schwach mutagene Wirkung nach metabolischer Aktivierung gefunden; die höher bromierten Vertreter (z.B. 3,6,7-Tribromindol) zeigten vor allem eine stark zytotoxische Wirkung.

Die Induktion des CYP-450 1A1 zeigte, dass sich vor allem für das 3,6-Kongener eine Induktion feststellen ließ. Die für die Induktion erforderliche Konzentration lag jedoch gegenüber dem 2,3,7,8-TCDD um den Faktor 10^5 höher. Auch eine Induktion für das 3,7-Kongener konnte gefunden werden, war jedoch vergleichsweise etwas niedriger als die des 3,6-Kongeners.

Die Untersuchungen zum Metabolismus mit dem Rattenleberhomogenat wurden an den 3,x-Dibromindolen eingehender untersucht ($x = 4, 5, 6, 7$). Diese zeigten, dass sich prinzipiell zwei Gruppen unterscheiden lassen:

- Jene, die neben den monobromierten Metaboliten (wie z.B. 3-Bromindol) ebenfalls ein oxygeniertes Monobromindol bilden
- und jene, die ausschließlich monobromierte Metaboliten bilden

13. Summary

Various toxicological parameters such as mutagenicity (*Salmonella* microsome assay and Arabinose resistance test), induction of CYP-450 1A1 (EROD-Test) and endocrine activity (competitive Östradiol replacement and Luciferase assay in transgenic human breast cancer cells) have been tested to estimate the extent of the pollution of contaminated aquatic-environmental compartments of the Taihu lake near Shanghai as well as the Mulde-System (tributary of river Elbe in Germany).

For the Taihu it could be shown that sampling sites close to a centre of high population resp. industry (city of Wuxi) contained compounds active in the mutagenicity as well as in the EROD-Test. These results were correlated with the chemical analysis performed by GC/MS. Many known environmental contaminants have been identified such as PAHs, alkyl-PAHs, hetero-PAHs and chlorobenzenes. A variety of compounds with unknown structures could also be detected. An influence of the solvent used for the extraction of the sediment samples on the mutagenic potency and CYP-450 1A1 induction could also be demonstrated. Samples which were extracted with dichloromethane generated a much higher induction rate in the Mutagenicity and EROD-Assay than those extracted with Ethanol.

Sediments as well as ground water samples were collected in the Mulde system. Neither induction in the EROD-assay nor the bacterial mutagenicity assay could be demonstrated with either of these samples. The soil samples were tested for their mutagenicity with the Ames- and the Arabinose-resistance assay (Ara-test). Interestingly, the Ara-test showed an induction without metabolic activation. Under the same conditions, the Ames-assay did not show any mutagenicity. No typical candidates for the observed effects could be identified by chemical analysis.

The samples were also tested for their endocrine activity by use of the competitive estrogen replacement from estrogen receptors ER α and ER β . A strong activity was observed in this assay. 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenole was identified as possible candidate for this activity by chemical analysis. Long-chain derivatives of alkylphenols which are microbial degradation products of the alkyphenylethoxylates (APEOs) were also detected. It could be demonstrated that synthetic 4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenole was active in the Östradiol replacement assay, however, there was no intrinsic activity in the luciferase induction assay with MVLN cells. Endocrine activity was also observed in the ground water samples. In this case a new compound 2,4-bis(1-phenylethyl)phenol could be identified upon spectroscopic characterization. The structure was confirmed by synthesis and comparison of the spectroscopic data. The product purified by HPLC was also active in the estrogen replacement test. Dichloro- and trichlorophenols were also identified by further chemical analysis of water samples. Those samples containing chlorophenols showed an increased toxicity toward bacterial and, more pronounced in the assay using a mammal cell line (H4IIE).

Finally, various dibromindoles were synthesized and tested for their mutagenic and CYP-450 induction potential. These dibromindoles had been identified earlier in sediments of the North Sea. Of increased interest was the toxicological properties of the 3,6-congener. Most of the studied bromindoles, which were also tri- and tetra-brominated, showed no significant effects in the mutagenicity test after metabolic activation. Of further interest was the possible induction of CYP-450 1A1 in liver cells (EROD-Test in H4IIE cells). Some congeners, e.g. 3,6-dibromindol, were of significant activity in correspondence to the other congeners. All studied Bromindoles were much less active than the positive control 2,3,7,8-TCDD.

Summary

In this context it was of interest whether the metabolism of the Bromoindoles in the presence of a liverhomogenate was able to explain the induction of CYP-450 in the EROD-test. It could be shown, that the 3,6-congener forms 3-bromoindole as well as 6-bromoindole. The 3,5-congener as well as the 3,4-congener forms 3-bromindole as well as an oxgenated bromoindole which were postulated to be 4-bromoxindole resp. 5-bromoxindole.

14. Ausblick

Die toxikologischen Ergebnisse zu den Taihu-Sedimenten haben wegen ihres Screening Charakters nur teilweise die aktuelle ökotoxikologische Situation dieses aquatischen Lebensraumes darstellen können. In Anlehnung an die Arbeiten von Ahlf^[11, 146] sollte in weiteren Untersuchungen auch eine Bestandsaufnahme der endemisch-aquatischen Organismen erfolgen, die als Bioindikator für die ökotoxikologische Situation des Taihus fungieren. Auch sind weitere chemisch toxikologische Untersuchungen nötig, um eine umfassende Risikoabschätzung der Wasserqualität zu erhalten. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Verwendung als Trinkwasserreservoir von Bedeutung. Anhand der Anzahl bislang nicht näher identifizierter Verbindungen hat sich gezeigt, dass weitergehende chemisch-analytische Untersuchungen erforderlich sind, um ein vollständiges Bild der umweltchemischen Situation des Sees zu erhalten.

Bis(1-phenylethyl)phenole

Die durchgeführten Synthesen zur Darstellung des 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenols unter *Friedel-Crafts*-Bedingungen lieferte ein Produktgemisch, das nach Reinigung von angemessener Qualität war, wie sich aus dem Vergleich mit der kommerziellen Referenzsubstanz herausstellte. Weitere Synthesen mit höherer (regio-)Selektivität könnten die entsprechenden Diastereomere liefern. Erste Versuche mit Hilfe der *Kumada*-Kupplung hierzu waren bislang nicht erfolgreich. Diese Synthesemethode erscheint jedoch vielversprechend, da unter milden Bedingungen die entsprechenden Isomere gezielt dargestellt werden können. Dies ist vor allem unter dem Gesichtspunkt der eindeutigen Aufklärung der Stereochemie, wie im Falle des 2,4-Isomers von besonderem Interesse. Darüberhinaus, wäre eine genauere Untersuchung der östrogenen Wirkung in Abhängigkeit von der Stereochemie interessant.

Bromindole

Um die Fragestellung, welche Bedeutung die gemessene EROD-Aktivität als Parameter für Flusssedimente bzw. für das Ökosystem Fluss hat, angemessen beantworten zu können, müssen die toxikologischen Ergebnisse im Gesamtkontext aquatischer Ökosysteme interpretiert werden. Hierzu müssten weitere Experimente mit Säugerzellen *in vitro* oder *in vivo* durchgeführt werden. So könnten Experimente mit Organismen aus dem Ökosystem Aufschluss über resultierende Schäden und die möglichen Gefahren für die Fauna geben. Als Bioindikatoren eignen sich unterschiedliche Fischarten aber auch sedimentbewohnende Kleinkrebstiere (vgl. Abschnitt 1.1), die mit einer Kontrollgruppe eines unbelasteten Gewässers mit entsprechenden Öko-Parametern (Salinität, pH, Redox) zu vergleichen sind. Erst diese zusätzlichen Untersuchungen erlauben eine objektivere Beurteilung der Gesamtsituation und eine Abschätzung des Gefahrenpotentials, das von der Substanzklasse ausgeht. Nachteil dieser Untersuchungen ist, dass sie langwierig und komplex sind, da diese Systeme aus vielen Parametern bestehen und diese z.T. starken Schwankungen unterliegen.

Die Mutagenitätsdaten lassen sich folgendermaßen interpretieren:

Die Resultate der Kurzzeit-Bakterienmutageneseexperimente gaben keinen Hinweis auf Mutagenität (mit der obengenannten Einschränkung für das 3,6-Isomer), was aber genotoxische Wirkungen im Allgemeinen nicht völlig ausschließt.

Die Mutageneseexperimente in Bakterienzellen sind auf Säugerzellen auszudehnen, um deren Verhalten in einem höher entwickelten Organismus besser untersuchen zu können und Aufschluss darüber zu erhalten, ob genotoxische Wirkungen nicht doch manifestiert werden. Ob die Dibromindole auch tumorpromovierende Wirkungen entfalten können, müsste in weiteren Experimenten ermittelt werden.

Die Frage, ob die gewonnenen Daten zu den Dibromindolen für eine toxikologische Bewertung der Stoffklasse ausreichend sind, muss eindeutig verneint werden. Die anfänglichen Untersuchungen haben eher den Charakter eines Screenings, das z.T. auf Mikroorganismen beruht. Zwar konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine mutagene Wirkung im untersuchten Dosisbereich nicht vorliegt, jedoch erlaubt dies nur eine eingeschränkte Einschätzung der mutagenen Wirkung im Säugerorganismus. Die strukturelle Analogie zum 2,3,7,8-TCDD legt die Annahme nahe, dass von den Dibromindolen eine tumorpromovierende Wirkung ausgehen könnte, ähnlich wie es für das 2,3,7,8-TCDD bekannt ist. In diesem Zusammenhang wären Studien zur tumorpromovierenden Wirkung der Dibromindole von besonderem Interesse.

Zudem sind die ökotoxikologischen Eigenschaften dieser Verbindungsklasse bislang noch völlig unbekannt. Hier wären z.B. Fütterungsversuche an Tieren, die in unterschiedlichen Nischen des Ökosystems leben oder aber auch Versuche mit Pflanzen oder Mikroorganismen von Interesse. In diesem Kontext wären vor allem Konzentrationen im Niedrigdosisbereich wichtig, die die realen Konzentrationsverhältnisse in aquatischen Ökosystemen richtig wiedergeben. Schließlich wären Untersuchungen zur Genotoxizität in höheren Lebewesen erforderlich, um die Daten für eine Risikoabschätzung und der Extrapolation auf den Menschen einzusetzen.¹⁴⁷

Zu den ökotoxikologisch relevanten Eigenschaften zählt u.a. auch die Persistenz dieser Verbindungen im Ökosystem.

Wie sich in den Untersuchungen zum Metabolismus gezeigt hat, erfolgt der Abbau der Dibromindole in Abhängigkeit von deren Konstitution unter Bildung verschiedener Metabolite.

Untersuchungen zur Kinetik des Metabolismus könnten eventuell weitere Aufschlüsse über die Persistenz der Substanzen geben. Im Zusammenhang mit dem Metabolismus ist sicherlich auch der Abbau durch aquatische Organismen eine wertvolle Information.

In Hinblick auf Wirkungen in aquatischen Organismen sind neben den Fragen zur Mutagenität auch Fragen zum Synergismus und Antagonismus von Interesse. In der Umwelt ist ein Organismus stets einem Gemisch aus unterschiedlichen Kontaminanten ausgesetzt, so dass die toxische Wirkung sich selten auf eine einzelne Substanzklasse zurückführen lässt. Häufig kommt es durch die Kombination der Substanzen zu einer Verstärkung in der Wirkung einer Substanzklasse im Organismus. Ein Beispiel hierfür sind genotoxische Substanzen und Tumorpromotoren. Die ersteren schaffen über Veränderungen in der DNA genetische Veränderungen, die eine Zelle vom normalen Phänotyp in den transformierten Phänotyp überführen können, die letzteren beschleunigen durch epigenetische Vorgänge den Übergang in unkontrolliert wachsende Tumorzellen.

Ein Vergleich der Geometrien der Dibromindole mit dem 2,3,7,8-TCDD mittels Modelling würde die strukturellen Unterschiede besser hervorheben. Zudem ließen sich über ein "Docking-Experiment", basierend auf Röntgenstrukturdaten des ArH-Rezeptors, mit den Dibromindolen Aussagen zur deren Passform in den ArH-Rezeptor machen. Hieraus ließen sich die Befunde des EROD-Tests dann auch theoretisch deuten. Dann könnte auch der sterische Einfluss der Bromatome, insbesondere für das 3,6-Kongener, im Detail untersucht werden. Es scheint nämlich, dass neben der planaren Geometrie der Dibromindole auch noch andere Strukturmerkmale eine Rolle für die EROD-Induktion und die damit zusammenhängende Bindung an den ArH-Rezeptor spielen.

15. Material und Methoden

15.1. Reinigung der Geräte

Dazu wurden die Geräte zur Probenvorbereitung nach dem Waschen mehrfach mit deionisiertem Wasser nachgespült und schließlich mit Aceton und Hexan (beides p.a.) gewaschen. Anschließend wurden die Geräte im Trockenschrank bei 100-105°C gelagert und vor Verwendung erneut mit Aceton und Hexan gespült. Ebenso wurde mit der Soxhlet-Apparatur verfahren: vor der Extraktion des (Feucht-) Sediments wurde eine Spül-Extraktion mit einem Lösungsmittelgemisch aus Hexan und Aceton durchgeführt. Als Probeneinsatz für die Sedimentprobe kam ein Glaseinsatz zur Verwendung. Für die toxikologischen Untersuchungen kamen sterile Einmal-PE Geräte und sterilisierte Glasgeräte zur Anwendung. Diese wurden im Autoklaven bei 120°C mit gespanntem Wasserdampf für 20 min sterilisiert.

15.2. Chemikalien

Zur Extraktion der Sedimentproben wurden Lösungsmittel der Qualitätsstufe „suprapur“ verwendet. Ebenso wurden für die GPC sowie für die präparative und analytische HPLC Lösungsmittel der Qualitätsstufe „suprapur“ bzw. "gradient grade" verwendet. Das Wasser für die HPLC hatte die Qualität "Wasser für die Chromatographie - Lichrosolv". Die in den Synthesen eingesetzten Lösungsmittel wurden zuvor mit CaH₂, das zuvor mit Hexan gespült wurde, getrocknet und anschließend destilliert.

15.3. Blindwerte

Blindwerte wurden für die Lösungsmittel bestimmt, die zur Extraktion, GPC oder Reinigung der Geräte verwendet wurden. Dazu wurden je Charge 50 mL des Lösungsmittels im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit 50 µL Ethanol aufgenommen. Von dieser Lösung wurde 1 µL per GC/MS splitless vermessen. Die Messbedingungen wurden analog zu der zu messenden Probe gewählt. Die Herstellung der Blindwert-Lösungen entsprach dem Vorgehen mit den Sedimentextrakten.

Außer im Hexan konnten in allen Lösungsmitteln mit dieser Methode Phthalate als Kontaminanten nachgewiesen werden. Dioctylphthalat und Diisooctylphthalat konnten, mit Ausnahme in Ethylacetat, in allen übrigen Lösungsmitteln nachgewiesen werden. Für Hexan und Ethanol konnten mit der oben beschriebenen Methode keine weiteren Rückstände nachgewiesen werden.

15.4. Standards

Standardreferenzsubstanzen, sofern sie nicht im Zusammenhang mit dieser Arbeit synthetisiert wurden, sind entweder käuflich erworben oder dem bestehenden Vorrat an Referenzsubstanzen entnommen worden. Der Alkylbenzolstandard wurde von Dr. Stephan Franke, Labor für organisch-chemische Mikroanalytik des Arbeitskreises von Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke, Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg zur Verfügung gestellt. Eine detaillierte Auskunft über die Herkunft sowie die Reinheit findet sich im Anhang, Kapitel 16.2.

Für die eindeutige Identifizierung isomerer Substanzen, basierend auf den Retentionszeiten, wurde zunächst eine Kalibration des GC/MS-Systems mittels eines Alkanrasters vorgenommen.

Alkan- und Fettsäureraster

Die eindeutige Identifizierung isomerer Analyten basierte auf der Bestimmung des Retentionsindex. Für diesen wurde ein Alkanraster (C₈-C₃₀) als Referenz zugrunde gelegt. Dieses Raster diente zugleich als Bezug für weitere Retentionsindices von Vergleichssubstanzen. Der Retentionsindex einer unbekanntem Substanz wird dabei nach der Formel in Gleichung 15-1 berechnet^[87,88,89]:

$$RI_x = 100 * n + \left(\frac{\log_{10}(T_x) - \log_{10}(T_n)}{\log_{10}(T_{n+1}) - \log_{10}(T_n)} \right) * 100$$

RI_x zu bestimmender Retentionsindex

n Alkan, das direkt vor dem unbekanntem Analyten eluiert

T_x Retentionszeit des unbekanntem Analyten

T_n Retentionszeit des Alkans, das direkt vor dem unbekanntem Analyten eluiert

T_{n+1} Retentionszeit des Alkans, das direkt nach dem unbekanntem Analyten eluiert

Gleichung 15-1 Berechnung des Retentionsindex einer unbekanntem Substanz^[87,88,89]

Alle gemessenen Retentionszeiten (z.B. von Referenzsubstanzen) wurden unter den gleichen Messbedingungen^a erzeugt und beziehen sich auf das verwendete Alkanraster. Alle Messungen wurden per GC/MS mit einer Einstellung bis 300 amu gemessen.

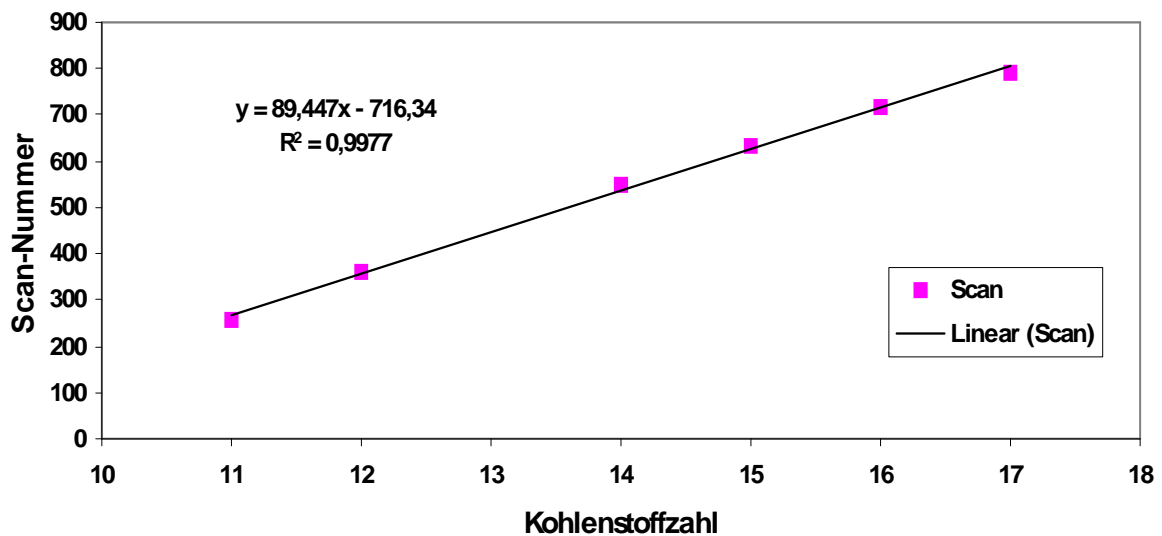


Abbildung 15-1 Alkanraster aus Messungen am VG Massenspektrometer

^a Diese werden im Kapitel 15.8.5 angegeben

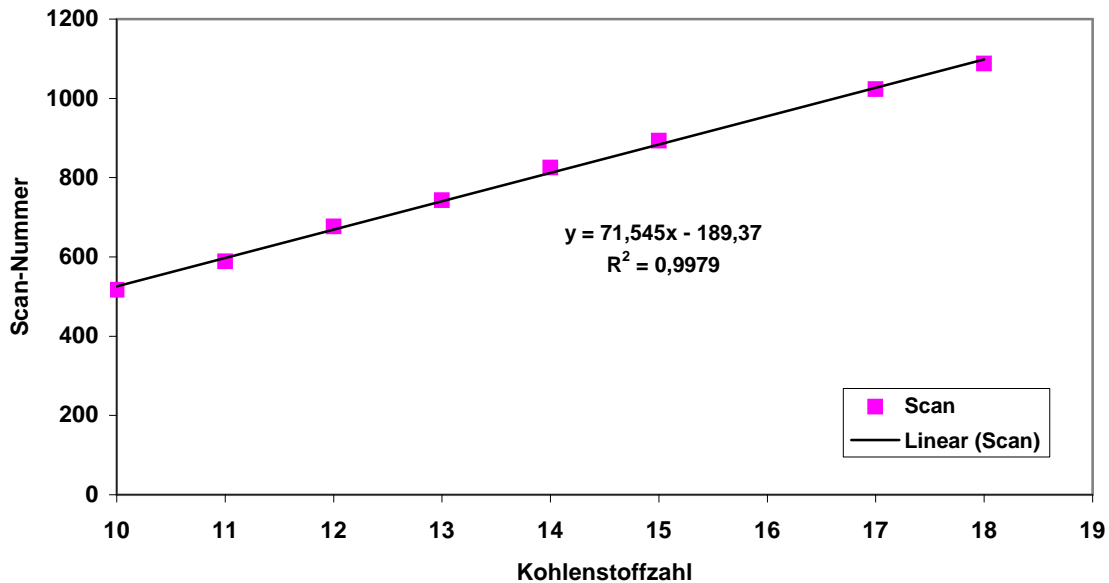


Abbildung 15-2 Fettsäureraster der freien Fettsäuren mit Hilfe eines VG Massenspektrometers gemessen

15.5. Probenahmestellen, Bezeichnungen, Erscheinung und Trockenmassen der Sedimentproben

Sedimentprobenproben des Taihu-Sees

Die Sedimentproben lagen als getrocknete Sedimente vor, die durch Herrn Prof. Shen von der Universität Shanghai dankenswerter Weise zur toxikologisch-chemischen Untersuchung überlassen wurden. Auf die Probenahmestellen wurde im Kapitel 6.2 eingegangen. Eine weitere Vorbereitung der Sedimentproben war nicht erforderlich, so dass diese sofort extrahiert werden konnten. Für die Extraktion wurden jeweils 10g getrocknetes Sediment eingewogen.

Sedimentprobenproben der Mulde

Die Feuchtsedimente enthielten auch eine wässrige Phase, die zuvor abzentrifugiert wurde. Nach Bestimmung der Trockenmassen wurden die Sedimente extrahiert. Zur Bestimmung der Trockenmassen wurde eine gängige Methode der Lebensmittelchemie gewählt.^[148] Eine definierte Menge des Feuchtsediments wird genau eingewogen und 3-6 h bei 103±2 °C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Zwischen den Trocknungsperioden lässt man die Probe im Exsikkator abkühlen und wiegt diese im Anschluß. In der Tabelle 15-2 sind neben der Probenbezeichnung und der Lage auch die Sedimenteinwaagen aufgeführt.

PROBE	TROCKENMASSE [%]
403.626.027	24.3
403.626.028	34.0
403.626.030	23.8
403.626.031	23.9
403.626.032	13.0
403.626.035	23.0
403.626.037	42.7
403.626.040	40.6
403.626.042	26.4

Tabelle 15-1 Trockenmassen der Muldesedimente

Experimenteller Teil

PROBENNR.	EINWAAGE [g] ^a	BEZEICHNUNG
403.628.027	3.08	Lengenfeld Stadt Freibach (Zufluss Plonbach) am Ostrand der IAA,
403.628.028	4.64	Lengenfeld Stadt Freibach östl. d. Mitte d. IAA
403.628.030	2.11	Lengenfeld Stadt Freibach östl. d. Südteils d. IAA
403.628.031	8.82	Lengenfeld Stadt Freibach, östl. d. Südteils d. IAA (Abflussrohr)
403.628.032	3.62	Lengenfeld Stadt Freibach, südl. d. IAA, 10 m vor Plonbach
403.628.035	6.59	Lengenfeld Stadt Sickerwasseraustritt
403.628.037	6.63	Lengenfeld Stadt Plonbach
403.628.040	12.78	Lengenfeld Stadt Plonbach
403.628.042	4.45	Lengenfeld Stadt Plonbach

Tabelle 15-2: Probenbezeichnungen, Einwaagen und Probenahmestellen der Sedimentproben

^a Einwaage = Bezogen auf Trockenmasse

15.6. Extraktion und Probenvorbereitung der Sediment- und Wasserproben

15.6.1. Extraktion der Taihu Trockensedimente

Es wurden jeweils 10 g eingewogen, sequentiell mit Dichlormethan und Ethanol im Soxhlet 8 h extrahiert und die zur Trockne eingegangenen Extrakte in 1 mL Ethanol aufgenommen.

Probenbezeichnung	Einwaage [g]
#0	10
#1	10
#6	10
#9	10
#12	10

Tabelle 15-3 Einwaagen der Trockensedimente zur Extraktion

15.6.2 Extraktion der Mulde Sedimente

Die Sedimente wurden in einem mehrfach zuvor mit n-Hexan und Aceton gespülten Zentrifugengläschen extrahiert. Die festen Bestandteile der Feuchtsedimente wurden zunächst 15 min im Ultraschallbad mit 20 mL eines Hexan/Aceton-Gemisches = 1:1 (v/v) extrahiert und im Anschluss wurde die Extraktion im Schüttelinkubator bei 37°C fortgesetzt. Nach dem Zentrifugieren der Probe wurde die organische Phase abgenommen und die wässrige Phase bei -22°C im Eisfach ausgefroren. Das Eis wurde noch einmal mit wenig n-Hexan gespült und dieses zum Extrakt hinzugefügt. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum zur Trockne eingengt und schließlich in 1 mL Ethanol aufgenommen. Dieser Extrakt wurde dann für die weiteren Untersuchungen sowie für die Fraktionierung eingesetzt. Um auch polarere Komponenten zu erfassen, wurden die Sedimentproben nach dem gleichen Verfahren mit Ethylacetat extrahiert.

15.6.3 Extraktion der Brunnenwasserproben BVV 473-511 aus der Mulde

10 ml der Probe wurden in einem zuvor mit Hexan und Aceton gespülten Zentrifugenröhrchen zunächst zweimal mit 10 ml Hexan und anschließend mit dem gleichen Volumen Dichlormethan jeweils bei 37 °C im Schüttelinkubator 5 h extrahiert. Die organische Phase wurde abgetrennt und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 200 µL Ethanol gelöst und für weitere Untersuchungen eingesetzt.

15.6.4 Clean-up der Sedimentextrakte: Größenausschlusschromatographie (GPC)

Für die Abtrennung von makromolekularen Verunreinigungen (Huminstoffe, Chlorophyll) aus Sedimentextrakten wurde mit der Größenausschlusschromatographie (GPC) gearbeitet. Es kam eine mit der Phase Biobeads SX-8 gepackte Säule der Firma Latex zur Anwendung. Die Glassäule hatte einen Innendurchmesser von 20 mm, eine Länge von 48 cm und ein Füllvolumen von 50-132 mL. Als Laufmittel wurde eine 1:1 (v/v)-Mischung von Ethylacetat und Cyclohexan verwendet. Die GPC-Säule war mit einer HPLC-Pumpe (Merck L 6200) verbunden und die Detektion erfolgte bei höchster Empfindlichkeit mit $\lambda=254$ nm (Merck L4006, mit Deuteriumlampe).

Arbeitsbedingungen:

Laufmittel: Cyclohexan und Ethylacetat (beide zur Rückstandsanalytik, Merck) wurden vor dem Lauf im Verhältnis 1:1 gemischt und die Braunglasflaschen an die Pumpe angeschlossen.

Fluss: Es wurde ein Fluss von 1.5 mL/min gewählt, so dass der Druck nicht 20 mbar überstieg

Injiziertes Volumen: 500 µL des ethanolischen Sedimentextrakts wurden mit Ethylacetat:Cyclohexan = 1:1 (v/v) auf ein Endvolumen von 5 mL verdünnt und ein Volumen von bis zu 1 mL pro Lauf dieser Lösung auf die Säule gegeben.

Arbeitsbedingungen (Forts.):

UV-Detektor: Es wurde die höchste Empfindlichkeit bei einer Wellenlänge von 254 nm gewählt

Die Kalibration der Säule erfolgte durch Messung der Verweilzeit eines Chlorophyllstandards.

15.7. Toxikologische Untersuchungen

15.7.1 Parameter für die Toxikologie

Insbesondere bei Arbeiten mit bakteriellen Systemen, was im stärkeren Maße noch für das Arbeiten mit zellbiologischen Systemen gilt (vgl. EROD, LUC-Assay), muss das Arbeiten unter keimfreien Bedingungen gewährleistet sein, was durch Sterilisation der Geräte bei gespanntem Wasserdampf (120 °C, 20 min) erreicht wird. Verbrauchsmaterialien zur einmaligen Verwendung (PE) sind durch die Hersteller mit Gammastrahlung sterilisiert.

Inkubationszeit

Um die optimalen Wachstumsbedingungen für den *E. coli*-Stamm UC 1121 zu ermitteln, wurden die Bakterien unterschiedlich lange inkubiert. Durch Messung der optischen Dichte und Zählung der resultierenden Koloniezahl der ausplattierten Bakterien auf Vollagarplatten wurde eine optimale Inkubationszeit von 9h ermittelt. Diese Bedingung wurde für alle weiteren Experimente verwendet.

Phänotyp des E. coli- Stammes UC 1121

Um eine gleichbleibende Qualität der Bakterienzellen anzustreben, wurden in regelmäßigen Abständen Tests zur phänotypischen Charakterisierung durchgeführt und neue Bakterienaliquots angesetzt. Diese wurden durch Ausplattieren auf Vollagarmedium und anschließendem Beimpfen der Nährlösung mit gewachsenen Kolonien der Vollagarmediumplatte angezüchtet.

Zur phänotypischen Charakterisierung werden die spezifischen Eigenschaften der Bakterienstämme getestet (Tabelle 15-4). So werden durch Färbung mit Kristallviolett die Bakterienzellwände auf ihre Permeabilität getestet, wobei Zellen mit intakter Zellwand diesen Farbstoff permeieren und schließlich daran zugrunde gehen, so dass auf dem Vollagarmedium kein Wachstum beobachtet werden kann.

Die Arabinoseresistenz wird durch Zugabe von Arabinose im Minimalagar geprüft, wobei nur mutierte Zellen diese Resistenz erlangen. Weitere Testparameter sind die Ampicillinresistenz, die Empfindlichkeit gegenüber Wachstumsfaktoren und die Excisionsreparatur. Das Ausbleiben der Excisionsreparatur wird durch UV-Bestrahlung getestet.

Stamm	UC 1121 (Ara-Test)
<i>Phänotypische Eigenschaften</i>	
Ara-Sensitivität	-
Ampicillin	+
Kanamycin	-
Tetracyclin	-
Chloramphenicol	-
ohne Arginin	-
ohne Methionin	+
ohne NAD	-
EMB-Agar	+
UV-Sensitivität	-
<i>Genetische Eigenschaften</i>	
	araD
	tol C (Zellwand)
	Δ uvrB
	pKM 101

Tabelle 15-4 Phäno- und genotypische Eigenschaften des in dieser Arbeit für den Ara-Test verwendeten Bakterienstamm

In der Tabelle repräsentiert das "-" das Ausbleiben des Koloniewachstums und damit die Empfindlichkeit des Stammes gegenüber dem Weglassen (im Falle der Wachstumsfaktoren) oder dem Hinzufügen von Antibiotika bzw. Arabinose. Die Abkürzung pKM 101 bezeichnet das Plasmid, das in diesem Stamm eingefügt bzw. mit dem dieser Stamm transfiziert/transformiert^a wurde, wobei das Kürzel eine definierte Genkarte des Plasmids signifiziert. In diesem Plasmid wurde eine Mutation im Arabinosegen im araD Abschnitt eingefügt (araD). Tol C bezeichnet die eingefügte Zellwandmutation, die die Zelle für lipophile Substanzen durchlässiger macht. Der Nachteil der Methode der phänotypischen Charakterisierung ist, dass die Funktionstüchtigkeit der Zellen nicht überprüft werden kann. Man kann lediglich feststellen, ob eine Kontamination mit fremden Bakterienzellen vorliegt.

Negativkontrollen

Unter der Spontanmutationsrate versteht man den natürlichen Prozeß des Bakteriums seinen natürlichen, nicht-genetisch modifizierten Zustand, zurückzuerhalten. Dieser Prozeß ist unabhängig von äußeren Einflüssen. Die Zahl der Kolonien, die spontan mutieren, werden in der Negativkontrolle erfasst. Um etwaige Einflüsse durch das Lösungsmittel zu erfassen, werden diese in der Negativkontrolle geprüft. In den meisten Fällen wurden die Negativkontrollen mit Ethanol bzw. DMSO vorgenommen, da in diesen die Testsubstanzen gelöst vorlagen.

Die Mittelwerte der Negativkontrollen mit Standardabweichungen gibt die Tabelle 15-5 wieder. Wie aus Tabelle 15-5 hervorgeht, ist die Koloniezahl der Negativkontrolle auch abhängig vom verwendeten Bakterienstamm und kann deshalb stark variieren.

^a Die Transformation einer Bakterien- oder Säugerzelle stellt die genetische "Programmierung" dieser Zelle mit einer künstlichen Vektor-DNA bzw. Plasmid-DNA dar.

	UC 1121	UC 1101	TA 98	TA 100
ohne S9 - Zusatz, mit DMSO	316 ± 96	340 ± 70	17 ± 5	137 ± 28
mit S9 - Zusatz, mit DMSO			19 ± 6	134 ± 30

Tabelle 15-5 Spontanmutationsraten der in dieser Arbeit verwendeten Stämme^[83]

Positivkontrollen

Zur Indikation eines mutagenen Effektes wird eine Positivkontrolle, die unter gleichen Bedingungen wie die Testsubstanz behandelt wird, parallel im Testsystem mitgeführt. Voraussetzung ist, dass die Testsubstanzen nach dem gleichen Wirkungsprinzip wie die Positivkontrollen mutagen wirken.

In Experimenten ohne metabolische Aktivierung wurde **N-Methyl-N'-nitronitrosoguanidin** (MNNG) eingesetzt, das ein „direct acting mutagen“ darstellt und, als Diazomethan-Precursor, methylierend wirkt. Für Experimente mit metabolischer Aktivierung wurde 2-Aminoanthracen, das intermediär ein Nitreniumion bildet, eingesetzt (vgl. Abbildung 3-2, S. 28).

Das Verhältnis der Koloniezahl der Testsubstanz zur Koloniezahl in der Lösungsmittelkontrolle wird als Induktionsrate bezeichnet. Unter Mutagenität im Bakterienmutagenese-Experiment versteht man definitionsgemäß eine Verdoppelung der Koloniezahl der Testsubstanz gegenüber der Koloniezahl in der Negativ- resp. Lösungsmittelkontrolle. Die Zahl der Kolonien in der Negativ- resp. Lösungsmittelkontrolle des Mutagenesetests wird als Spontanmutationsrate bezeichnet.

Die in Experimenten ermittelten mutagenen, nicht-toxischen Dosen von 2-Aminoanthracen betrug 2 µg (nicht gezeigt) bzw. für MNNG 10 µg (Abbildung 15-1). Diese Dosen wurden für alle Experimente angewendet.

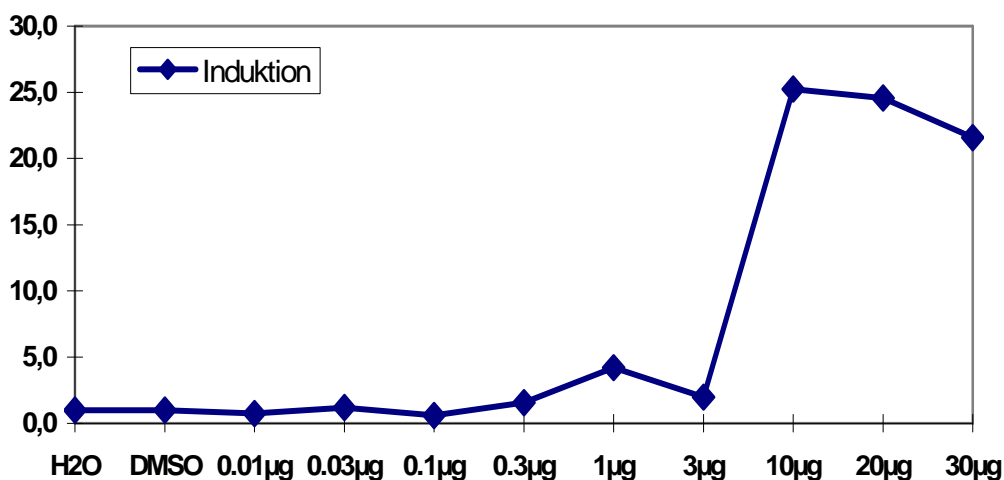


Abbildung 15-1: D/W-Kurve für MNNG im ARA-Test

Arabinoseresistenz-Test (Ara-Test)/ Ames-Test – Rezepte

Testverfahren Ara-Test

Bakterienanzucht:

20 mL Nährbrühe werden mit 100 µL Bakterienaliquot angeimpft und 9h im Schüttelinkubator bei 37°C und 90 Umdrehungen/Minute geschüttelt – Die Dichte beträgt dann annähernd $5 \cdot 10^8$ Bakterien/mL (Überprüfung der optischen Dichte bei $\lambda=410$ nm). Anschließend wird die Suspension bei 3000 Umdrehungen/min (20 min) zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Bakterienpellet wird in 20 mL VB-Medium (1x) resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wird für den Mutagenese-Assay direkt, d.h. ohne weitere Verdünnung, eingesetzt. Für den Zytotoxizitätstest wird diese Suspension auf $1:10^6$ mit VB-Medium (1x) verdünnt.

Test.

Pro Dosisstufe werden 3-4 Parallelen bestimmt. Die Testlösungen setzen sich wie folgt zusammen:

30 µL Lösungsmittel (für die Negativkontrolle) bzw. Testsubstanz (od. Positivkontrolle)

500 µL VB-Medium (1x) bzw. S9-Mix

100 µL Bakteriensuspension

Die Testansätze werden dann für 20 min bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert und anschließend mit 2 mL Weichagar versetzt und auf den Agarplatten ausplattiert. Die Platten werden für 24 Stunden (Zytotoxizitätstest) bzw. 72 Stunden (Mutagenesetest) im Inkubator inkubiert. Die Koloniezahl wird abschließend mit einem Koloniezähler ausgezählt. Die Überlebensrate im Zytotoxizitätstest ergibt sich aus dem Verhältnis des Mittelwerts aus der Koloniezahl der Test Verbindungen zur Lösungsmittelkontrolle. Die Induktion im Mutagenesetest ergibt sich aus dem Verhältnis des Mittelwerts aus der Koloniezahl der Testverbindung zur Lösungsmittelkontrolle.

Man spricht (entsprechend der OECD-Empfehlung ^[149]) von einem eindeutig positiven Ergebnis im Mutagenese-Experiment, wenn die Induktion eine Verdoppelung der Koloniezahl relativ zur Lösungsmittelkontrolle ergeben hat.

Kontrollen

Die Positivkontrolle im Experiment ohne metabolische Aktivierung erfolgte mit 30 µg MNNG/Platte absolut. 2-Aminoanthracen, von dem 1 µg/Platte absolut eingesetzt wurde, diente im Experiment mit metabolischer Aktivierung als Kontrolle.

Testverfahren Ames-Test

Bakterienanzucht:

20 mL Nährbrühe werden mit 100 µL Bakterienaliquot angeimpft und 7h im Schüttelinkubator (37°C, 90 Umdrehungen/Minute) inkubiert. Die Bakteriendichte beträgt annähernd $5 \cdot 10^8$ Bakterien/mL (Überprüfung der optischen Dichte bei $\lambda=410$ nm). Die erhaltene Bakteriensuspension wird direkt im Test eingesetzt.

Test

Die Glas – und Kunststoffartikel sind vor Gebrauch zu autoklavieren (vgl. 6.1.). Zu 20 µL der Positivkontrolle (s. dort) bzw. der Testsubstanz, von denen 3 Platten/Dosis eingesetzt werden, wird 100µL Bakteriensuspension und 100 µL Phosphatpuffer (bzw. 100 µL S9 Mix, s.u.) gegeben und diese auf einem Vortexer kräftig geschüttelt. Die Mischungen werden anschließend für 30 min bei 37°C und 120 Umdrehungen/min im Trockeninkubator vorinkubiert.

Nach Zugabe von 2 mL flüssigem Top-Agar wird die Mischung geschüttelt und dann auf die Agar-Platten ausgegossen. Diese werden zur gleichmäßigen Verteilung der Flüssigkeit gleichmäßig geschwenkt und anschließend 48 Stunden bei 37°C im Inkubator bebrütet.

Kontrollen

Die folgende Tabelle gibt die Dosierung der Positivkontrollen wieder, die sich nach dem verwendeten Stamm und der Verwendung eines metabolisierenden Systems (S9-Mix) richtet.

Stamm	- S9	+S9
TA 98	2-Nitrofluoren, 2 µg/20µL	2-Aminoanthracen, 1µg/20µL
TA 100	NaN ₃ , 1µg/20 µL	2-Aminoanthracen, 1µg/20µL
TA 1535	NaN ₃ , 1µg/20 µL	2-Aminoanthracen, 1µg/20µL

Tabelle 15-6: Gentyrische Charakteristika der *E. coli* Stämme

Rezepte

ARA-Test mit *Escherichia coli*

Nährlösung:

25 g/L Nutrient Broth Nr. 2, Oxoid (autoklaviert bei 120°C) mit Ampicillinzusatz Casaminosäure-Zusatz beim Stamm *E. coli* UC 1123

Vogel-Bonner (VB)-Medium (50x):

Aqua dest. (45°C)	670mL
MgSO ₄ *7 H ₂ O	10g
Zitronensäure* H ₂ O	100 g
K ₂ HPO ₄	500g
NaNH ₄ HPO ₄ * 4 H ₂ O	175g

Jedes Salz wird vollständig gelöst, bevor die Zugabe des nächsten Salzes erfolgt. Die Lösung wird auf 1L Endvolumen aufgefüllt und autoklaviert.

VB-Medium 1x (1fach):

Aqua dest	980 mL
VB Medium (50x)	20 mL

Nutrient Agar (für Cytotoxizitätstest) :

28 g Oxoid Agar , 1000 mL Aqua dest., 25 mg Ampicillin

Nährbrühe zur Bakterienanzucht

Oxoid nutrient broth No. 2	25 g
Aqua dest.	1000 mL
Ampicillin	25 mg

Antibiotikazusätze können je nach verwendeten Stamm variieren – Ampicillin für UC – Stämme

Weichagar (Top-Agar):

Oxoid purified Agar	6g
NaCl	5g
Aqua dest.	800 mL

Autoklavieren, dann vor Benutzung folgende Lösungen hinzufügen:

D-Glukose	250 mg/100 mL
d-Biotin	12 mg/100 mL

Experimenteller Teil

Selektiv Minimalagar für ARA^R Mutanten der *E. coli* Stämme UC 1121, UC 1122 und UC 1123

Oxoid purified Agar	17 g
Aqua dest.	900 mL
Autoklavieren, dann folgende Lösungen hinzufügen	
VB Medium (50x)	20 mL
Glycerol (99%), 20g/100 mL	10 mL
L-Arabinose (sterilfiltriert), 20g/100 mL	10 mL
Arginin 1g/100 mL	4 mL
Methionin 1g/100 mL	4 mL
NAD (sterilfiltriert) 0.5g/100 mL	1 mL
d-Biotin (sterilfiltriert) 0.01g/100 mL	50 mL
Adenin (sterilfiltriert) 1.35g/100 mL 0.1M HCl	7.5 mL
Thiamin (sterilfiltriert) 0.5g/100 mL	1 mL
Ampicillin	25 mL

Ames-Test mit *S. typhimurium*

Agarplatten (Minimal-Glukose-Platten)

Das Medium besteht aus 1.5% Agar, 2% Glukose und Vogel-Bonner-Salzlösung in destilliertem Wasser. Nach dem Autoklavieren wird das Medium auf ca. 50°C abgekühlt und dann unter einer sterilen Werkbank in sterile Kunststoff-Petrischalen (25-30 mL) gegossen. Nach dem Abkühlen werden die Agar-Platten im Kühlschrank resp. Kühlraum aufbewahrt. Die Platten werden 1 Tag vor dem Versuch aus dem Kühlschrank genommen.

Top Agar

Der Top Agar besteht aus 0.6% Agar und 0.6% NaCl in destilliertem Wasser. Der Ansatz wird 20 min bei 120°C im Autoklaven sterilisiert und anschließend in Portionen zu 100 mL im Kühlschrank verwahrt. Vor dem Versuch wird der Top Agar in der Mikrowelle geschmolzen und 20 mL einer sterilen Lösung von 0.5 mM Histidin-HCl & 0.5 mM Biotin hinzugefügt und gut gemischt. Der Top Agar wird im Wasserbad bei 42°C aufbewahrt und flüssig gehalten.

S9 Mix (S9-Fraktion+Kofaktoren)

Die Fraktion (bzw. der Überstand), die durch Zentrifugation bei 9000g aus dem Rattenleberhomogenat erhalten wird, bezeichnet man als S9. Die Ratte wurde dafür zuvor mit Arochlor 1254 (Phenobarbital + β -Naphthoflavon) behandelt, um so die metabolische Aktivität der Leberzellen zu steigern. Die Fraktion wird bei -80°C gelagert und vor Verwendung durch Zugabe von Co-Faktoren und Phosphatpuffer pH 7 zur Anwendung fertiggestellt.

Der fertige S9-Mix hat folgende Zusammensetzung:

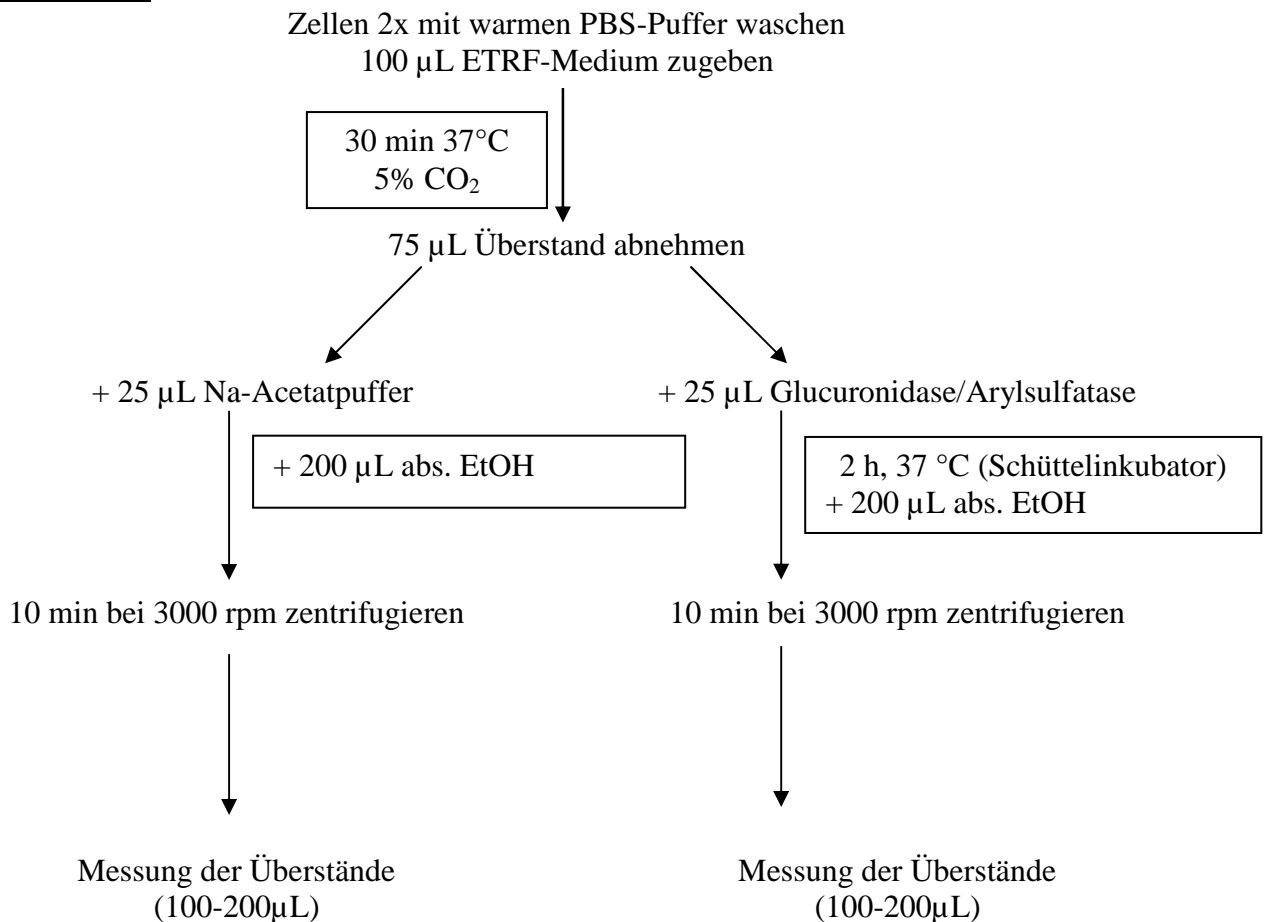
31.5 mg NADP und 14.0 mg Glukose-6-Phosphat werden in 8.6 mL Natriumphosphatpuffer (pH 7.14) gelöst. Dazu werden 100 μ L KCl-MgCl₂-Stammlösung und 1 mL S9-Fraktion gegeben. Der Phosphatpuffer und die KCl-MgCl₂-Stammlösung werden vorher über einen Sterilfilter sterilfiltriert. Glukose-6*-Phosphat und NADP werden am Versuchstag frisch im Phosphatpuffer gelöst. Der S9-Mix wird während des Versuchs auf Eis aufbewahrt.

15.7.3 Ethoxyresorufin-O-Deethylase-Test (EROD)

Testprinzip

Cytochrom P450 1A1 katalysiert die Desalkylierung an Heteroatomen (S,O,N), was hier durch das Ethoxyresorufin ausgenutzt wird. Die Fluoreszenz des Resorufin kann dann im Medium bei $\lambda = 530$ nm gemessen werden. Um eine weitere Oxidation des Resorufins durch das cytosolische Enzym Diaphorase zu vermeiden, wird dem Medium Dicumarol zugesetzt. Da Resorufin endogen weiter zu nicht-fluoreszierenden Produkten konjugiert (Glucuronidierung bzw. Sulfatierung) werden kann, empfiehlt sich eine Inkubation der Mediumüberstände mit β -Glucuronidase bzw. Arylsulfatase.

Testverfahren.



Erläuterungen.

Das ETRF-Medium ist erst kurz vor Gebrauch anzusetzen und auf 37°C vorzuwärmen. Für die Messung der Kalibrationskurve mit Resorufin muss eine eigene Platte angesetzt werden, welche zusammen mit der Test-Platte inkubiert wird. Die Messung der Überstände (100-200 µL) erfolgt auf einer schwarzen Platte.

Nach der Behandlung mit ETRF-Medium können die Zellen normal weiterkultiviert werden:

1. ETRF-Medium vollständig absaugen
2. Zellen 2x mit warmen PBS-Puffer waschen
3. Medium zugeben

Für die Positivkontrolle wird 2 µM Methylcholanthren sowie 10⁻⁸ mM 2,3,7,8-TCDD eingesetzt.

Messung

- Kalibrationskurve

Die Standards werden kurz vor Gebrauch gemäß dem Pipettierschema (Tabelle 15-7) in Kulturmedium angesetzt. Zur Erstellung der Kalibrationskurve werden die Standards B-H eingesetzt. Als Stammlösung wird eine 10 mM Resorufin-Lösung verwendet.

Nr.	pmol/mL	Verdünnung	Ansatz
A	$1 \cdot 10^6$	1:100	10 μ L Stamm+ 990 μ L
B	2000	1:50	10 μ L A + 490 μ L
C	1000	1:2	250 μ L B+250 μ L
D	500	1:2	250 μ L C+250 μ L
E	250	1:2	250 μ L D+250 μ L
F	125	1:2	250 μ L E+250 μ L
G	62.5	1:2	250 μ L F+250 μ L
H	31.25	1:2	250 μ L G+250 μ L

Tabelle 15-7: Verdünnungsreihe für die Kalibration im EROD-Test

Die Platten werden mit einem Messprogramm im Fluorimeter gemessen.

Chemikalien/Lösungen

- PBS-Puffer w/o Ca, Mg (Biochrom, L 1825), 4 °C
- 0.8 mM Ethoxyresorufin (Sigma, E 3763): 1 mg/5.18 mL DMSO, aliquotieren und in sterilen, lichtgeschützten Gefäßen bei -20°C lagern
- 10 mM Resorufin (Sigma, R 3257): 23.52 mg/10 mL H₂O, aliquotieren und bei -20°C lagern
- 1 mM Dicumarol (Sigma, M 1390): 8.4 mg/25 mL H₂O
- 0.1 M Natriumacetat-Puffer pH 4.5: 4,1015 g/ 500 mL H₂O, pH mit Essigsäure einstellen
- β -Glucuronidase/Arylsulfatase (Roche 127060,2500 FU/20000 RU):
- stets frisch ansetzen, 15 Fisherman Units/ 120 Roy Units pro Well
- 0.15 μ L Enzym/25 μ L Na-Acetatpuffer (1:166 v/v)

ETRF-Medium, stets frisch anzusetzen:

- Kulturmedium gemäß der Vorschrift 1/1
- + 10 μ M Hydroxycumarin (stock 100x)
- + 8 μ M Ethoxyresorufin (stock 100x)

Proteinbestimmung nach Bradford (für den EROD-Test) - *Prinzip der Proteinbestimmung*
Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgt nach dem Prinzip von Bradford^[150], das auf einer Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blue in saurer Lösung^a an basische und aromatische Aminosäurereste basiert.

^a pH Wert ist vorgegeben

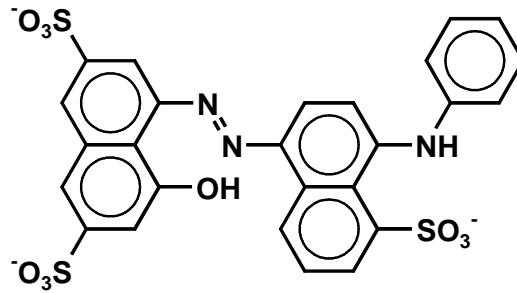


Abbildung 15-2: Struktur von Coomassie-Brilliant-Blue

Durch die Bindung des Coomassie-Brilliant-Blue kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von $\lambda = 465 \text{ nm}$ zu $\lambda = 595 \text{ nm}$. Für die Proteinbestimmung wird eine Kalibration mit einem Proteinstandard (BSA = Bovine Serum Albumin) vorgenommen. Zellen werden mit Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wird mit $60 \mu\text{L}$ Puffer eingefroren. Nach dem Auftauen des Zellpellets wird dieses in Abhängigkeit von der Zelldichte, die durch Auszählen unter dem Mikroskop bestimmt wird, verdünnt. Die Verdünnung muss so erfolgen, dass das Endvolumen $50 \mu\text{L}$ beträgt. Hinzu kommen $200 \mu\text{L}$ des Farbstoffs Coomassie-Brilliant blue, so dass eine 1:5 Verdünnung vorliegt. Dieser Ansatz wird im Dunkeln 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit der Farbstoff an das Protein bindet.

Die Messung erfolgt dann bei $\lambda = 620 \text{ nm}$ im Elisa-Reader. Ausgehend von einer Bovine Serum Albumine (BSA)-Stammlösung der Konzentration 2 mg/mL werden die folgenden Verdünnungen (vgl. Tabelle 15-8) für die Kalibration angesetzt.

Konzentration	Verdünnung	Mischung [μL]
$20 \mu\text{g/mL}$	1:100	$2 \mu\text{L BSA} + 198 \mu\text{L}$
$40 \mu\text{g/mL}$	1:50	$4 \mu\text{L BSA} + 196 \mu\text{L}$
$60 \mu\text{g/mL}$	1:33	$6 \mu\text{L BSA} + 194 \mu\text{L}$
$80 \mu\text{g/mL}$	1:25	$8 \mu\text{L BSA} + 192 \mu\text{L}$
$100 \mu\text{g/mL}$	1:20	$10 \mu\text{L BSA} + 190 \mu\text{L}$
$120 \mu\text{g/mL}$	1:16	$12 \mu\text{L BSA} + 188 \mu\text{L}$
$140 \mu\text{g/mL}$	1:14	$14 \mu\text{L BSA} + 186 \mu\text{L}$

Tabelle 15-8: Verdünnungsreihe für die Kalibration mit dem BSA-Standard

15.7.4 Zytotoxizität in H4IIE-Zellen (Hepatomzellen)

In diesem Fall wird eine geringe Anzahl von Zellen (200 pro Flasche) in Kultur mit der Testsubstanz behandelt. Dabei kommt es je nach Toxizität zu einer dosisabhängigen Reduktion überlebender Zellen. Anschließend lässt man die Zellen eine Woche lang wachsen, wobei die überlebenden Zellen Kolonien bilden, die unter dem Mikroskop manuell ausgezählt werden.

15.7.5 Östradiol-Verdrängungsassay mit $\text{ER}\alpha$ und $\text{ER}\beta$

Das Experiment wird unter ständiger Eiskühlung durchgeführt. Die Östrogenrezeptoren werden mit TEDG-Puffer auf die Endkonzentration von $0.2 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ verdünnt und von der Stammlösung des ^3H -Östradiols werden Aliquote mit $1.2 \text{ pmol } [^3\text{H}]\text{-Östradiol}$ ($1.2 \mu\text{Ci}$) und den unmarkierten Kompetitoren (Testsubstanzen) in aufsteigender Konzentration über Nacht bei 4°C gelagert. Das Verhältnis von Rezeptor zu Östradiol entspricht genau 1: 1.2, so dass eine vollständige Absättigung der Rezeptoren mit dem Östradiol vorliegt.

Ebenso wird eine Negativkontrolle, bestehend aus Puffer und $[^3\text{H}]\text{-Östradiol}$, und eine Positivkontrolle, bestehend aus DES und $[^3\text{H}]\text{-Östradiol}$, über Nacht bei 4°C gelagert.

Dann werden die Rezeptor-Ligand-Komplexe durch Zugabe von 500 μL Hydroxylapatit an dieses gebunden und die Lösungen durch leichtes Kippen der Ansatzgefäße gut homogenisiert. Die Lösungen werden anschließend sehr kurz bei 4000-5000 RPM zentrifugiert (kurz antippen) und das ungebundene Östradiol mit der überstehenden Lösung abgegossen.

Um den Anteil an ungebundenem Östradiol vollständig zu entfernen, muss das Hydroxylapatit mit 1 mL TEDG-DTT Puffer dreimal gewaschen und anzentrifugiert werden. Nach dem Waschvorgang wird das Pellet in 1 mL 2N HCl vollständig aufgelöst, in ein Szintillationsgefäß überführt und mit 9 mL Szintillationsflüssigkeit (Ready Flow III, Liquid Scintillation Cocktail, Beckman) aufgefüllt. Die fertige Lösung wird im Szintillationszähler gemessen. Die Messung des Szintillationscocktails erfolgt über einen Zeitraum von 5 Minuten, wobei alle 30 Sekunden ein Messwert genommen wird, und die Messwerte am Ende gemittelt werden.

Vorschrift zur Durchführung des Verdrängungsassays

TEDG-Puffer

200 mmol/L Tris, pH 7,5	25 mL (10 mmol/L Endkonzentration)
75 mmol/L EDTA	10 mL (1,5 mmol/L Endkonzentration)
99,9% (v/v) Glycerol	50 mL (10% Endkonzentration)
Demineralisiertes Wasser	auf ein Endvolumen von 500 mL auffüllen

1 mol/L DTT (Dithiothreitol)-Stammlösung

DTT	1,542 g	0,771g	0,386g
Aqua dem.	10 mL	5 mL	2,5 mL

TEDG-DTT-Puffer

Je mL TEDG wird 1 mmol/L DTT-Stammlösung zugesetzt. Das DTT ist instabil und muss frisch zum TEDG-Puffer zugesetzt werden.

Hydroxylapatit (HAP)

Hydroxylapatit	100 g
TEDG-Puffer	100 mL

Rekombinanter, humane Östrogenrezeptoren ER α , - β (Panvera, Madison, WI)

Die Rezeptoren werden in bestimmter Konzentration [pmol ^3H -Östradiol/mL] und Aktivität [pmol ^3H -Östradiol gebunden/mg] als Stammlösung geliefert und müssen entsprechend verdünnt werden. Es werden Aliquots für jeweils einen Versuch abgefüllt und bei -80°C gelagert. Die Berechnung der Rezeptormenge erfolgt analog dem beiliegenden "Certificate of Analysis" des jeweiligen Rezeptors.

^3H -Östradiol: 1,2 pmol ^3H -Östradiol in 5 μL EtOH

21 μL des ^3H -Östradiols (1 mCi/mL) werden zunächst in der Vakuumszentrifuge getrocknet. Der Rückstand wird auf 1000 μL (entspricht 0.24 pmol/ μL) aufgefüllt. Von dieser Lösung entnimmt man 5 μL je Probe, was 1.2 pmol ^3H -Östradiol entspricht.

1 $\mu\text{mol/L}$ DES-Lösung (Positivkontrolle): DES im gleichen Lösungsmittel wie Testsubstanz lösen. Konzentration: 1000 μL => 100 mmol/L

15.7.6 Luciferase-Reporterassay (LUC-Assay) mit MVLN Zellen

Um die Transkriptionsaktivität der Rezeptoren nach Ligandenbindung zu testen, wurde der Luciferase-Assay durchgeführt. Hierzu muss in den Zellen, die getestet werden sollen, ein mit dem ER gekoppeltes Reporterkonstrukt vorliegen, das die Messung estrogener Effekte entsprechend ihrer Stärke zulässt. Zu diesem Zweck werden MCF-7 Zellen, Passage 160, mit einem E2-responsiven Vektor transfiziert, der die Synthese der Firefly Luciferase (FFLuc) voran treibt (ERE-TK-Luc) sowie einem Kontroll-Vektor (pRL-TK), der konstitutiv die Renilla Luciferase (RLuc) exprimiert.

Transiente Transfektion der MCF-7 Zellen

MCF-7 Zellen, Passagen 159-160, wurden in 12-well-Platten in Standardmedium in Kultur genommen und bei ausreichendem Konfluenzgrad (50-60%) transient mit 1µg ERE-TK-Luc und 1µg pRL-TK unter Anwendung des Lipofectamine Plus Reagenzes (Invitrogen) transfiziert wie bei Monroe et al. ^[151] beschrieben (s. Anhang). Drei Stunden nach der Transfektion werden die Zellen gewaschen und mit 10% cs-FBS enthaltendem DMEM/F12 versehen. Die weitere Behandlung erfolgt 24 Stunden später mit den Testsubstanzen in den Konzentrationen 0,1, 1,0 und 10,0µg/ml oder 10⁻⁸M E2 in DMEM/F12 mit Zusatz von 10% cs-FBS oder mit diesem Medium allein. Je Behandlung wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach wiederum 24 Stunden werden die Zellen geerntet (s. Anhang) und das Lysat im Luciferase Assay eingesetzt.

Transfektion von MCF-7 Zellen mit ERE-TK-Luc und pRL-TK:

Der pRL-TK Vektor (Promega, Madison, WI, Nr. E2241) enthält eine Herpes simplex Virus Thymidinkinase (HSV-TK)- Promotorregion stromaufwärts von RLuc. Der HSV-TK sorgt für eine geringe konstitutive Expression des RLuc Kontrollreporters in den Zellen. Der pRL „Kontroll-ReportERVektor“ enthält die cDNA, welche die Renilla Luciferase (RLuc) kodiert.

Die konstitutive Expression der RLuc wird durch bestimmte Promotor Elemente, die sich auf dem Plasmid befinden, sichergestellt. ERE-TK-Luc (Promega) ist der estrogeninduzierbare Firefly Luciferase Reporter Vektor. Die Transfektion wird in 12-well Platten vorgenommen. Zunächst werden in jedes Well 250µl serumfreies DMEM/F12 gegeben, welches 1,33µl Plus Reagent (Invitrogen) enthält. Diese Mischung ist direkt vor der Transfektion im nötigen Maßstab herzustellen. Die Platten werden für 10-15min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun werden 250µl der ebenfalls frisch hergestellten Mischung aus serumfreiem DMEM/F12 und Lipofektamin (1,33µl in 250µl Medium) auf die Zellen gegeben und wiederum 15min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 500µl Transfection Mix zugegeben. Dieser besteht aus 50ng pRL-TK und 0,5µg ERE-TK-Luc je Well und wird direkt vor Zugabe in der notwendigen Menge hergestellt.

Die Transfektion findet bei 37°C über 3 Stunden im Inkubator statt. Im Anschluss wird das Medium mit DMEM/F12, welches 10% cs-FBS enthält, ersetzt und die Zellen, wie in oben beschrieben, behandelt.

Ernten der MCF-7 Zellen

Nach der 24 Stunden Behandlung müssen die MCF-7 Zellen zum Einsatz im Luciferase Assay geerntet werden. Unter dem Mikroskop wird der Zustand der Zellen überprüft. Dies geschieht unter Anwendung der „Passive Lysis“ Methode, die bei Promega beschrieben ist (Instructions zu Kat.Nr. E1980). Zum Ernten der Zellen wird Passive Lysis Buffer (5X) verwendet (Promega Nr. E1941), der zunächst 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt wird.

Pro Well werden nach zweimaligem Waschen mit PBS 200µl des verdünnten Puffers (1X) eingesetzt; sind nur wenig Zellen in den Wells vorhanden, kann das Volumen auf 100µl reduziert werden. Die Platten werden für 15min bei Raumtemperatur geschüttelt bis zur vollkommenen Lyse der Zellen (Mikroskop). Das Lysat kann nun direkt aliquotiert (20-30µl) im Luciferase Assay eingesetzt oder in markierte Eppendorfgefäße überführt werden zur Lagerung bei -80°C.

Durchführung des Luciferase Assays

Die Bestimmung der Luciferase Aktivität erfolgt unter Anwendung des „Dual-Luciferase Reporter Assay Systems“ (Promega, Madison, WI). Es handelt sich um ein duales Reportersystem, da simultan zwei individuelle Reporterenzyme innerhalb eines Systems exprimiert und nacheinander gemessen werden, und zwar die Luciferase des Glühwürmchens (Firefly, lat. *Photinus pyralis*) und die der Gattung Renilla (lat. *Renilla reniformis*). Die Expression des einen Reporters ist hierbei an spezielle experimentelle Bedingungen geknüpft, und zwar wird das Promotor-Reporter-Gen-Konstrukt ERE-TK-Luc durch E2 reguliert, während

die Aktivität des co-transfizierten Reporters nicht von diesen abhängig ist (keine E2-Regulation des pRL-TK). Er dient somit als interne Kontrolle. Bezieht man die jeweils gemessene FFLuc-Aktivität auf die entsprechende RLuc-Aktivität, so ist es möglich variable Parameter im Experiment, wie beispielsweise Unterschiede in der Zahl lebender Zellen, in der Effizienz der Transkription oder in den Pipettierolumina, zu minimieren.

Zuerst wird in einem Luminometer die Lumineszenz des Firefly Reporters vermessen, die durch Zugabe des Zelllysats in das vorgelegte Luciferase Assay Reagent II initiiert wird. Sofort danach wird durch Zufügen des „Stop&Glo“-Reagent[®] in denselben Reaktionsansatz der erste Effekt gequencht und die Reaktion der Renilla Luciferase in Gang gesetzt (Abbildung 15-3). Dies ist möglich, da die Strukturen der beiden Luciferase Enzyme voneinander verschieden sind und die Enzyme unterschiedliche Substratanforderungen besitzen.

Die Firefly und auch die Renilla Luciferase fungieren direkt nach ihrer Translation als genetischer Reporter. In der Firefly Luciferase katalysierten Reaktion wird unter Beteiligung von ATP, Magnesium und Sauerstoff das Luciferin zum Oxiluciferin oxidiert und Photonen werden emittiert (s. Abbildung 15-3), die gemessen werden. Die Renilla Luciferase oxidiert unter Verbrauch von Sauerstoff das Coelenterat-Luciferin zum Coelenteramid und erzeugt auf diese Weise Lumineszenz.

Der Luciferase-Assay umfasst folgende Schritte:

1. Zufügen von 20µl Zelllysats zum Luciferase Assay Reagent II, das in Luminometer Gefäßen zu je 100µl vorgelegt wurde. Durchmischen durch auf und ab Pipettieren.
2. Messen der Firefly Luciferase Aktivität.
3. Zugabe von 100µl „Stop&Glo“-Reagent[®]. Durchmischen.
4. Messen der Renilla Luciferase Aktivität.
5. Das Luminometer wird so programmiert, dass es die Messwerte automatisch normalisiert (FFLuc gegen RLuc) und den Mittelwert jeder Dreierbestimmung samt Standardabweichung errechnet. Die Ergebnisse, ausgedrückt in relativen Lichteinheiten (Relative Light Units, RLU), werden anschließend grafisch dargestellt. ^[152]

Experimenteller Teil

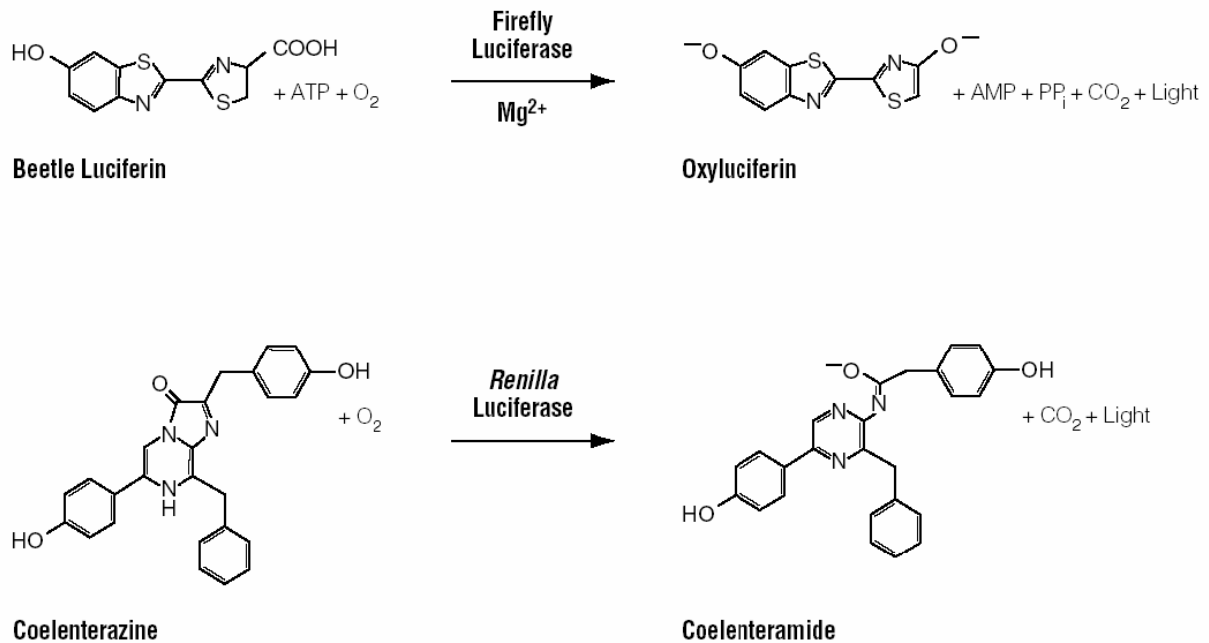


Abbildung 15-3 Verlauf der Luciferasereaktion. Zuerst wird die Lumineszenz des Firefly Reporters vermessen (Oxyluciferin), die durch Zugabe des Zelllysats in das vorgelegte Luciferase Assay Reagent II (enthält Beetle Luciferin) initiiert wird. Sofort danach wird durch Zufügen des „Stop&Glo“ Reagent (enthält Coelenterazine) in denselben Reaktionsansatz der erste Effekt gequencht und die Reaktion der Renilla Luciferase in Gang gesetzt. Das durch die Reaktion emittierte Licht dient der zweiten Messung.

Die Bestimmung der Luciferase Aktivität erfolgt unter Anwendung des Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Systems (Promega, Madison, WI, Nr. E1980). Das Luminometer ist ein Turner Designs 20/20 Luminometer (Sunnyvale, CA, USA). Die Herstellung des Luciferase Assay Reagent II, des Firefly Substrats, erfolgt durch Zugabe des mit gelieferten Luciferase Assay Buffers II zum lyophilisierten Substrat.

Das „Stop&Glo“-Reagent[®], das Renilla Substrat, wird durch Lösen des Stop&Glo[®] Substrate in seinem Gefäß mit Hilfe des Stop&Glo[®] Solvent hergestellt. Die Mischung wird 10sec gevortext und sollte leuchtend gelb sein. Das Gefäß wird beschriftet mit „50X Renilla Substrat“. Zum Einsatz im Assay wird die benötigte Menge des rekonstituierten Stop&Glo[®] Substrate zu einem Volumenteil mit 50 Volumenteilen Stop&Glo[®] Buffer versetzt. Diese Mischung wird als Stop&Glo[®] Reagent bezeichnet.

Rezepte

Wachstumsmedium

DMEM + Ham's F12 Nutrient Mixture	15.6 g
NaHCO ₃	1.2 g
Aqua dest.	1000 mL
Rinderinsulin (Stock 10 ⁻⁵ mol/L)	10 ⁻⁸ mol/L 1ml/L
Natriumpyruvat (Stock 100 mmol/L)	1 mmol/L 1%
FCS	10%
Streptomycin	50 µg/mL
Penicillin	50 U/mL
Glutamin	2 mmol/L

Assaymedium (vgl. Wachstumsmedium)

DMEM + Ham's F12 Nutrient Mixture	15.6 g
NaHCO ₃	1.2 g
Aqua dest.	1000 mL
Rinderinsulin (Stock 10 ⁻⁵ mol/L)	10 ⁻⁸ mol/L 1ml/L
Natriumpyruvat (Stock 100 mmol/L)	1 mmol/L 1%
csFCS	10%
Streptomycin	50 µg/mL
Penicillin	50 U/mL
Glutamin	2 mmol/L

PBS-Puffer

NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
KCl	0.2 g
Aqua dest.	1000 mL

Puffer muss auf pH 7 eingestellt werden, sterilfiltriert werden und bei 4°C gelagert werden

PBS + Ca²⁺/Mg²⁺

CaCl ₂	0.111 g
MgSO ₄ *7 H ₂ O	0.2465 g
PBS	1000 mL

Vorschrift.

1. Tag : Zellen ausplattieren

- Medium absaugen
- Zellen 3x mit je 5mL PBS waschen
- Zellen in 10x Trypsinlösung lösen
- 9 ml Voll-Medium zugeben
- Zellsuspension in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführen und 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren
- Überstand absaugen und Pellet mit 1x PBS waschen

- 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren, Überstand absaugen und Zellen in 10 mL stripped Medium (DCC-FBS) aufnehmen
- Zellen zählen und Zellzahl mit gestrippten Medium auf 1.25x10⁵ Zellen/mL einstellen
- Auf eine 96-Well-Platte werden je Well 250 µL der Zellsuspension mit einer Multipipette pipettiert → Zellzahl: 3,125x10⁴ Zellen /Well
- Zellen für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator wachsen lassen

2. Tag : Induktion der Zellen

- Östradiolstandard in einer Verdünnungsreihe ansetzen:
100 nM, 33.3 nM, 11.1 nM, 3.7 nM, 1.24 nM, 0.31 nM
- Testsubstanzen verdünnen
- Je Well wird 2.5 µL der zu testenden Substanz direkt ins Medium pipettiert
- Auf jeder 2. Platte wird eine Östradiol-Verdünnungsreihe mitlaufen gelassen
- Die Platten werden 72 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert

5. Tag : Messung

- Medium vorsichtig absaugen
- Zellen 3x mit PBS + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ waschen
- Plattenboden abdecken
- Auf die behandelten Zellen wird pipettiert:
 - o 100 μL PBS + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
 - o 50 μL Assay Reagenz
- Platten werden für 10 min bei 30°C im Luminometer inkubiert und schließlich vermessen

Der Wellenlängenbereich des Emissionspektrums der Luciferase-Reaktion erstreckt sich von 490-630 nm. Die Messung der relativen Lichtausbeute (Einheit: Relative Light Units, RLU) erfolgt über den gesamten Empfindlichkeitsbereich des Luminometers (390-520 nm) über einen Zeitraum von 10s.

15.8. Geräte und instrumentelle Analytik

15.8.1 Kolonienzähler

Zur Auszählung der Bakterienkolonien im Ara- und Ames-Test wurde ein Kolonienzählgerät der Wissenschaftlich-Technischen Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland verwendet. Die Optik des Geräts wurde zunächst durch eine Kalibrationsplatte vor jeder Zählung kalibriert und die Optik justiert. Diese Kalibrationsplatte wies 1040 Punkte unterschiedlichen Durchmessers auf, die in drei Größenkategorien gleichmäßig auf der sichtbaren Fläche verteilt waren. Diese repräsentierten die möglichen Koloniegrößen.

15.8.2 Messung der β -Strahlung im Szintillationszähler

Für die Messungen der β -Strahlung im Östradiol-Verdrängungsassay wurde ein Szintillationszähler der Firma Beckmann Coulter, Instrumenttyp LS-6000 IC verwendet. Dieses wurde über das integrierte Programm gesteuert und nahm alle 30 Sekunden die Messwerte auf, die nach 5 Minuten Messzeit gemittelt den Messwert ergaben.

15.8.3 Messung der Fluoreszenz mit dem Fluorocounter (EROD+LUC)

Für die Lumineszenzmessungen der Luciferase-Assays wurde das Luminometer der Firma Labsystems (Luminoscan) verwendet. Gemessen wurde im Wellenlängenbereich 390-520 nm. Das Gerät wurde mit der Software Ascent Software, Version V 2.1. angesteuert.

15.8.4 Kapillargaschromatographie

Verwendet wurde ein Gerät der Firma Carlo-Erba mit einer 25 m Fused-Silica-Kapillare (Phase: CP Sil 5 CB). Das Gerät war mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) und einem Splitinjektor (Splitverhältnis~1:30) ausgestattet. Als Trägergas wurde Wasserstoff bei konstantem Druck verwendet. Für den FID wurde eine Temperatur von 320 °C und für den Injektor eine Temperatur von 270°C gewählt. Die Attenuation des Detektors war auf 1 (sensitiv) vorgewählt. Es wurde mit dem folgenden Temperaturprogramm gearbeitet: 50°-300°-5°/min. Injiziert wurden jeweils 0.5 μ L Lösung. Schreibereinstellungen: Attenuation 5, Papiervorschub 2.5 mm/min. Für die Analyse der Metabolite wurde ein Volumen von 1 μ L jeweils injiziert.

15.8.5 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS)

Gaschromatographie:

Gaschromatograph: HP 5980

Injektor: Split/splitless Injektor, 200 °C; "Split"-Modus (c.a. 1:10)

Trägergas: Helium 4.6, Vordruck von 3.5 bar

Temperatur-Prog.: 80°C (2min isotherm) bis 270°C mit 10°C/min

Trennsäule: CP-Sil 5 CB mit 0.25 mm I.D. und einer Länge von 25 m

Die Transferline wurde auf 230 °C gehalten

Massenspektrometer

Ionisation: EI+, 70 eV

Quellentemperatur: 200° C

Scan-Zeit: 0,7 s/Massendekade

Massenbereich: 35-300 amu

Auflösung: 10 000

Referenzsubstanz PFK

15.8.6 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Messungen der ^1H -, ^{13}C - und DEPT-Spektren sowie aller zweidimensionalen Korrelationsspektren (^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -COSY, HMQC, HMBC) erfolgte mit dem Gerät DRX 500 (^1H :500 MHz, ^{13}C :400 MHz) der Firma Bruker. Als interner Standard wurde Tetramethylsilan zugesetzt. Als Lösungsmittel wurde deuteriertes DMSO- d_6 bzw. deuteriertes Chloroform, CDCl_3 , verwendet.

15.8.7 Präparative HPLC

Die Reinigung des 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenols wurde mithilfe einer präparativen HPLC-Anlage der Firma Merck-Hitachi durchgeführt. Das Gerät war ausgestattet mit einem Autosampler (L-7200), einem Fraktionssammler (Firma Foxy J.R.), einer Pumpe (L-7150) sowie einem UV-Detektor (L-7400). Die Anlage wurde über die Software HSM HPLC System Manager Version 4.1 angesteuert. Die Wellenlänge wurde zu 254 nm vorgewählt. Die Fraktionierung wurde mit Hilfe einer HiBar (Merck) RP-18 Säule (250 mm x 25 mm, 7 μm Teilchendurchmesser) erreicht. Pro Lauf wurde ein Volumen von mindestens 400 μL auf die Säule gegeben.

Zeit [min]	% MeCN	% Wasser (+ 0.1% HOAc)	Fluss [ml/min]
5	20	80	5
15	55	45	5
20	55	45	5
30	100	0	5
40	100	0	5
55	20	80	5

Tabelle 15-9 Elutionsprogramm für die präparative HPLC

15.8.8 Schmelzpunktapparatur

Zur Bestimmung des Schmelzpunktes kristalliner Syntheseprodukte wurde ein Schmelzpunktmessgerät, bestehend aus einem Polarisationsmikroskop, Typ BH-2, der Firma Olympus, sowie aus einem Heiztisch, Typ FP82, und einem Zentralprozessor, Typ FP80, jeweils von der Firma Mettler, verwendet.

15.9. Synthesen

15.9.1 Darstellung von Dibromindolen

Für die Synthese von Dibromindolen sind in der Literatur drei mögliche Bromierungsprinzipien beschrieben^[122,123,124]. Allen gemeinsam ist, dass als Ausgangsverbindung das entsprechende Monobromindol verwendet wird, das dann entweder mit Brom in Dimethylformamid oder mit Pyridiniumbromid Perbromid in Pyridin zum Dibromindol bromiert wird. Das 3,5-Dibromindol wurde sowohl nach der Br₂/DMF- als auch nach der Pyridiniumbromid Perbromid-Variante dargestellt. Alle übrigen Dibromindole wurden ausschließlich nach der Pyridiniumbromid Perbromid Variante dargestellt. Von der Bromierung mit N-Bromsuccinimid wurde Abstand genommen, da sich diese Methode als ungeeignet herausstellte.

Darstellung von 3,5-Dibromindol nach der Br₂-/DMF-Variante^[122,123,124]

784.6 mg (4.0 mmol) 5-Bromindol wurden in 20 mL trockenem Dimethylformamid (DMF) gelöst. Zu dieser Lösung wurde eine Lösung von 0.2 mL (3.9 mmol) Brom in 20 mL DMF bei Raumtemperatur getropft. Der Ansatz wurde anschließend in 200 mL einer Lösung von 1.08 g Natriummetabisulfit (Na₂S₂O₅) und 1 ml 25% Ammoniak in Eiswasser gegeben. Der orange Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und aus Hexan umkristallisiert. Ausbeute: 359.6 mg (1.3mmol) 3,5-Dibromindol= 44%, eines orange-bräunliches Feststoffs mit dem Schmelz- (und Zersetzungs-) punkt von 68.9°C

GC-Analyse: vgl. Tabelle 15-10

MS (EI,70 eV): m/z 277 (M+4, 45), 275 (M+2, 100), 273 (M, 49), 196 (M-Br+2, 45), 194 (M-Br, 45), 169 (<1), 167 (<1), 138.5 (M+4²⁺, 5), 137.5 (M+2²⁺), 136.5 (M²⁺), 116 (1), 115 (46), 114 (10), 88 (11), 86 (9), 84 (2)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆+TMS) δ/[ppm]=11.00(1H,s,NH),7.62 (1 H,d,J_{2,6}=1.58Hz,C(2)-H),7.54 (1 H,d,J_{4,6}=1.89Hz,C(4)-H),7.42 (1 H,d,J_{7,6}=8.51Hz,C(7)-H),7.30 (1 H,dd,J_{6,7}=8.51Hz J_{6,4}=1.89Hz,J_{6,2}=1.57Hz,C(6)-H)

Darstellung von 3,5-Dibromindol nach der Pyridiniumbromid Perbromid –Variante^[122,123,124]

134.2 mg (0.68 mmol) 5-Bromindol wurden in 8 mL getrocknetem und vorgekühlten Pyridin gelöst. 217.7 mg (0.68.mmol) Pyridiniumbromid Perbromid wurden in 6 mL trockenem, vorgekühltem Pyridin gelöst und zum Reaktionsansatz, der mit Eis gekühlt wurde, unter Rühren langsam hinzugegossen. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz in 40 mL eisgekühlten Diethylether gegossen und anschließend vom Niederschlag abfiltriert. Dieser wurde nochmals mit Diethylether gewaschen. Das Filtrat wurde zunächst mit 40 mL eisgekühlter 1M Salzsäure und dann zweimal mit eisgekühlter 1M Natronlauge gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und eingeengt. Der Niederschlag wurde erneut in Diethylether aufgenommen und mit 100 mL eisgekühlter 6 N Salzsäure (ca. 3 x 30 mL), 100 mL eisgekühlter 5% NaHCO₃-Lösung und mit 100 mL eisgekühlter 5% NaCl-Lösung gewaschen.

Ausbeute: 83.2 mg (0.30 mmol) 3.5-Dibromindol = 44.50% eines orange-bräunliches Feststoffs

GC-Analyse: vgl. Tabelle 15-10

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆+TMS) δ/[ppm] =11.68(1H, s, NH), 7.63(1H, d, J_{2,6}=1.58 Hz, C(2)-H), 7.54(1H, d, J_{4,6}=1.89Hz, C(4)-H), 7.42 (1H, d, J_{7,6}=8.51Hz, C(7)-H), 7.30(1H, dd, J_{6,7}=8.51Hz, J_{6,4}=1.89 Hz, J_{6,2}=1.58Hz, C(6)-H)

¹³C (400 MHz, DMSO-d₆+TMS) δ/[ppm] =126.97 (C-4), 125.37 (C-6), 120.68 (C-2), 114.76 (C-7)

Darstellung von 3,6-Dibromindol nach der Pyridiniumbromid Perbromid –Variante

Entsprechend der oben angeführten Vorschrift wurden 412.3 mg (2.10.mmol) 6-Bromindol in 16 mL Pyridin gelöst und zu dieser Lösung eine Lösung von 652.0 mg (2.04.mmol) Pyridiniumbromid Perbromid in Pyridin zugetropft. Die Aufarbeitung des Ansatzes erfolgte wie oben beschrieben, wobei die organische Phase zunächst mit 100 mL 6M Salzsäure, dann mit 100 mL 1 N Natronlauge, 5% NaHCO₃ und abschließend mit 5% NaCl gewaschen wurde. ^[122,123,124]

Ausbeute: 536 mg (1.95 mmol) 3,6-Dibromindol = 92.67% eines ockerfarbenen Feststoffs mit dem Schmelz- (und Zersetzungs-) punkt von 70.1°C.

GC-Analyse: vgl. Tabelle 15-10

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆+TMS) δ/[ppm] =11.60 (1H,s, NH), 7.63 (1 H, d, J_{2,4}=1.57 Hz, C(2)-H), 7.58 (1H,s,C(7)-H), 7.37 (1H,d,J=8.51 Hz, C(5)-H), 7.25 (1 H,dd,J_{4,5}=8.51Hz, J_{4,2}=1.58 Hz, C(4)-H)

¹³C (400 MHz, DMSO-d₆+TMS) δ/[ppm] = 125.86 (C-7), 122.75 (C-4), 119.68 (C-5), 114.88 (C-2)

Darstellung von 3,7-Dibromindol nach der Pyridiniumbromid Perbromid –Variante

Zu 400 mg (2.04 mmol) 7-Bromindol in 15 mL eisgekühltem, trockenem Pyridin wurde eine Lösung von 653.7 mg (2.04 mmol) Pyridiniumbromid-Perbromid in 15 mL Pyridin langsam zugetropft. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz wie oben beschrieben aufgearbeitet:

Jeweils 3 x 50 mL 6 N Salzsäure, 5% NaOH, 5% NaHCO₃, 5% NaCl-Lösung zum Waschen der etherischen Phase. Diese wurde dann über MgSO₄ getrocknet.

Ausbeute (nach Umkristallisieren aus Hexan):

384.1 mg (1.40 mmol) 3,7-Dibromindol = 68.5 %; schwach violett-rosa schimmernde kristalline Plättchen, die einen Schmelz- (und Zersetzungs-) punkt von 73.4°C haben.

Eine Reinigung mittels Säulenchromatographie unter Verwendung des Laufmittelgemisches Hexan:Ethylacetat = 4:1 (v/v) führte zu keiner Verbesserung der Reinheit des Produktes, so dass die toxikologischen Untersuchungen mit einem Produkt der Reinheit 70-80% erfolgten.

GC-Analyse: Tabelle 15-10

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆+TMS): δ = 11.74 (1H, s, NH), 7.43 (2H, dd, J_{6,5}=7.57 Hz, J_{4,5}=7,56 Hz, C(6)-H, C(4)-H), 7.08 (1H, dd, J_{5,6} =7,88, J_{4,5}=7.56, C(5)-H)

¹³C (400 MHz, DMSO-d₆+TMS) 126.1 (C-3), 124.8 (C-4), 121.2 (C-5), 117.5 (C-5)

Darstellung von 3,4-Dibromindol nach der Pyridiniumbromid Perbromid –Variante

Zu 250 µL (1.91 mmol) 4-Bromindol in 15 mL eisgekühltem, trockenem Pyridin wurde eine Lösung von 613.0 mg (1.92 mmol) Pyridiniumbromid Perbromid in 15 mL Pyridin langsam zugetropft. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz wie oben beschrieben aufgearbeitet:

Jeweils 3 x 50 mL 6 N Salzsäure, 5% NaOH, 5% NaHCO₃, 5% NaCl-Lösung zum Waschen der etherischen Phase. Diese wurde dann über MgSO₄ getrocknet.

Ausbeute: 69.9 mg (0.25 mmol) 3,4-Dibromindol = 13.3 % , dunkel oranges Pulver mit dem Schmelz- (und Zersetzungs-) punkt von 89.7°C

GC-Analyse: vgl. Tabelle 15-10

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆+TMS) δ/[ppm]= 11.81 (1H,s,NH), 7.64 (1H, d, J_{2,N-H}= 1.89 Hz, C(2)-H), 7.47(1H,d,J_{5,6}=8.2 Hz, C(5)-H), 7.26(1H,d,J_{7,6}=7.56-8.2Hz, C(7)-H),7.05 (1H,t,J_{6,5}=8.2 Hz, J_{6,7}=8.2 Hz, C(6)-H)
¹³C (400 MHz, DMSO-d₆+TMS) δ/[ppm]= 127.47 (C-2),124.25 (C-7), 123,06 (C-6), 112,09 (C-5)

Edukt	rt (Edukt) [min] / Peakfläche [%].	RI	Produkt	rt (Produkt) [min] / Peakfläche [%].	RI
4-Bromindol	27.11/98.16	1583	3,4-DBI	35.51/84.45-89.51	1977
5-Bromindol	26.57/97.98	1590	3,5-DBI	34.46/99.22	1933
6-Bromindol	26.25/97.53	1575	3,6-DBI	34.04/98.69	1913
7-Bromindol	22.18/96.64	1421	3,7-DBI	30.04/74.06 ¹ – 80.52 ²	1728

¹: Nach Reinigung des Produktes über Kieselgel Fraktion 1

²: Nach Reinigung des Produktes über Kieselgel Fraktion 2

Tabelle 15-10: Retentionszeiten und Reinheit der Monobromindole und Dibromindole

15.9.2 Friedel-Crafts-Synthese von 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol

Die Synthese erfolgt gemäß einer japanischen Patentschrift^[108] durch Erhitzen von Styrol mit Phenol (2:1 m/m) in der Gegenwart von 85%-iger Phosphorsäure und „terra alba“^a. Aufgrund der Informationen zu den Reaktionsbedingungen (z.B. Mengen der einzusetzenden Katalysatoren) sowie zur Aufarbeitung, wurde die Synthese gemäß den Bedingungen einer Friedel-Crafts-Reaktion durchgeführt.

Vorschrift:

9.41 g (0.1 mol) Phenol wurden mit 2.9 ml (5g) Phosphorsäure (85 %) überschichtet und bis zum Erreichen von 60°C im Reaktionsmedium durch Erhitzen gerührt. Es wurden dann 23 mL (20.8 g = 0.2 mol) Styrol erst langsam hinzugegossen bis die Temperatur 100°C erreichte, dann zügig. Der Ansatz wurde ca. 30 min bei 110°-130°C erhitzt und weitere 60 min bei 150°-155°C. Im Verlauf der Reaktion bildete sich ein weißer Niederschlag, der sich aber mit der Zeit wieder auflöste. Nach einer Stunde wurde der Ansatz abkühlen gelassen und auf kaltes Wasser (4°C) gegossen, wobei sich eine milchig-trübe Emulsion bildete. Nach Auftrennung in zwei Phasen, wurden diese getrennt. Das Reaktionsprodukt schied sich langsam als farbloses Öl ab. Die GC/MS- Analyse des Öls zeigte, dass ein Produktgemisch vorlag.

^a „terra alba“ : terra = lat. Erde, alba = lat. weiß; weiße Tonerde (Kaolin, Alumosilikat)

Experimenteller Teil

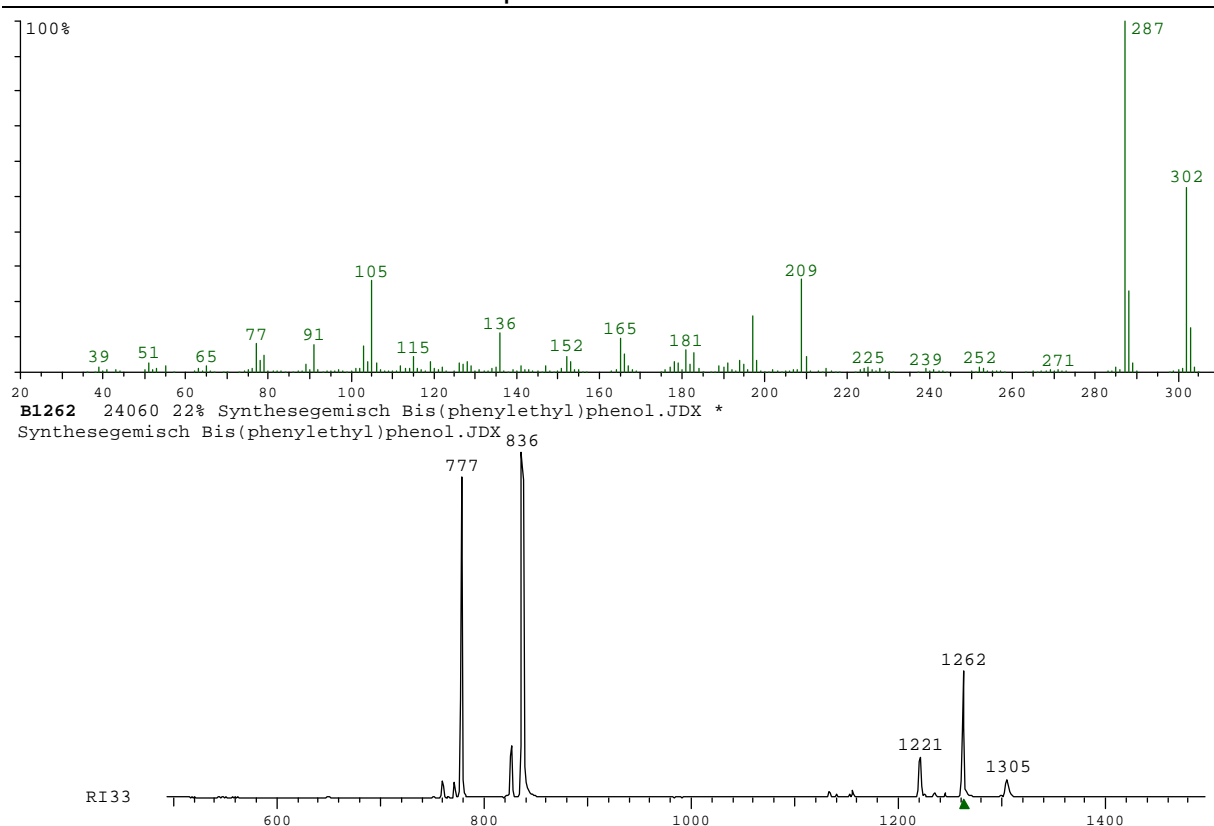


Abbildung 15-1: TIC des Produktgemisches der *Friedel-Crafts*-Synthese von 2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol

Reinigung des Syntheseprodukts.

Die Reinigung des Produktgemisches, das als verdünnte Lösung in DMSO eingesetzt wurde, erfolgte mittels präparativer HPLC (Abbildung 15-2). Beim Lösungsvorgang in DMSO fiel ein weißer Feststoff aus, der zuvor abfiltriert wurde. Erhalten wurden die fünf Fraktionen (Abbildung 15-2) F1, F2, F3, F4 und F5. Die GC/MS Analyse zeigte, dass sich das relevante Phenol in der Fraktion F4 befand, worauf diese mittels Dünnschichtchromatographie weiter fraktioniert wurde und vier Fraktionen lieferte. Hierfür wurde Kieselgel 60 als stationäre und Toluol als mobile Phase verwendet. Die GC-Analyse (Vgl. Abbildung 15-3) zeigte, dass Fraktion F 4.2. ausreichende Reinheit besaß.

Experimenteller Teil

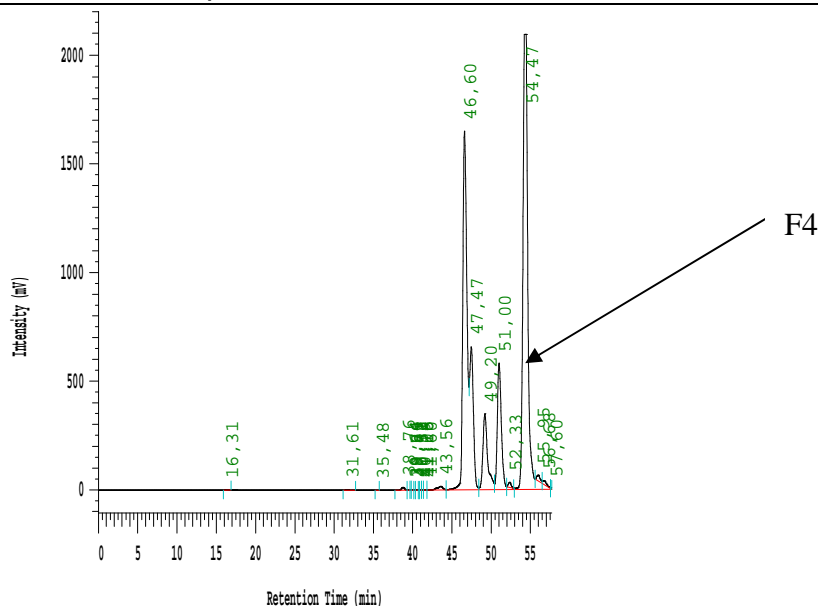


Abbildung 15-2 Chromatogramm der präparativen Trennung an RP-18 Phase (Elutionsprogramm gem. Tabelle 15-9)

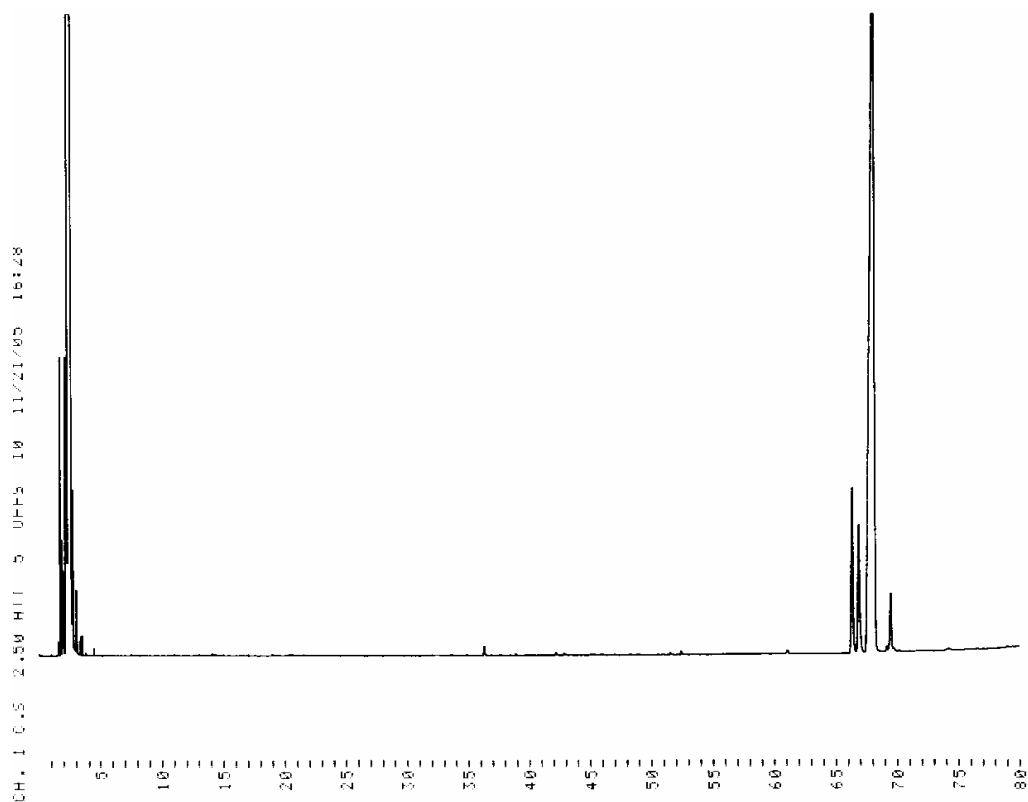


Abbildung 15-3 GC-FID des Syntheseproduktes nach Reinigung des Produktgemisches mittels präparativer HPLC und TLC

15.9.3 Metabolisierungsreaktionen mit dem S9-Mix

Durchführung.

Entsprechend der Tabelle 15-12 wurden die Dibromindole in 500 μ L DMSO gelöst und mit 3.75 mL frischem Rattenleberhomogenat (kurz: S9-Mix), das parallel im Mutagenesetest mit 2-Aminoanthracen auf die Funktionstüchtigkeit getestet wurde, bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach 45 min Inkubationszeit wurden die Ansätze in der Kühlzentrifuge bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand vom Sediment abgessogen.

Der Überstand wurde dann durch einen Sterilfilter (Maschenweite 0.2 μ) filtriert und das Filtrat (2x) mit 5 mL Ethylacetat extrahiert. Als Referenz wurde eine Probe, bestehend nur aus DMSO, unter gleichen Bedingungen hergestellt. Die Extraktion erfolgte für 10 min im Schüttelinkubator bei 40°C. 1.5 mL des Extraktes wurde im N₂-Strom zur Trockne eingeeengt und mit 100 μ L Ethylacetat aufgenommen. Zur gaschromatographischen Analyse wurde 1 μ L dieser Lösung am GC-FID eingespritzt.

Diese Methode wurde an 2-Aminoanthracen-Inkubaten in der Vergangenheit schon getestet und zeigte in einem HPLC-Chromatogramm neben dem Edukt eine weitere, neue Komponente. Darüber hinaus wurden die Extrakte mit Diazomethan umgesetzt, um hydroxylierte Verbindungen gaschromatographisch erfassen zu können.

Der Vorteil des Diazomethans als Derivatisierungsreagenz ist, dass keinerlei Nebenprodukte entstehen. Vor der Verwendung ist jedoch dessen „Aktivität“ zu ermitteln.

Isomer	Einwaage [mg]
3,4	9.73
3,5	10.70
3,6	10.34
3,7	9.90

Tabelle 15-11: Eingesetzte Mengen Dibromindole für Metabolisierung

Synthese von 3-Bromindol

Um die oben angeführte Hypothese zu widerlegen, hat ein Vergleich der Retentionszeiten mit dem 3-Bromindol zu erfolgen. Dies erreicht man durch Standardaddition (Co-Injektion), dessen Synthese im Folgenden hier angegeben wird. Die Synthese des 3-Bromindols wurde ebenfalls mit Hilfe der Pyridiniumbromid Perbromid-Variante durchgeführt.

199,8 mg (0.625 mmol) Pyridiniumbromid Perbromid wurden in 10 mL frisch destilliertem Pyridin gelöst und zu einer Lösung von 72,6 mg (61,7 μ mol) Indol in Pyridin getropft. Der Reaktionsansatz wurde bei 0°C im Eisbad aufbewahrt und nach Beendigung der Zugabe des Bromids noch gut 10 min rühren gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde in 80 mL eisgekühltem Diethylether gegossen und der Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde jeweils 3x mit 30 mL der folgenden Lösungen gewaschen:

- eisgekühlter, 6 N Salzsäure
- 5% Natronlauge
- 5% Natriumhydrogencarbonatlösung
- 5% Kochsalzlösung

Die etherische Phase wurde über Nacht über MgSO₄ getrocknet und abschließend zum Auskristallisieren abdekantiert. Ausbeute: 87,3 mg (0,44 mmol) 3-Bromindol = 72 %, gelbliches Pulver

GC Analyse.

Edukt	R _f (Edukt) [min] / Peakfläche [%].	Produkt	R _f (Produkt) [min] / Peakfläche [%].
Indol	18.56 / 98.81	3-Bromindol	27.40 / 58.84

MS (EI,70 eV): m/z 196 (M-Br⁺², 45), 194 (M-Br, 45), 169 (<1), 167 (<1), 138.5 (M+4²⁺,5), 137.5 (M+2²⁺), 136.5 (M²⁺), 116 (1), 115 (46), 114 (10), 88 (11), 86 (9), 84 (2)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆+TMS) δ /[ppm]= 11.46 (1H, NH, s), 7.53 (1H, d, J_{2,N-H}= 2,29 Hz, C(2)-H), 7.18 (2H, t, J= 8.14 Hz, J= 10.18 Hz, C(3)-H, C(6)-H), 7.18 (1H, t, J= 7.63 Hz, J= 7.51 Hz, C(4)-H), 7.12 (1H, t, J= 7.51 Hz, J= 7.12 Hz, C(5)-H)

¹³C (400 MHz, DMSO-d₆+TMS) δ /[ppm]= 135.24 (C_{7a}), 124.6 (C₂), 122.15 (C₅), 119.80 (C₆), 117,79 (C₄), 111,98 (C₇)

16. Anhänge

16.1. RI der Standards

Verbindung	Retentionszeit [s]	Retentionsindex
Kohlenwasserstoffe		
Nonan	185	900
Decan	270	1000
Undecan	364	1100
Dodecan	458	1200
Tridecan	549	1300
Tetradecan	635	1400
Pentadecan	716	1500
Heptadecan	793	1600
Octadecan	865	1700
Nonadecan	934	1800
Eicosan	1001	1900
Heneicosan	1063	2100
Docosan	1123	2200
Tricosan	1181	2300
Tetracosan	1236	2400
Pentacosan	1291	2500
Hexacosan	1352	2600
Heptacosan	1424	2700
Alkohole		
1-Heptanol	223	949
1-Octanol	323	1060
1-Nonanol	422	1164
1-Decanol	511	1260
Phytol	1128	2109
Triethylenglykol	471	1215
Aldehyde		
Hexanal		
Nonanal	348	1085
Ketone		
Acetophenon	312	1048
α -Tetralon	589	1348
Chalcon	1950	1354

Carbonsäuren		
Verbindung	Retentionszeit [s]	Retentionsindex
Hexansäure	288	1017
Decansäure	610	1367
Undecansäure	679	1456
Dodecansäure	762	1561
Tridecansäure	824	1644
Tetradecansäure	902	1755
Pentadecansäure	966	1849
Heptadecansäure	1090	2046
Stearinsäure	1150	2147
4-Methylbenzoesäure	511	1260
4-Benzoylbuttersäure	854	1685
Langkettige Alkylbenzole		
5-Phenyldecan	738	1530
4-Phenyldecan	745	1539
3-Phenyldecan	760	1558
2-Phenyldecan	788	1594
6-Phenylundecan	810	1624
5-Phenylundecan	813	1629
4-Phenylundecan	822	1641
3-Phenylundecan	837	1662
2-Phenylundecan	864	1699
6-Phenyldodecan	882	1725
5-Phenyldodecan	886	1731
4-Phenyldodecan	894	1743
3-Phenyldodecan	910	1766
2-Phenyldodecan	937	1805
6-Phenyltridecan	949	1823
5-Phenyltridecan	954	1831
4-Phenyltridecan	962	1843
3-Phenyltridecan	978	1866
2-Phenyltridecan	1003	1903
Alkylphenole		
Phenol	225	952
2-tert.-Butylphenol		1255
4-tert.-Butylphenol	520	1270
2-tert.-Butyl-4-methylphenol	575	1332
(1,1-Dimethylethyl)- 4-methoxy-phenol (BHA)	689	1468
2,6-Di-tert.-Butyl-4-methylphenol (BHT)	720	1505
4-(1,1,3,3-Tetramethyl)- butylphenol	780	1584

PAK , Hetero-PAK und Alkyl-PAK		
Verbindung	Retentionszeit [s]	Retentionsindex
Naphthen	426	1168
Acenaphthylen	656	1427
Acenaphthen	686	1464
Fluoren	766	1566
Phenanthren	908	1763
Anthracen	915	1773
Fluoranthren	1092	2049
Pyren	1120	2095
Benzo(a)anthracen / Chrysen	1325	2456
2-Methylnaphthalin	575	1332
1-Methylnaphthalin	555	1307
Reten		2177 ^a
Chlorbenzole		
1,4-Dichlorbenzol	267	997
1,2-Dichlorbenzol	289	1023
1,3,5-Trichlorbenzol	384	1123
1,2,4-Trichlorbenzol	427	1169
1,2,3-Trichlorbenzol	456	1198
Chlorphenole		
2,5-Dichlorphenol	406	1148
4-Chlorphenol	427	1169
2,6-Dichlorphenol	435	1178
2,4,5-Trichlorphenol	579	1337
2,3,4-Trichlorphenol	585	1344
3,4-Dichlorphenol	622	1386 ^[153]
Phthalate		
Diheptylphthalat	1351	2498
Diethylphthalat	1368	2523
Diverse		
N-Methylimidazol		927
N,N-Diethylacetamid	237	966
Benzothiazol	450	1192
Barbitursäure	882	1725
Dibenzo[d,b]thiophen	886	1731

^a Aus GC/MS-Messungen bis 300 amu

16.2. Sicherheitshinweise

Die folgende Liste umfasst sämtliche Verbindungen und Lösungsmittel, mit denen während dieser Arbeit umgegangen wurde. Die Gefahrstoffe sind, soweit vorhanden, mit den jeweiligen Gefahrensymbolen, R- und S-Sätzen versehen worden und deren Qualität angegeben. Die Stoffe, für die keine bekannte Einstufung existiert, sind als gefährlich einzustufen. Es ist unbedingt zu vermeiden, dass man sich mit diesen Stoffen in irgendeiner Weise kontaminiert und diese Stoffe in die Umwelt eingebracht werden. Diese Verbindungen sind in der Liste mit leeren Feldern für die Gefahrensymbole, R- und S-Sätze gekennzeichnet.

Substanzname	Hersteller	Gefahren symbol	R-Sätze	S-Sätze
Lösungsmittel				
Hexan (SupraSolv)	Merck	F, Xn, N	11-38-48/20-51/53-62-65-67	9-16-29-33-36/37-61-62
Aceton (Uvasol)	Merck	F, Xi	11-36-66-67	9-16-26
Ethylacetat (LiChrosolv)	Merck	F, Xi	11-36-66-67	16-26-33
Methanol (LiChrosolv)	Merck	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
Ethanol (absolut zur Analyse ACS,ISO,Reag. Ph Eur)	Merck	F	11	7-16
Cyclohexan (Uvasol)	Merck	F, Xn,N	11-38-50/53-65-67	9-16-25-33-60-61-62
Acetonitril (LiChrosolv, Ph Eur)	Merck	F, Xn	11-20/21/22-36	16-36/37
Dimethylsulfoxid (DMSO), (Uvasol)	Merck			
Dichlormethan (für die Gaschromatographie SupraSolv)	Merck	Xn	40	23-24/25-36/37
Diethylether	Merck	F+,Xn	12-19-22-66-67	(2)-9-16-29-33
Dimethylformamid, DMF (zur Synthese)	Merck	T	61-20/21-36	53-45
Toluol (Uvasol)	Merck	F, Xn	11-38-48/20-63-65-67	36/37-46-62
Chemikalien zur Synthese				
Pyridinium-tribromid	Aldrich	C	34	26-36/37/39-45
4-Bromindol	Aldrich	Xn	36/37/38	26-36
5-Bromindol	Aldrich	Xn	36/37/38	26-36
6-Bromindol	Aldrich	Xn	36/37/38	26-36
7-Bromindol	Aldrich	-	-	-
3,x-Dibromindol (x=4,5,6,7)			noch einzustufender Stoff	noch einzustufender Stoff
Calciumhydrid (zur Synthese)	Merck	F	15	7/8-24/25-43.6
Phenol (zur Synthese)	Merck	T, C	23/24/25-34-48/20/21/22-68	24/25-26-28.6-36/37/39-45
Styrol (zur Synthese)	Merck	Xn	10-20-36/38	23.2
Phosphorsäure, 30% , p.A.	Merck	C	22-35	26-36/37/39-45
4-(1,1,3,3-Tetramethyl)butylphenol (p-tert.-Octylphenol)	Merck	Xn	21-38-41	26-36

Substanzname	Hersteller	Gefahren symbol	R-Sätze	S-Sätze
Biochemikalien				
Ampicillin	Sigma-Aldrich	Xn	36/37/38-42/43	22-26-36/37
Kanamycin	Sigma	T	61	53-45
Tetracyclin	Fluka	Xn	22	22-36
Penicillin, Kalium-Salz	Fluka	Xn	42/43	36/37
Streptomycin, Sulfat-Salz	Fluka	Xn	22	
Chloramphenicol	Fluka	T	45	53-45
2-Nitrofluoren	Aldrich	Xn	40	22-36/37/39-45
2-Aminoanthracen	Acros	Xn	33	22-24-25-45
<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -Nitro- <i>N</i> -Nitrosoguanidin (MNNG)	Aldrich	T, N	45-20-36/38-51/53	53-45-61
Natriumazid, reinst	Merck	T+,N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
Zitronensäure- Monohydrat	Merck	Xi	36	26
d-Glukose	Merck			
d-Biotin (BioChemica)	Sigma-Aldrich			
Glycerol (99%)	Merck			
L-Arabinose (für biochemische Zwecke)	Merck			
L-Arginin (Ph Eur, USP)	Merck	Xi	36	26
L-Methionin (für biochemische Zwecke)	Merck			
Nictionamid Dinucleotid (NAD) (BioChemica)	Sigma-Aldrich	Xi	36/37/38	26-36
Nictionamid Dinucleotid Phosphat (NADP) (BioChemica)	Sigma-Aldrich	Xi	36/37/38	26-36
Adenin (BioChemica,>99% HPLC)	Sigma-Aldrich	Xn	22	26-36
Thiamin (als Hydrochlorid)	Fluka			22-24/25
Histidin-HCl (Ph Eur, USP)	Merck			
Glukose-6-Phosphat (α -D-Glucose-6-phosphat, Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, Calbiochem	Xn	20/21/22-68/20/21/22	36/37
Natriumchlorid (zur Analyse ACS,ISO,Reag. Ph Eur)	Merck			
Kaliumchlorid	Merck			
Magnesiumchlorid, Hexahydrat (Ph EUR, USP)	Merck	Xi	36/37	
Ethoxy-Resorufin (BioChemica)	Sigma-Aldrich			
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (zur Analyse ACS,Reag. Ph Eur)	Merck			
Caliumchlorid, Dihydrat (zur Analyse ACS,Reag. Ph Eur)	Merck	Xi	36	22-24
Natriumhydrogencarbonat (zur Analyse ACS,Reag. Ph Eur)	Merck			

Anhang

Substanzname	Hersteller	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Dinatriumhydrogenphosphat, dodekahydrat (Ph EUR, USP)	Merck			
Dikaliumhydrogenphosphat (wasserfrei, Ph EUR, USP)	Merck			
Kaliumdihydrogenphosphat (zur Analyse (<= 0,005% Na) ACS,ISO,Reag. Ph Eur)	Merck			
Methylcholanthren, Dicumarol	Aldrich Sigma-Aldrich	T T, N	45 22-48/25-51/53	53-36/37/39-45 37-45-61
β -Glucuronidase, 20,000 units/mg protein, recombinant, expressed in Escherichia coli overproducing strain, lyophilized powder	Sigma			
Hydroxycumarin (Umbelliferon, 99%)	Sigma-Aldrich	Xi	36/37/38	26-36
Coomassi-Brillant-Blue (>90%,TLC) (Lösung)	Biorad	T	10-20/21/22-34-39/23/24/25	7-26-45
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, TRIS) zur Analyse Puffersubstanz ACS,Reag. Ph Eur	Merck	Xi	36/38	26
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), reinst Ph Eur,NF	Merck	Xi	36-52/53	61
Dithiothreitol (DTT), für biochemische Zwecke	Merck	Xn	22-36/38	
Hydroxylapatit, Typ I, gepufferte Suspension	Sigma-Aldrich			
^3H -Östradiol[6,7-3H]oestradiol-17 β (sp. radioactivity 40 Ci/mmol) were obtained from New England Nuclear (Boston, MA, U.S.A.)		F, Xi, R	36/37/38	16-26-36
Diethylstilbesterol (DES), BioChemica, >99% HPLC	Sigma-Aldrich	T,N	45-61-36/37/38-51/53	53-36/37/39-45-60-61
Glutamin (DAB, USP)	Merck			
Natriumpyruvat, >99, für biochemische Zwecke	Roth, JTBaker			
Fötales Kälberserum (FCS), Bovine hormone groth factor	Biochrom AG, Sigma-Aldrich			
Trypsinlösung, (aus Schweine- pankreas) krist. lyophilisiert 40 U/mg für biochemische Zwecke EC 3.4.21.4	Merck	Xn	36/37/38-42	22-24-26-36/37
Standards				
Nonan, Bezugssubstanz für die Gas-Chromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
Decan, Bezugssubstanz für die Gas-Chromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62

Anhang

Substanzname	Hersteller	Gefahren symbol	R-Sätze	S-Sätze
	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
Undecan, Bezugssubstanz für die Gas-Chromatographie				
Dodecan, Bezugssubstanz für die Gas-Chromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
Tridecan, Bezugssubstanz für die Gas-Chromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
Tetradecan, Bezugssubstanz für die Gas-Chromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
Pentadecan, Bezugssubstanz für die Gaschromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
Heptadecan, Bezugssubstanz für die Gaschromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
Octadecan, Bezugssubstanz für die Gaschromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
Nonadecan, Bezugssubstanz für die Gaschromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
Eicosan, Bezugssubstanz für die Gaschromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
Heneicosan, Bezugssubstanz für die Gaschromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
Docosan, Bezugssubstanz für die Gaschromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
Tricosan, Bezugssubstanz für die Gaschromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
Tetracosan, Bezugssubstanz für die Gaschromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
Pentacosan, Bezugssubstanz für die Gaschromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
Hexacosan, Bezugssubstanz für die Gaschromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
Heptacosan, Bezugssubstanz für die Gaschromatographie	Merck	Xn	10-65	23.2-24-62
1-Heptanol,	Merck	Xn	21/22-36	36/37
1-Octanol, reinst	Merck	Xi	36	26
1-Nonanol	Aldrich	Xi, N	20-51/53	23-24/25-61
1-Decanol, reinst	Merck	Xi, N	36/38-51/53	26-61
Phytol (Gemisch der cis-/trans-Isomere)	Merck	Xi	36/37/38	26-37/39
Triethylenglykol	Merck			24/25
Hexanal	Merck	Xi	10-36/38	23
Nonanal	Merck	Xi	38	
Acetophenon	Merck	Xn	22-36	2-26
α-Tetralon	Aldrich	Xn	22	23-24/25
1,3-Diphenyl-1-propen-3-on	Merck	Xn	22-36/37	22-36/37/39-45
Benzylidenacetophenon, Chalcon				
Hexansäure, Capronsäure	Merck	C	34	26-36/37/39-45
Decansäure, Caprinbsäure	Merck	Xi	36/38	

Anhang

Substanzname	Hersteller	Gefahren symbol	R-Sätze	S-Sätze
Undecansäure	Merck	Xi	36-37-38	26-37
Dodecansäure	Acros	Xn	36/38	26-37/39
Tridecansäure	Acros	Xn	36/38	26-37/39
Tetradecansäure	Acros	Xn	36/38	26-37/39
Pentadecansäure	Acros	Xn	36/38	26-37/39
Heptadecansäure	Acros	Xn	36/38	26-37/39
Stearinsäure	Acros	F, Xn	11-36/37/38	16-26-37/39
4-Methylbenzoesäure	Aldrich	Xn	22-36	
4-Benzoylbuttersäure	Acros	Xi	36-37-38	26-37-39
2,4-Bis(1-phenylethyl)phenol, 99%	High Purity Compounds (HPC)		Nicht vollständig geprüfter Stoff	Nicht vollständig geprüfter Stoff
Diisooctylphthalat	Merck	T	60-61	53-45
Di-n-octylphthalat, analytical standard	OEKANAL®, Sigma-Aldrich			23-24/25
2-tert.-Butylphenol	Acros	T,N	22-23-34-51/53	26-36/37/39-45-61
4-tert.-Butylphenol	Acros	C,N	34-51/53	26-36/37/39-45-61
2-tert.-Butyl-4-Methylphenol	Acros	C,N	34-51/53	26-29-36/37/39-45-61
(1,1-Dimethylethyl)-4-Methoxy-phenol (BHA)	Acros	Xn,N	22-36/37/38-40-51/53	26-29-36/37/39-61
2,6-Di-tert.-Butyl-4-Methylphenol (BHT)	Merck		53	61
EPA-PAK-Gemisch, 2mg/ml in DCM:Benzol (1:1)	Suppelco	T, F	45-40	53-23-24/25-36/37/39-45
2-Methylnaphthalin	Merck	Xn, N	22-51/53	61
1-Methylnaphthalin	Merck	Xn, N	22-51/53	24-61
Reten	Merck		Nicht vollständig geprüfter Stoff	Nicht vollständig geprüfter Stoff
1,4-Dichlorbenzol	Merck	Xn, N	36-40-50/53	36/37-46-60-61
1,3-Dichlorbenzol	Merck	Xn, N	22-51/53	61
1,2-Dichlorbenzol	Merck	Xn, N	22-36/37/38-50/53	23.2-60-61
1,3,5-Trichlorbenzol	Acros	Xn	22-38	37
1,2,4-Trichlorbenzol	Merck	Xn, N	22-36/38-50/53	61
1,2,3-Trichlorbenzol	Merck	Xn, N	22-50/53	24/25-61
4-Chlorphenol	Merck	Xn, N	20/21/22-51/53	28.1-61
2,5-Dichlorphenol	Merck	Xn, N	22-36/38-51/53	26-61
2,4-Dichlorphenol	Merck	T, N	22-24-34-51/53	26-36/37/39-45-61
2,6-Dichlorphenol	Merck	Xi	36/38	26
2,4,5-Trichlorphenol, Pestanal, Analytical standard	Aldrich	Xn, N	22-36/38-50/53	26-28-60-61
2,3,4-Trichlorphenol, Pestanal, Analytical Standard	Aldrich	Xn, N	22-37/38-41	26-39
3,4-Dichlorphenol	Merck	Xi, N	36/38-51/53	26-61
N-Methylimidazol	Acros	C	21-22-34	26-36-45

Anhang

Substanzname	Hersteller	Gefahren symbol	R-Sätze	S-Sätze
N,N-Diethylacetamid	Aldrich	Xn	20/21/22-36/37/38	26-27-36/37/39-45
Benzothiazol	Merck	Xn	20/21/22-36	36/37
Barbitursäure, zur Analyse	Merck			
Dibenzo[d,b]thiophen	Merck	N	50/53	61

R - Sätze

- R 1 Im trockenen Zustand explosionsgefährlich
- R 2 Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen explosionsgefährlich
- R 3 Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen besonders explosionsgefährlich
- R 4 Bildet hochempfindliche explosionsgefährliche Metallverbindungen
- R 5 Beim Erwärmen explosionsfähig
- R 6 Mit und ohne Luft explosionsfähig
- R 7 Kann Brand verursachen
- R 8 Feueregefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen
- R 9 Explosionsgefahr bei Mischung mit brennbaren Stoffen
- R 10 Entzündlich
- R 11 Leichtentzündlich
- R 12 Hochentzündlich
- R 14 Reagiert heftig mit Wasser
- R 15 Reagiert mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase
- R 16 explosionsgefährlich in Mischung mit brandfördernden Stoffen
- R 17 Selbstentzündlich an der Luft
- R 18 Bei Gebrauch Bildung explosionsfähiger / leichtentzündlicher Dampf-Luftgemische möglich
- R 19 Kann explosionsgefährliche Peroxide bilden
- R 20 Gesundheitsschädlich beim Einatmen
- R 21 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut
- R 22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
- R 23 Giftig beim Einatmen
- R 24 Giftig bei Berührung mit der Haut
- R 25 Giftig beim Verschlucken
- R 26 Sehr giftig beim Einatmen
- R 27 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut
- R 28 Sehr giftig beim Verschlucken
- R 29 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase
- R 30 Kann bei Gebrauch leicht entzündlich werden
- R 31 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase
- R 32 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase
- R 33 Gefahr kumulativer Wirkungen
- R 34 Verursacht Verätzungen
- R 35 Verursacht schwere Verätzungen
- R 36 Reizt die Augen
- R 37 Reizt die Atmungsorgane
- R 38 Reizt die Haut
- R 39 Ernste Gefahr irreversiblen Schadens
- R 40 Irreversibler Schaden möglich
- R 41 Gefahr ernster Augenschäden
- R 42 Sensibilisierung durch Einatmen möglich
- R 43 Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
- R 44 Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss

- R 45 Kann Krebs erzeugen
- R 46 Kann vererbare Schäden verursachen
- R 48 Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei länger Exposition
- R 49 Kann Krebs erzeugen beim Einatmen
- R 50 Sehr giftig für Wasserorganismen
- R 51 Giftig für Wasserorganismen
- R 52 Schädlich für Wasserorganismen
- R 53 Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
- R 54 Giftig für Pflanzen
- R 55 Giftig für Tiere
- R 56 Giftig für Bodenorganismen
- R 57 Giftig für Bienen
- R 58 Kann längerfristig schädliche Wirkungen auf die Umwelt haben
- R 59 Gefährlich für die Ozonschicht
- R 60 Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
- R 61 Kann das Kind im Mutterleib schädigen
- R 62 Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
- R 63 Kann das Kind im Mutterleib möglicherweise schädigen
- R 64 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen
- R 65 Gesundheitsschädlich: Kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen
- R 66 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen
- R 67 Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen
- R 68 Irreversibler Schaden möglich

Kombinationen der R-Sätze

- R 14/15 Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase
- R 15/29 Reagiert mit Wasser unter Bildung giftiger und hochentzündlicher Gase
- R 20/21 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 20/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken
- R 20/21/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
- R 21/22 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
- R 23/24 Giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 23/25 Giftig beim Einatmen und Verschlucken
- R 23/24/25 Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
- R 24/25 Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
- R 26/27 Sehr giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 26/28 Sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken
- R 26/27/28 Sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
- R 27/28 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
- R 36/37 Reizt die Augen und die Atmungsorgane
- R 36/38 Reizt die Augen und die Haut
- R 36/37/38 Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut
- R 37/38 Reizt die Atmungsorgane und die Haut
- R 39/23 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen
- R 39/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut
- R 39/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens beim Verschlucken
- R 39/23/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut
- R 39/23/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken
- R 39/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
- R 39/23/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung

mit der Haut und durch Verschlucken

R 39/26 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen

R 39/27 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut

R 39/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken

R 39/26/27 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut

R 39/26/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken

R 39/27/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

R 39/26/27/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

R 40/20 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen

R 40/21 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut

R 40/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Verschlucken

R 48/23/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken

R 48/24/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

R 48/23/24/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

R 50/53 Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

R 51/53 Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

R 52/53 Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

R 68/20 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen

R 68/20/21 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut

R 68/20/21/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

R 68/20/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken

R 68/21 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut

R 68/21/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

R 68/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Verschlucken

S - Sätze

S 1 Unter Verschluss aufbewahren

S 2 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen

S 3 Kühl aufbewahren

S 4 Von Wohnplätzen fernhalten

S 5 Unter... aufbewahren (geeignete Flüssigkeit vom Hersteller anzugeben)

S 5.1 Unter Wasser aufbewahren

S 5.2 Unter Petroleum aufbewahren

S 5.3 Unter Paraffinöl aufbewahren

S 6 Unter... aufbewahren (inertes Gas vom Hersteller anzugeben)

S 6.1 Unter Stickstoff aufbewahren

- S 6.2 Unter Argon aufbewahren
- S 7 Behälter dicht geschlossen halten
- S 8 Behälter trocken halten
- S 9 Behälter an einem gut belüfteten Ort aufbewahren
- S 12 Behälter nicht gasdicht verschließen
- S 13 Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten
- S 14 Von ... fernhalten (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben)
- S 14.1 Von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säuren und Alkalien fernhalten
- S 14.2 Von oxidierenden und sauren Stoffen sowie Schwermetallverbindungen fernhalten
- S 14.3 Von Eisen fernhalten
- S 14.4 Von Wasser und Laugen fernhalten
- S 14.5 Von Säuren fernhalten
- S 14.6 Von Laugen fernhalten
- S 14.7 Von Metallen fernhalten
- S 14.8 Von oxidierenden und sauren Stoffen fernhalten
- S 14.9 Von brennbaren organischen Substanzen fernhalten
- S 14.10 Von Säuren, Reduktionsmitteln und brennbaren Materialien fernhalten
- S 14.11 Von brennbaren Stoffen fernhalten
- S 15 Vor Hitze schützen
- S 16 Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen
- S 17 Von brennbaren Stoffen fernhalten
- S 18 Behälter mit Vorsicht öffnen und handhaben
- S 20 Bei der Arbeit nicht essen und trinken
- S 21 Bei der Arbeit nicht rauchen
- S 22 Staub nicht einatmen
- S 23 Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen
- S 23.1 Gas nicht einatmen
- S 23.2 Dampf nicht einatmen
- S 23.3 Aerosol nicht einatmen
- S 23.4 Rauch nicht einatmen
- S 23.5 Dampf/Aerosol nicht einatmen
- S 24 Berührung mit der Haut vermeiden
- S 25 Berührung mit den Augen vermeiden
- S 26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
- S 27 Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen
- S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel ... (Vom Hersteller anzugeben)
- S 28.1 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser
- S 28.2 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife
- S 28.3 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife, möglichst auch mit Polyethylenglycol 400
- S 28.4 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 300 und Ethanol und anschließend mit viel Wasser und Seife
- S 28.5 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol
- S 28.6 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol und anschließend Reinigung mit viel Wasser
- S 28.7 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und saurer

Seife

- S 29 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen
- S 30 Niemals Wasser hinzugießen
- S 33 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen
- S 35 Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden
- S 35.1 Abfälle und Behälter müssen durch Behandeln mit 2%-iger Natronlauge beseitigt werden
- S 36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
- S 37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen
- S 38 Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen
- S 39 Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen
- S 40 Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit ... reinigen
- S 40.1 Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit viel Wasser reinigen (Material vom Hersteller anzugeben)
- S 41 Explosions- und Brandgase nicht einatmen
- S 42 Bei Räuchern/Versprühen geeignetes Atemschutzgerät anlegen und ... (geeignete Bezeichnungen vom Hersteller anzugeben)
- S 43 Zum Löschen ... (vom Hersteller anzugeben) verwenden (wenn Wasser die Gefahr erhöht, anfügen: "Kein Wasser verwenden")
- S 43.1 Zum Löschen Wasser verwenden
- S 43.2 Zum Löschen Wasser oder Pulverlöschmittel verwenden
- S 43.3 Zum Löschen Pulverlöschmittel, kein Wasser verwenden
- S 43.4 Zum Löschen Kohlendioxid, kein Wasser verwenden
- S 43.6 Zum Löschen Sand, kein Wasser verwenden
- S 43.7 Zum Löschen Metallbrandpulver, kein Wasser verwenden
- S 43.8 Zum Löschen Sand, Kohlendioxid oder Pulverlöschmittel, kein Wasser verwenden
- S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen)
- S 46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen
- S 47 Nicht bei Temperaturen über ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben)
- S 48 Feucht halten mit ... (geeignetes Mittel vom Hersteller anzugeben)
- S 49 Nur in Originalbehälter aufbewahren
- S 50 Nicht mischen mit ... (vom Hersteller anzugeben)
- S 50.1 Nicht mischen mit Säuren
- S 50.2 Nicht mischen mit Laugen
- S 50.3 Nicht mischen mit starken Säuren, starken Basen, Buntmetallen und deren Salzen
- S 51 Nur in gut gelüfteten Bereichen verwenden
- S 52 Nicht großflächig für Wohn- und Aufenthaltsräume zu verwenden
- S 53 Exposition vermeiden - vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen
- S 56 Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen
- S 57 Zur Vermeidung einer Kontamination der Umwelt geeigneten Behälter verwenden
- S 59 Information zur Wiederverwendung/ Wiederverwertung beim Hersteller/Lieferanten erfragen
- S 60 Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen
- S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen

S 62 Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rateinholen und Verpackung oder das Etikett vorzeigen.

S 63 Bei Unfall durch Einatmen: Verunfallten an die frische Luft bringen und ruhig stellen

S 64 Bei Verschlucken Mund mit Wasser ausspülen (nur wenn Verunfallter bei Bewusstsein ist)

Kombinationen der S-Sätze

S 1/2 Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren

S 3/7 Behälter dicht geschlossen halten und an einem kühlen Ort aufbewahren

S 3/9 Behälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort aufbewahren

S 3/9/14 An einem kühlen, gut belüfteten Ort entfernt von ... aufbewahren (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben)

S 3/9/14.1 An einem kühlen, gut belüfteten Ort, entfernt von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säuren und Alkalien aufbewahren

S 3/9/14.2 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von oxidierenden und sauren Stoffen sowie Schwermetallverbindungen aufbewahren

S 3/9/14.3 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Eisen aufbewahren

S 3/9/14.4 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Wasser und Laugen aufbewahren

S 3/9/14.5 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Säuren aufbewahren

S 3/9/14.6 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Laugen aufbewahren

S 3/9/14.7 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von Metallen aufbewahren

S 3/9/14.8 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von oxidierenden und sauren Stoffen aufbewahren S 3/9/14/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von ... aufbewahren (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben)

S 3/9/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort aufbewahren

S 3/14 An einem kühlen, von ... entfernten Ort aufbewahren (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben)

S 7/8 Behälter trocken und dicht geschlossen halten

S 7/9 Behälter dicht geschlossen an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren

S 7/47 Behälter dicht geschlossen und nicht bei Temperaturen über ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben)

S 20/21 Bei der Arbeit nicht essen, trinken und Rauchen

S 24/25 Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden

S 29/56 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen und diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen

S 36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen

S 36/37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen

S 36/39 Bei er Arbeit geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen

S 37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen

S 47/49 Nur im Originalbehälter bei einer Temperatur nicht über ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben)

Entsorgung

Organische halogenfreie bzw. halogenhaltige relativ unreaktive Substanzen und Lösungsmittel wurden ebenso wie schwermetallhaltige Lösungen in die dafür vorgesehenen Sammelbehälter gegeben. Alkalische bzw. saure Lösungen wurden nach Neutralisierung zusammen mit hydrolysiertem und neutralisiertem Natriumhydrid und Natrium ebenfalls in einen gesonderten Sammelbehälter gegeben.

Gefäße, die mit biologischem Material in Berührung kamen, sowie andere biologische Abfälle wurden etwa 2-3 Stunden bei 120°C im Autoklaven abgetötet. Autoklavierte Abfälle wurden in speziellen Sammelbehälter der Entsorgung zugeführt.

17. Literaturverzeichnis

- ¹ J. Ludwig; Die Wasserwirtschaft im Rahmen der Umweltpolitik in der Volksrepublik China, Asien - Deutsche Zeitschrift für Politik; *Zeitschrift der Deutschen Gesellschaft für Asienkunde*, Wirtschaft und Kultur, Januar **2000**, Heft 74.
- ² J. Westendorf, H. Hühnerfuss, L. Shen; The mutagenic potential of tap water samples in Shanghai; *Chemosphere*, 52(9), 1641-1646, **2003**.
- ³ G. Schönfelder, F. Gränitz, H. Thomas; Bitterfeld und das untere Muldetal; Reihe *Landschaften Deutschland - Werte der deutschen Heimat*, Bd. 66, Verlag Böhlau, Köln, Weimar, Wien, 2004.
- ⁴ H. Schmidt, H. Borsdorf, Ch. Opp, J. Stach; Untersuchungen zur Kontamination von Wald-, Wiesen- und Ackerböden mit ausgewählten Organika in der Muldenaue bei Bitterfeld; *Chem. Tech.*, 45(6), 467-474, **1993**.
- ⁵ S. Franke, N. Heinzl, W. Francke, Organische Schadstoffe im Gebiet der unteren Mulde - Non Target Screening: Analytik von Wasser, Grundwasser und Sediment - Ergebnisse und Konsequenzen in: W. Geller, K. Ockenfeld, M. Böhme, A. Knöchel(Hrsg.), Schadstoffbelastung nach dem Elbe-Hochwasser 2002 – Ad-hoc-Projekt Schadstoffuntersuchungen nach dem Hochwasser vom August 2002 zur Ermittlung der Gefährdungspotenziale an Elbe und Mulde, Abschlußbericht des BMBF-Verbundvorhabens, 206-223, **2004**
- ⁶ Sommer; *Biologische Meereskunde*, 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **1998**.
- ⁷ W. Calmano; Notwendigkeit einer ökotoxikologischen Beurteilung von Sedimenten; Positionspapier des Fachausschusses „Gewässersedimente“ der Fachgruppe Wasserchemie in der GDCh; *Acta Hydrochim. Hydrobiolog.*, 24(2), 101-103, **1996**.
- ⁸ W. Calmano; *Untersuchung und Bewertung von Sedimenten – ökotoxikologische und chemische Testmethoden*; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **2001**.

- ⁹ S. Safe; Toxicology and Risk Assessment of POP's; Persistent Organic Pollutants, Serie:
The Handbook of Environmental Chemistry; H. Fiedler (Ed.), Part 3O, Vol. 3: Anthropogenic Compounds, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **2003**.
- ¹⁰ J. Berndt; *Umweltbiochemie*; UTB, Stuttgart, **1995**.
- ¹¹ W. Ahlf; Ökotoxikologische Sedimentbewertung – Sedimenttoxizität, Biotest, Testkombination; *Z.Umweltchem. Ökotox.*, 7(2), 84-91, **1995**.
- ¹² U. Lange, A. Goksøyr, R. Stagg, D. Danischewski, D. Siebers, F. Buchholz, L. Karbe; Abiotic and biotic factors influencing the natural variation of the cytochrom P450 enzyme system in the liver of dab (*Limanda limanda*): An interim report; *Berichte Zentrum Meeres- u. Klimaforsch.*, Reihe E: Nr.7, 57-64, **1994**.
- ¹³ L. Karbe, K. Mädler, J. Westendorf; Biologische Effekte von Schadstoffen und toxisches Potential von Wasser und Sediment in Elbe und Nordsee (BIOTOX Elbe / BIOTOX Nordsee). II. 2.Statusseminar am 7.Januar 1994; *Berichte Zentrum Meeres- u. Klimaforsch.*, Reihe E: Nr.7, **1994**.
- ¹⁴ L. Karbe, U. Schiewer; Bioindikation in küstennahen Gewässern; *Bioindikation in aquatischen Ökosystemen*, G. Gunkel (Hrsg.), Fischer Verlag, Jena, **1994**.
- ¹⁵ U. Kamann, S. Biselli, H. Hühnerfuss, N. Reinecke, N. Theobald, M. Vobach, W. Wosniok; Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with Comet Assay and Zebrafish test; *Environm. Poll.*,132, 279-287, **2004**.
- ¹⁶ H. Gaugitsch, M. Nohava, R. Bürkl, E. Frank; Der Leuchtbakterientest in der Umweltkontrolle, Report UBA 94-090, Umweltbundesamt, Wien, Februar **1994**

- ¹⁷ DIN 38412 L 34 (1991) / L 341 (1994): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser, Abwasser und Schlammuntersuchung. Hrsg.: Fachnormenausschuß Wasserwesen (FNW) im DIN (Deutsches Institut für Normung) e.V.: Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L); Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum*-Leuchtbakterien-Abwassertest mit konservierten Bakterien (Teil 34) und Erweiterung des Verfahrens durch Teil 341.
- ¹⁸ U. Kammann, N. Theobald, H. Steinhart; Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea; *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 467(2), 161-168, 2000.
- ¹⁹ P. Pessala, E. Schultz, T. Nakari, A. Joutti, S. Herve; Evaluation of wastewater Effluents by small-scale biotests and a fractionation procedure; *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(2), 263-722, 2004.
- ²⁰ "Identifizierung sedimentgebundener Schadstoffe:Toxizitätstest-geleitete Analytik", Abschlussbericht des ISIS-Projektes, BMBF, Hamburg, März 2003.
- ²¹ A. Kinder; Induktion von Heatshockprotein 70 in EPC-Zellen (*Epithelioma Papulosum Cyprini*) als Indikator für Proteotoxizität in der Biotest-geleiteten Fraktionierung; Dissertation, Hamburg 2002.
- ²² M. Hecker, M.-P. Beck, M. Hoffmann, L. Karbe; Ökologische Relevanz endokriner Störungen: Erkenntnisse aus einer freilandorientierten Studie entlang der Elbe. Endokrin wirksame Substanzen in Abwasser und Klärschlamm - Neueste Ergebnisse aus Wissenschaft und Technik; *Beiträge zu Abfallwirtschaft / Altlasten*, Band 23, Technische Universität Dresden, vom 22./23. April 2002.
- ²³ S. Kevedkordes, V. Mersch-Sundermann, M. Diez, H. Dunkelberg; In vitro genotoxicity of polycyclic musk fragrances in the micronucleus test; *Mutaion Research*, 395(2-3), 145-150, 1997.
- ²⁴ B. Lah, B. Zinko, M. Narat, R. Marinsek-Logar; Monitoring of genotoxicity in drinking water using in vitro Comet Assay and Ames Test; *Food Technol. Biotechnol.*, 43(2), 139-146, 2005.

- ²⁵ K. Fent; *Ökotoxikologie - Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie*, 2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2003**.
- ²⁶ W. Dott, H. F. Merk, J. Neuser, R. Osieka (Hrsg.); *Lehrbuch der Umweltmedizin - Grundlagen, Untersuchungsmethoden, Krankheitsbilder, Prävention*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, **2002**.
- ²⁷ J. Westendorf; Genotoxische Wirkungen; Handbuch der Umweltveränderungen und Ökotoxikologie, Band 3B: *Aquatische Systeme: Biogene Belastungsfaktoren- Organische Stoffeinträge-Verhalten von Xenobiotika*, R. Guderian, G. Gunkel (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **2000**.
- ²⁸ H.-H. Vahl, L. Karbe, M. J. Prieto-Alamo, C. Pueyo, J. Westendorf; Sediment mutagenicity testing development of substance specific bacterial strains for the detection of mutagenic aromatic nitrogen compounds and oxidative mutagens; *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 3(3), 369-378, **2000**.
- ²⁹ H.-H. Vahl, L. Karbe, J. Westendorf; Mutagenicity testing of river sediments: comparison of Salmonella microsome test, arabinose resistance test, and umu test; *Mutation Research*, 394(1-3), 81-93, **1997**.
- ³⁰ B. N. Ames; The detection of chemical mutagens with enteric bacteria; *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their detection*, Vol. 1, A. Hollaender (Ed.), Plenum, New York, 267-282, **1971**.
- ³¹ C. Y. Chu, J. P. Chang, C. J. Wang, Modulatory effect of piperine on benzo[a]pyrene cytotoxicity and DNA adduct formation of V-79 lung fibroblast cells, *Food Chem. Toxicology*, 32(4), 373-377, **1994**.
- ³² K. Fent; Ecotoxicological effects at contaminated sites; *Toxicology*, 205(3), 223-240, **2004**.
- ³³ D. L. Villeneuve, J.S. Khim, K. Kannan, J. P. Giesy; Relative potencies of individual polycyclic aromatic hydrocarbons to induce dioxinlike and estrogenic responses in three cell lines; *Environmental Toxicology*, 17(2), 128-137, **2002**.

- ³⁴ H. Hollert, M. Dürr, H. Olsman, K. Halldin, B. Van Bavel, W. Brack, M. Tysklind, M. Engwall, T. Braunbeck; Biological and chemical determination of dioxin-like compounds in sediments by means of a sediment triad approach in the catchment area of the river Neckar; *Ecotoxicology*, 11, 323-336, **2002**.
- ³⁵ J. Schwarzbauer; Screening, Identifizierung und quantitative Analyse organischer Substanzen in Sediment und Schwebstoff des Elbesystems; Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, **1997**.
- ³⁶ A. H. Thieken, Schadstoffmuster in der regionalen Grundwasserkontamination der mitteldeutschen Industrie- und Bergbauregion Bitterfeld-Wolfen, Dissertation, Martin-Luther Universität, Halle-Wittenberg, **2001**.
- ³⁷ R. Gatermann; Verteilung, Anreicherung und Transformation nitroaromatischer und polycyclischer Moschusduftstoffe sowie weiterer N- und P-haltiger Problemstoffe in der Umwelt; Dissertation, Universität Hamburg, **1998**.
- ³⁸ S. Biselli, N. Reinecke, N. Heinzl, U. Kamann, S. Franke, H. Hühnerfuss, N. Theobald; Bioassay-directed fractionation of organic extracts of marine surface sediments from the North and Baltic Sea; *J. Soils and Sediments*, 5(1), 171-181, **2005**.
- ³⁹ N. Reinecke; Biotestgeleitete Analytik von ökotoxikologisch relevanten organischen Substanzen in Sedimentextrakten von Nord- und Ostsee; Dissertation, Universität Hamburg, **2003**.
- ⁴⁰ F.-X. Reichl, *Taschenatlas der Toxikologie*, 2. aktualisierte Aufl. - Stuttgart [u.a.] Thieme, **2002**.
- ⁴¹ H. Marquardt, S.G. Schäfer, *Lehrbuch der Toxikologie*, BI Wissenschaftsverlag Mannheim, **1994**.
- ⁴² H. Greim, *Toxikologie - eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner*, VCH, Weinheim, **1996**.
- ⁴³ J. E. Trosko; A failed Paradigm: Carcinogenesis is more than mutagenesis; *Mutagenesis*, 3(4), 363-366, **1988**.

- 44 B. N. Ames, K. Hooper, Does carcinogenic potency correlate with mutagenic potency in the Ames assay ? , *Nature*, 274(5666), 19-20, **1978**.
- 45 K. Akotories, U. Förstermann, F. Hofmann, K. Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie*, 9. Auflage, Urban und Fischer, München, **2005**.
- 46 R. Knippers, *Molekulare Genetik*, 9. kompl. überarbeitete Aufl., Thieme Verlag Stuttgart, **2006**.
- 47 J. Voet, D. Voet, *Biochemistry*, 2nd Ed., Wiley&Sons, **1995**.
- 48 W. Köhler (Hrsg.), H. J. Eggers (Hrsg.), B. Fleischer (Hrsg.), M. Reinhard (Hrsg.), H. Pfister (Hrsg.), G. Pulverer (Hrsg.), *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Aufl., Urban und Fischer, München, **2001**.
- 49 W. Seyffert, *Lehrbuch der Genetik*, Fischer Verlag, Stuttgart, **1998**.
- 50 B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, VCH, Weinheim, **1999**
- 51 G. Ludewig, S. Dogra, A. Seidel, F. Setiabudi, F. Oesch, H. Glatt; Quinones derived from polycyclic aromatic hydrocarbons: induction of diverse mutagenic and genotoxic effects in mammalian cells, *Polynucl. Aromat. Hydrocarbons, Int. Symp. 11th*, (**1991**), 545-56, Battelle Press Columbus, Ohio
- 52 B. N. Ames, F. D. Lee, W. E. Durston; An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 782-786, **1973**.
- 53 Ruiz-Vázquez, R., C. Pueyo, E. Cerdá-Olmedo: A mutagen assay detecting forward mutations in an arabinose-sensitive strain of *Salmonella typhimurium*, *Mutation Research*, 54(2), 121-129, **1978**.
- 54 C. Pueyo, H. Concepción; Conditions for the optimal use of the L-arabinose-resistance mutagenesis test with *Salmonella typhimurium*; *Mutagenesis*, 1(4), 267-273, **1986**.

- ⁵⁵ C. Pueyo, H. Concepción; Response of the L-arabinose forward mutation assay of *Salmonella typhimurium* to frameshift mutagens; *Mutation Research*, 203(1), 39-45, **1988**.
- ⁵⁶ L. Stryer, *Biochemistry*, 4th Ed., New York, Freeman, **1995**.
- ⁵⁷ vgl. [64]
- ⁵⁸ J. McCann, E. Choi, E. Yamasaki, B. Ames; Detection of carcinogens as mutagens in the *Samlonella*/microsome test: essay of 300 chemicals, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72(12), 5135-5139, **1975**.
- ⁵⁹ A. Poland, E. Glover; Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol (Evidence that binding species is receptor for induction of arylhydrocarbon hydroxylase); *The Journal of Biological Chemistry*, 251(16), 4936-4946, **1976**.
- ⁶⁰ A. B. Okey, D. S. Riddick, P. A. Harper; Molecular biology of the aromatic hydrocarbon (dioxin) receptor; *Trends in Pharmacological Sciences*, 15(7), 226-232, **1994**.
- ⁶¹ J. P. Jr Whitlock; Mechanistic Aspects of Dioxin Action; *Chem. Res. Toxicol.*, 6(6), 754-763, **1993**.
- ⁶² J. J. Whyte, R. E. Jung, C. J. Schmitt, D. E. Tillitt; Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity as a biomarker of chemical exposure, *Crit. Rev. Toxicol.*, 30(4), 347–57, **2000**.
- ⁶³ R. Santodonato; Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: Relationship to carcinogenicity; *Chemosphere*, 34(4), 835-845, **1997**.
- ⁶⁴ N. Schmees, W. Schwede, U. Fuhrmann, A. Schmidt, C. Moeller, Nonsteroidal progesterone receptor mudulators for the treatment of gynecological disorders and hormone-dependent tumors, female fertility control, and hormone replacement therapy, *U.S. Pat. Appl. Publ.*, **2006**.

- ⁶⁵ T. Colton, R. E. Greenberg, K. Noller, L. Resseguie, C. Van Bennekom, T. Heeren, Y. Zhang; Breast cancer in mothers prescribed diethylstilbestrol in pregnancy. Further follow-up; *J. Amer. Med. Ass.*, 269(16), 2096-2100, **1993**.
- ⁶⁶ T. Colburn, C. Clement (Eds.), *Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection*, Princeton Scientific Publ. Co., New Jersey, **1992**.
- ⁶⁷ Bayerisches Landesamt für Umweltschutz (LFU), Umweltchemikalien mit hormoneller Wirkung, BayLFU 2005 - Umweltberatung Bayern, Stand: Juni **2005**.
- ⁶⁸ A. M. Soto, C. Sonnenschein, K. L. Chung, M. F. Fernandez, N. Olea, M. F. Olea-Serrano; The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants; *Environ Health Perspect Supplements*, 103(Suppl. 7), 113-122 **1995**.
- ⁶⁹ E. J. Routledge, J. P. Sumper; Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen; *Environm. Toxicol. Chem.*, 15(3), 241-248, **1996**.
- ⁷⁰ C. F. Holinka, H. Hiroki, K. Hiroyuki, G. Erlio, Effects of steroid hormones and antisteroids on alkaline phosphatase activity in human endometrial cancer cells (*Ishikawa Line*), *Cancer Research*, 46(6), 2771-4, **1986**.
- ⁷¹ Water pollution prevention and control: successful cases in China - Submitted by State Environmental Protection Administration (SEPA) of China, Nairobi, Kenya, 21-25 February, **2005**.
- ⁷² J. Williams; Understanding the overuse of chemical Fertilizer in China - a synthesis of historic trends, recent studies, and field experiences; P.R.E.M.I.U.M. 2005 Research Experience for Undergraduates Sponsored by the National Science Foundation and Michigan State University, Macalester University, National Science Foundation and Michigan State University, July **2005**.
- ⁷³ <http://www.china.org.cn/Beijing-eview/Beijing/BeijingReview/German/99Mar/bjr99-12g-7.html>

- 74 Sogenannte "Null-Uhr-Aktion"; Fabriken, die die Auflagen zur Reinhaltung des Gewässers nicht einhalten konnten, wurden geschlossen. Quelle: "China Internet Information Center"
- 75 Topographische Karte 1:50000 Blatt L 4338 Bitterfeld des Landesamtes für Landvermessung und Datenverarbeitung Sachsen-Anhalt **1996**, in dankenswerter Leihgabe eingescannt im Institut für Geographie, Abteilung Kartensammlung, Uni Hamburg
- 76 B. Schneider, K. Weiler; A quick grain size procedure for trace metal contents of sediments, *Environm. Technol. Letters*, 5(6), **1984**
- 77 K. Doerffel; *Analytikum: Methoden der analytischen Chemie und ihre theoretischen Grundlagen*; Dt. Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig , 9. Auflage, **1994**.
- 78 P. A. White, L. D. Claxton; Mutagens in contaminated soil: A review; *Mutation Research*, 567(2-3), 227-345, **2004**.
- 79 O. Heemken; Optimierung der überkritischen Fluidextraktion und der beschleunigten Lösemittelextraktion für Untersuchungen zu Eintrag und Verteilung organischer Kontaminanten in der Nordsee; Dissertation, Universitäts-Gesamthochschule Siegen, **1997**.
- 80 D. Stirzenbach; Entwicklung eines Analysenverfahrens zur Bestimmung von chlorierten Kohlenwasserstoffen in marinen Sedimenten und Schwebstoffen unter besonderer Berücksichtigung der überkritischen Fluidextraktion; *Reihe: Berichte des Bundesamtes für Seeschifffahrt und Hydrographie*, Hamburg und Rostock, **1997**.
- 81 R. S. Meyer, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, D. E. Kimbrough; Sample preparation for environmental analysis in solids; Vol. 4, 3249-3255, Wiley, **2000**.
- 82 S. Biselli; Entwicklung einer analytischen Methode zum Nachweis von ökotoxikologisch relevanten organischen Problemstoffen in Sedimenten und Biota unter besonderer Berücksichtigung von Irgarol, synthetischen Moschusduftstoffen und deren Transformationsprodukten; Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg, **2001**.
- 83 H. H. Vahl; Genotoxizität von Schwebstoffen und Sedimenten aus der Elbe: Optimierung bakterieller Testverfahren unter besonderer Berücksichtigung oxidativer Mechanismen; Dissertation, Universität Hamburg, **1997**.

- 84 B. Schmidt; Biotest-geleitete chemische Analyse von Sedimenten; Dissertation, Universität Hamburg, **1999**.
- 85 M. Ricking, H. Neumann-Hensel, J. Schwarzbauer, A. Svenson; Toxicity of elemental octameric sulfur in aquatic sediments; *Environmental Chemistry Letters*, 2 (3), 109-112, **2004**.
- 86 MassLib-Software, MSP Kofel, MassLib V8.7E (Copyright 1996-2004, MPI für Kohlenforschung), über Citrix-Metaframe (Copyright 1999-2003, Citrix-Systems zugängliche Server Version)
- 87 G. Schomburg, *Gaschromatographie*, VCH, Weinheim, **1977**.
- 88 M. L. Lee; Retention indices for programmed-temperature capillary-column gas chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons; *Analytical Chemistry*, 51(6), 768-773, **1979**.
- 89 J. R. Donnelly, D. F. Gurka; Application of gas chromatographic retention properties to the identification of environmental contaminants; *J. Chromatography*, 642(1-2) , 409-415, **1993**.
- 90 E. Jardé, L. Mansuy, P. Faure; Organic markers in the lipidic fraction of sewage sludges; *Water Research*, 39(7), 1215-1232, **2005**.
- 91 R. P. Eganhouse, I. R. Kaplan; Extractable matter in municipal wastewaters - 2. Hydrocarbons: molecular characterization; *Environ. Sci. Technol.*, 16(9), 541-551, **1982**.
- 92 Schewe, C. & Kerndorff, H. (1996): Mineralölkohlenwasserstoffe als Grundwasserkontaminanten, Stuttgart (u. a.) (DEU): Fischer. – Schriftenreihe des Vereins für Wasser, Boden- und Lufthygiene.
- 93 Obst, U. & Seidel F. (1997): Biologische und Ökotoxikologische Grundlagen - In: Fachgruppe Wasserchemie in der GDCH (Hrsg.): *Chemie und Biologie der Altlasten*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

- ⁹⁴ R. P. Eganhouse, E. C. Ruth, I. R. Kaplan; Determination of long-chain alkylbenzenes in environmental samples by argentation thin-layer chromatography/high resolution gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry; *Analytical Chemistry*, 55(13), 2120-2126, **1983**.
- ⁹⁵ J. Schwarzbauer, S. Franke, M. Ricking; Molecular markers of anthropogenic activity in sediments of the Havel and Spree Rivers; *Water Research*, 37(11), 2607-2617, **2003**.
- ⁹⁶ R. P. Eganhouse, D. L. Blumfield I. R. Kaplan; Long-chain alkylbenzenes as molecular tracers of domestic wastes in the marine environment; *Environ. Sci. Technol.*, 17(9), 523-530, **1983**.
- ⁹⁷ P. Martus, W. Püttmann; Formation of alkylated aromatic acids in groundwater by anaerobic degradation of alkylbenzenes; *The Science of the Total Environment*, 307(1-3), 19-33, **2003**.
- ⁹⁸ A. M. Spormann, F. Widdel; Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria; *Biodegradation*, 11(2-3), 85-105, **2000**.
- ⁹⁹ H. R. Beller; Metabolic indicators for detecting *in situ* anaerobic alkybenzene degradation; *Biodegradation*, 11(2-3), 125-139, **2000**.
- ¹⁰⁰ G. P. Yang, X.-L. Liu, J.-W. Zang; Distribution of dibenzothiophene in the sediments of the South China Sea; *Environmental Pollution*, 101(3), 405-414, **1998**.
- ¹⁰¹ D. Henschler, *Toxikologie chlororganischer Verbindungen*, VCH, Weinheim, **1994**.
- ¹⁰² H. de Wever, H. Verachtert; Biodegradation and toxicity of benzothiazoles; *Water Research*, 31(11), 2673-2684, **1997**.
- ¹⁰³ S. T. Nawrocki, K. D. Drake, C. F. Watson, G. D. Foster, K. J. Maier; Comparative aquatic toxicity evaluation 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole and selective degradation products using *Ceriodaphnia dubia*; *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(3), 344-350, **2005**.
- ¹⁰⁴ C. Höckelmann, F. Jüttner; Volatile organic compound (VOC) analysis and sources of limonene, cyclohexanone and straight chain aldehydes in axenic cultures of *Calothrix* and *Plectonema*; *Water Science and Technology*, 49(9), 47-54, **2004**.

- 105 A. Bosser DeRatuld, Y. Waché, J.-C. Lhuguenot, J.-M. Belin; Effect of cis/trans isomerism of β -caryophyllen on the ratios of volatile compounds produced during oxidative degradation; *J. Agric. Food Chem.*, 51(7), 1984-1987, **2003**.
- 106 Y. Asakawa; Terpenoids and aromatic compounds with pharmacological activity from bryophytes; *Bryophytes - their chemistry and chemical taxonomy*, H. D. Zinsmeister, R. Mues (Eds.), Clarendon Press, Oxford, **1990**.
- 107 M. Møller, I. Hagen, T. Ramdahl; Mutagenicity of polycyclic aromatic compounds (PAC) identified in source emissions and ambient air; *Mutation Research*, 157(2-3), 149-156, **1985**.
- 108 K. Takeshi, I. Shunkichi, K. Shinsaku; Selective preparative of p-(1-phenylethyl)phenols from phenols and styrene; (Honshu Chemical Industry Co., Ltd., Japan), Jpn. Kokai Tokkyo Koho, **1992**, 4pp, JP 04117340, Patent written in Japanese.
- 109 J.-J. Chen, P.-H. Chen, C.-H. Liao, S.-Y. Huang, I.-S. Chen, New Phenylpropenoids, Bis(1-phenylethyl)phenols, Bisquinolinone Alkaloid, and Anti-inflammatory Constituents from *Zanthoxylum integrifoliolum*, *J. Natural Products*, 70, 1444-1448, **2007**
- 110 Untersuchung von Lebensmitteln (L00.00-24); Bestimmung von Benzol, Toluol und Xylol-Isomeren in Lebensmitteln, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §65 LFGB; Beuth Verlag, **1993**
- 111 W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert, *Qualitätssicherung in der analytischen Chemie*, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge, **1992**
- 112 W. Gottwald, *Statistik für Anwender*, Wiley-VCH, Weinheim-Stuttgart-New York-Chichester Brisbane-Singapore-Toronto, **2000**
- 113 M. Ahel, D. Hrsak, W. Giger; Aerobic transformation of short-chain alkylphenol polyethoxylates by mixed bacterial cultures, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26(4), 540-548, **1994**.
- 114 E.J. Routledge, J.P. Sumpter, Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity, *J. Biological Chemistry*, 272,3280-3288, **1997**

- 115 K. Günther, E. Kleist, B. Thiele, Estrogen-active Nonylphenols from an isomer specific viewpoint: A systematic numbering system and future trends, *Anal. Bioanalyt. Chem.*, 384, 542-546, **2006**
- 116 B. Gutendorf, J. Westendorf; Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens; *Toxicology*, 166(1-2), 79-89, **2001**.
- 117 N. Reinecke, S. Biselli, S. Franke, W. Francke, N. Heinzl, H. Hühnerfuss, H. Iznaguen, U. Kamann, N. Theobald, Brominated indoles and phenols in marine sediment and water extracts from the north and Baltic seas – concentrations and effects, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(2), 186-196, **2006**.
- 118 A. Josupeit, Synthese und Identifizierung von Bromindolen, Diplomarbeit, Universität Hamburg, Fachbereich Chemie, **2004**.
- 119 J.C. Powers, Haloindoles and Organometallic Derivatives of Indoles, *Chem. of Het. Comp.*, W.J.Holihan (Editor), 25(2), 127-177, Wiley-Interscience, New York, **1972**
- 120 D.T. Belmont, L.A. Paquette, Synthetic Studies Aimed at the Dolstanes, *J. Organic Chemistry*, 4102-4107, **1985**
- 121 G. Bartoli, G. Palmieri, The reaction of Vinyl Grignard Reagents with 2-substituted Nitroarenes: A new Approach of the Synthesis of 7-substituted Indoles, *Tetrahedron Letters*, 30(16), 2129-2132, **1989**
- 122 V. Bocci, G. Palla; High yield selective bromination and iodination of indoles in N,N-dimethylformamide; *Synthesis*, 12, 1096-1097, **1982**.
- 123 M. R. Brennan, K. L. Erickson, F. S. Szmalc, M. J. Tansey, J. M. Thornton; The preparation and spectral characterization of 2-haloindoles, 3-haloindoles, and 2,3-dihaloindoles; *Heterocycles*, 24(10), 2879-2885, **1986**.
- 124 K. Piers, C. Meimaroglou, R.V. Jardine, R. K. Brown; The preparation of 3-bromoindole; *Can.J.Chem.*, 41(9), 2399-2401, **1963**.
- 125 J.A. Ballantine, R.G. Fenwick, and (in part) M. Alan, Fragmentations in the Spectra of 2-Oxo-3-Indolyl Derivatives, *Organic Mass Spectrometry*, 1, 467-481, **1968**

- 126 J. H. Shen, B. Gutendorf, H. H. Vahl, L. Shen, J. Westendorf; Toxicological profile of pollutants in surface water from an area in Taihu Lake, Yangtze Delta; *Toxicology*, 166(1-2), 71-78, **2001**.
- 127 G. Blume; Im Krebsdorf, *Die Zeit*, Nr.51, **2005**.
- 128 Q. Wenchuan, M. Dickman, F. Chengxin, W. Sumin, S. Chenwei, Z. Lu, Z. Huixian; Distribution, sources and potential toxicological significance of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Taihu Lake Sediments, China; *Hydrobiologica*, 485, 163-171, **2002**.
- 129 V. L. Maria, A. C. Correia, M. A. Santos; *Anguilla anguilla* L. liver EROD induction and Genotoxic responses after Retene exposure; *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(2), 230-238, **2005**.
- 130 T. McFall, G. M. Booth, M. L. Lee; Mutagenic activity of methyl-substituted tri- and tetracyclic sulfur heterocycles; *Mutation Research*, 135(2), 97-103, **1984**.
- 131 M. L. Lee, M. V. Novotny, K. D. Bartle, *Analytical Chemistry of Polycyclic Aromatic Compounds*, Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, **1981**.
- 132 R. G. Harvey, *Polycyclic aromatic Hydrocarbons*, VCH Wiley, Weinheim, **1997**.
- 133 L. C. Brinkworth, P. V. Hodson, S. Tabash, P. Lee; CYP1A Induction and blue sac disease in early developmental stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to retene; *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 66(7), 627-646, **2003**.
- 134 J. Tuo, R. P. Philip; Saturated and aromatic diterpenoids and triterpenoids in Eocene coals and mudstones from China; *App. Geochem.*, 20(2), 367-381, **2005**.
- 135 R. Alexander, T. P. Bastrow, S. J. Fisher, R. I. Kagi; Geosynthesis of oranic compounds II, Methylation of phenanthrene and alkylphenanthrenes; *Geochim. et Cosmochim. A.*, 59(20), 4259-4266, **1995**.

- ¹³⁶ L. Ruzicka, Fr. Balas, Höhere Terpenverbindungen XI¹). Zur Kenntnis der Dextropimarsäure und über die Einteilung der Fichtenharzsäuren, *Helvetica Chimica Acta*, 6(1), 677-691, **1923**.
sowie:
W. Ostwald, R. Lorenz, Beiträge zur Kolloidchemie der Papierleimung, II. Über die Kolloidchemie des Leimungsvorganges, *Colloid and polymer Science*, 32(3), 195-205, **1923**.
sowie:
W. Ostwald, W. Gram, Über die Auflösung von Harzen in Alkali. I. Auflösung von amerikanischem Kolophonium und Abietinsäure in Natronlauge, *Colloid and polymer Science*, 62(2), 180-198, **1933**
- ¹³⁷ BUA (Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft Deutscher Chemiker) (Hrsg.), Ethylbenzol-BUA-Stoffbericht 178, Hirzel Verlag, Stuttgart, **1996**.
- ¹³⁸ Payne J.R. & Philips C.R., Photochemistry of Petroleum in Water, *Environ.Sci.Technol.*, 19, **1985**
- ¹³⁹ Lawrence P. Wackett and C. Douglas Hershberger, *Biocatalysis and Biodegradation: Microbial Transformation of Organic Compounds*, ASM Press, Wash. DC., **2001**
T. Soriano, M. Menéndez, P. Sanz, M. Repetto, Method for the simultaneous quantification of n-hexane metabolites: application to n-hexane metabolism determination, *Human & Experimental Toxicology*, 15(6), 497-503, **1996**
- ¹⁴⁰ Boehncke, A., Mangelsdorf, I., Rosner, G.; Stoffströme von Benzol unter besonderer Berücksichtigung der Bundesrepublik Deutschland, UWSF, *Z. Umweltchem. Ökotox.*, 9(6), **1997**.
- ¹⁴¹ R. S. Norton, R. J. Wells, A Series of Chiral Polybrominated Biindoles from the Marine Blue-Green Alga *Rivularia firma*. Application of ¹³C-NMR Spin-Lattice Relaxation Data and ¹³C-¹H Coupling Constants to Structure Elucidation, *JACS*, 104(13), 3628-3635, **1982**.

- ¹⁴² R. J. Capon, C. Skene, D. Vuong, E. Lacey, J. H. Gill, K. Heiland, T. Friedel, Equilibrating Isomers: Bromoindoles and a Seco-Xanthine Encountered during a Study of Nematocides from the Southern Australian Marine Sponge *Hymeniacidon* sp., *J. Natural Products*, 65(3), 368-370, **2002**.
- ¹⁴³ J. N. Carter Franklin, A. Butler, Vanadium Bromoperoxidase-Catalyzed Biosynthesis of Halogenated Marine Natural Products, *JACS*, 126(46), 15060-15066, **2004**.
- ¹⁴⁴ H. Sobek, T. Haag, O. Pfeifer, D. Schomburg, F. Lingens, K.-H. van Pee, Crystallization and preliminary X-ray data of bromoperoxidase from *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762, *Journal of Molecular Biology*, 221(1), 35-7, **1991**.
- ¹⁴⁵ C. J. Carrano, M. Mohan, S. M. Holmes, R. de la Rosa, A. Butler, J. M. Charnock, C. D. Garner, Oxovanadium(V) Alkoxo-Chloro complexes of the hydridotripyrazolylborates as models for the binding site in bromoperoxidase, *Inorganic Chemistry*, 33(4), 646-55, **1994**.
- ¹⁴⁶ W. Ahlf, H. Hollert, H. Neumann-Hensel, M. Ricking, A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality – a german approach based on ecotoxicological and chemical measurement, *J. Soils & Sediments*, 2(1), 37-42, **2002**.
- ¹⁴⁷ P.H. Roos, S. Tschirbs, F. Pfeifer, P. Welge, A. Hack, M. Wilhelm, H.M. Bolt; Risk potentials for humans original and remediated PAH-contaminated soils: application of biomarkers of effect, *Toxicology*, 205(3), 181-194, **2004**.
- ¹⁴⁸ LEBENSMITTELRECHT (STAND JANUAR **2003**) Verlag CH Beck, München ASU, Nr. L 06.00-3 (2002) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Referenzmethoden Trockenmassebestimmung (Durchführung nach § 35 LMBG i. V. m. ASU Nr. L 06.00-3)
- ¹⁴⁹ OECD. **1983**. Genetic Toxicology: *Salmonella typhimurium*, Reverse Mutation Assay. Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris. OECD 471

- 150 M. Bradford; A rapid and sensitive method for the Quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Analytical Biochemistry* , 72(1-2), 248-254, **1976**.
- 151 D. G. Monroe, S. A. Johnsen, M. Subramaniam, B. J. Getz, S. Khosla, B. L. Riggs, T. C. Spelsberg; Mutual antagonism of estrogen receptors alpha and beta and their preferred interactions with steroid receptor coactivators in human osteoblastic cell lines, *J. Endocrinology*, 176(3), 349-367, **2003**.
- 152 D. G. Monroe, B. J. Getz, S. A. Johnsen, B. L. Riggs, S. Khosla, T. Spelsberg; Estrogen receptor isoform-specific regulation of endogenous gene expression in human osteoblastic cell lines expressing either ER α and ER β , *J. Cell. Biochem.*, 90(2), 315-326, **2003**.
- 153 I. O. O. Korhonen, Gas-liquid chromatographic analysis, XXXI Retention increments of isomeric chlorophenols on low polarity (SE-30) and polar (FFAP) capillary columns, *J. Chromatography*, 315(2), 185-200, **1984**.

Publikationen

Johannes Westendorf, Katharina Effenberger, Hassan Iznaguen, Simla Bazar, Toxicological and analytical investigations of Noni (*Morinda citrifolia*) fruit juice, *J. Agric. Food Chem.*, (2007), 55, 529-537

Ismene Jäger, Christoph Hafner, Claudia Welsch, Klaus Schneider, Hassan Iznaguen, Johannes Westendorf, The mutagenic potential of madder root in dyeing processes in the textile industry, *Mutation Research*, (2006), 605, 22-29

Iznaguen, H.; Reineke, N.; Biselli, S.; Franke, S.; Francke, W.; Heinzl, N.; Huehnerfuss, H.; Kammann, U.; Theobald, N.; Vobach, M.; Wosniok, W., Brominated Indoles and Phenols in Marine Sediment and Water Extracts from the North and Baltic Seas-Concentrations and Effects, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, (2006), 51(2), 186-196.

Saritas, Y.; Sonwa, M. M.; Iznaguen, H.; König, W. A.; Muhle, H.; Mues, R., Volatile constituents in mosses (Musci), *Phytochemistry*, (2001), 57(3), 443-457.

Erklärung zur Dissertation

Hassan Iznaguen
22049 Hamburg

Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation mit dem Titel:

„Toxikologische Untersuchungen an Sedimenten und ausgewählten Kontaminanten“

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Hamburg, d. 03.07.2009

Unterschrift