

**Enantioselektive HPLC-Trennung und VCD-
Strukturbestimmung von atropisomeren MeSO₂-PCB
sowie Studien über deren Toxizität und deren Verteilung
in Biota-Proben**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Nils Peters

aus Elmshorn

Hamburg 2002

Alles beginnt irgendwo, obwohl viele Physiker anderer Meinung sind. Die Leute haben immer gewußt, daß die Anfänge der Dinge recht problematisch sind. So fragen sie sich zum Beispiel, wie der Fahrer des Schneepflugs zur Arbeit kommt oder wo die Autoren von Wörterbüchern die richtige Schreibweise von Wörtern nachschlagen. Dennoch ist der Wunsch allgegenwärtig, in den ausgefranst, verhedderten und verknoteten Netzen der Raum-Zeit einen Punkt zu finden, auf den man deuten kann, daß hier, genau *hier* alles begann...

(Terry Pratchett)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	PCB in der Umwelt.....	1
1.1.1.	PCB-Produktion.....	1
1.1.2.	Chemische und physikalische Eigenschaften der PCB.....	2
1.1.3.	Klassifizierung und technische Anwendung von PCB	2
1.1.4.	Unfälle in der Umwelt mit PCB: Yusho und Yu Sheng	4
1.1.5.	Eintragsquantitäten von PCB in die Umwelt	5
1.1.6.	Bestimmung des Umweltverhaltens von PCB durch physikochemische Parameter.....	6
1.1.7.	Biotransformation von PCB durch Bakterien	7
1.1.8.	Bioakkumulation	7
1.2.	Aufnahme und Verteilung von PCB im Körper.....	9
1.2.1.	Aufnahme eines PCB-Lipoprotein-Assoziats in die Zelle	10
1.2.2.	Eliminationsraten der PCB.....	11
1.3.	Toxikologie der PCB	12
1.3.1.	Strukturspezifische Toxikologie.....	13
1.3.2.	TEF-Konzept.....	16
1.4.	Methylsulfonyl-PCB in der Umwelt.....	17
1.4.1.	Organ- und Gewebe-spezifische Akkumulation von 3- bzw. 4-MeSO ₂ -PCB	21
1.4.2.	Entstehung von MeSO ₂ -PCB	22
1.4.3.	Toxikologie der MeSO ₂ -PCB.....	25
1.5.	Atropisomere PCB.....	26
2.	Chromatographische Trennverfahren unter Verwendung chiraler Trennsäulen	28

2.1.	Chromatographische Trennverfahren	28
2.1.1.	Cyclodextrine	30
2.1.2.	Enantioselektive Gaschromatographie mit modifizierten Cyclodextrinen	31
2.1.3.	Enantioselektive HPLC mit modifizierten Cyclodextrinen	32
2.1.4.	Optimierung der HPLC-Parameter	33
2.1.5.	Voraussetzungen für chirale Diskriminierung	34
2.2.	Qualitative HPLC/ Optimierung der Trennqualität	35
2.3.	Verfahrensentwicklung einer quantitativen Enantiomerentrennung mittels HPLC	39
2.3.1.	Quantitative Enantiomerentrennung mit Verfahren 1	39
2.3.2.	Quantitative Enantiomerentrennung mit Verfahren 2	41
2.4.	Überprüfung der Enantiomerenreinheit mittels GC	45
2.4.1.	Vergleich der Elutionsreihenfolgen: GC vs. HPLC	46
2.5.	Vergleich der Enantiomerentrennungen: GC vs. HPLC	47
2.6.	Zusammenfassung der chromatographischen Ergebnisse	48
3.	Polarimetrie	50
4.	VCD-Spektroskopie	51
4.1.	Einleitung	51
4.2.	VCD-Messungen	54
4.3.	Ab initio-Kalkulationen	55
4.4.	Resultate	55
4.5.	Zusammenfassung	62
5.	Untersuchung verschiedener toxikologischer Effekte der MeSO ₂ -PCB und ihrer Mutterverbindungen	63
5.1.	Disruptive Einflüsse ausgewählter MeSO ₂ -PCB Enantiomere auf den Glucocorticoid-abhängigen Signalübertragungspfad	63

5.1.1.	Experiment	63
5.1.2.	Ergebnisse	64
5.1.3.	Diskussion	65
5.2.	Abbauverhalten von chiralen PCB-Verbindungen in Hepatozyten.....	66
5.2.1.	Resultate.....	68
5.2.2.	Diskussion	69
6.	Biotaprobren	71
6.1.	Einleitung	71
6.2.	Methode/ Experimentelles	73
6.2.1.	Probenahme	73
6.2.2.	Homogenisieren.....	73
6.2.3.	Extraktion.....	74
6.2.4.	EOM-Bestimmung.....	74
6.2.5.	Clean-up	74
6.2.6.	GC/MS-Auswertung	76
6.2.7.	Wiederfindungsraten.....	77
6.2.8.	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.....	78
6.2.9.	Blindwerte	79
6.2.10.	Fehlerbetrachtung	80
6.2.11.	Laborleistungstest	80
6.2.12.	Wiederholbarkeit der Methode.....	82
6.3.	Ergebnisse	83
6.4.	Diskussion	90
7.	Zusammenfassung	93

8.	Summary	99
9.	Ausblick	104
10.	Experimenteller Teil	106
10.1.	Experimentelle Daten zu: Chromatographische Methoden	106
10.1.1.	HPLC	106
10.1.2.	Temperaturprogramme GC	107
10.2.	Experimentelle Daten zu: Disruptive Einflüsse ausgewählter MeSO ₂ -PCB Enantiomere auf den Glucocorticoid-abhängigen Signalübertragungspfad	108
10.2.1.	Zellkulturen	108
10.2.2.	TAT-Assay	108
10.3.	Experimentelle Daten zu: Hepatozyten-Test:	109
10.3.1.	Gewinnung der Hepatozyten	109
10.3.2.	Aussaat der Zellen	110
10.3.3.	Exposition der Zellen	110
10.3.4.	Aufarbeitung und Auswertung des Hepatozyten-Tests	111
10.4.	Experimentelle Daten zu: Biotaprobe	111
10.4.1.	Reinigung der Glasgeräte	111
10.5.	Verwendete Chemikalien	112
10.5.1.	Lösungsmittel	112
10.5.2.	Feststoffe	112
10.5.3.	Standard	113
10.5.4.	Entsorgung der Chemikalien	113
10.6.	Details zur Probenaufarbeitung	113
10.6.1.	HP-GPC	114
10.6.2.	GC HP 5890 Serie II	114

10.6.3. GC/MS-EI: Varian 3400	115
10.6.4. Schema des Analyseverfahrens	115
11. Literaturverzeichnis	117
Anhang	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Chemische Struktur von PCB	3
Abb. 2:	Zeitlicher Verlauf des PCB-Gehaltes in Muttermilch in Deutschland	8
Abb. 3:	Weg und Aufnahme eines PCB in einen Adipozyten: (1) Endozytose des PCB-Chylomikron-Assoziats. (2) Ein primäres Lysosom fusioniert mit dem PCB-Chylomikron-Assoziat. (3) Von Triglyceriden solubilisiertes PCB.	11
Abb. 4 :	Molekularer Mechanismus der Induktion von CYP1A1 durch Genexpression am Beispiel des PCB 126	14
Abb. 5:	Strukturvergleich von 3,3',4,4',5-Pentachlorbiphenyl (PCB 126, oben) und 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD, unten)	14
Abb. 6:	Strukturvergleich von 2,2',3,3',4,4'-Hexachlorbiphenyl (PCB 128, oben) und Phenobarbital (unten)	15
Abb. 7:	2,3,3',4,4'-Pentachlorbiphenyl (PCB 105), ein mixed type inducer	16
Abb. 8:	PCB 70 und 105 mit notwendigem Substitutionsmuster zur Bildung von MeSO ₂ -PCB	19
Abb. 9:	Metabolisierungspfade am Beispiel des PCB 64	24
Abb. 10:	Strukturformel von (-)-Thalidomid	27
Abb. 11:	Variablenermittlung der Trennqualität T	30
Abb. 12:	Strukturformeln und Abmessungen der a -, b - und g -Cyclodextrine	31
Abb. 13:	PerMe- b -CD an Aminopropylkieselgel gebunden	33
Abb.14:	Vergleich der Enantiomerentrennung von 4-132 auf der unvollständig methylierten b -CD-Säule (li.) und der PerMe- b -CD-Säule (re.)	38
Abb.15:	Vergleich der Enantiomerentrennung von 3-149 auf der unvollständig methylierten b -CD-Säule (oben) und der PerMe- b -CD-Säule (unten)	38
Abb. 16:	Quantitative Enantiomerentrennung des 3-174 in niedriger Konzentration	40

Abb. 17:	<i>Erstluierendes Enantiomer (= Fraktion 1) mit einer Reinheit von 98,7 %; zweitluierendes Enantiomer (= Fraktion 2) mit einer 94 %igen Reinheit und nach weiterer Aufreinigung mit einer Reinheit von 99,x % (eingblendete Grafik)</i>	41
Abb. 18:	<i>Quantitative Enantiomerentrennung des 3-174, Injektionsvolumen 250µL, Konzentration 2,2 mg/mL</i>	42
Abb. 19:	<i>Enantiomerenreine Fraktionen 1 und 2 des 3-174 (Die Fraktionen 1 und 2 sind aus Anschauungsgründen in einem Chromatogramm zusammengefaßt)</i>	43
Abb. 20:	<i>Überprüfung der Enantiomerenreinheit des 4-132 (Zur Veranschaulichung sind beide Fraktionen in einem Chromatogramm abgebildet).</i>	44
Abb. 21:	<i>Fraktion 2 des 4-132 nach Aufreinigung</i>	44
Abb. 22:	<i>Gaschromatographische Überprüfung mit einer 15 m langen chiralen Heptakis(2,3-di-O-methyl-6-O-tert-butyl-dimethylsilyl)-β-cyclodextrin (20% in SE 52)- Säule der zuvor mit der HPLC getrennten Enantiomere</i>	46
Abb. 23:	<i>Strukturen der untersuchten MeSO₂-PCB</i>	52
Abb. 24:	<i>Schematischer Aufbau eines VCD-Spektrometers (PEM = Photoelastischer Modulator)</i>	52
Abb. 25:	<i>Unpolarisiertes Infrarotspektrum des MeSO₂-3-149</i>	54
Abb. 26:	<i>Mit der Gauß 98-Software mit einem 6-31G* Basissatz im Rahmen der Dichtefunktional-Theorie in der Form der „Becke’s Drei-Parameter-Ansatz dichtefunktionaler Hybridmethoden“ in Kombination mit der Korrelationskorrektur von Lee, Yang und Parr (B3-LYP) berechnete Geometrie des MeSO₂-PCB 3-149</i>	56
Abb. 27:	<i>Energiehyperflächen-Scan für die Rotation der MeSO₂-Gruppe des MeSO₂-PCB 3-149 mit Abbildungen der Energie-minimierten Geometrien</i>	57
Abb. 28:	<i>Simulierte VCD-Spektren der verschiedenen Konformationen des MeSO₂-PCB 3-149 (die Zuordnungen zu den Konformeren sind identisch mit Abb. 27).</i>	58
Abb. 29:	<i>Experimentelle und simulierte VCD-Spektren von a.) links oben: erstluierendes Enantiomer des (S)-MeSO₂-PCB 3-149; b.) rechts oben: zweitluierendes Enantiomer des (R)-MeSO₂-PCB 3-174; c.) links unten:</i>	

	<i>erstelulierendes Enantiomer des (R)-MeSO₂-PCB 3-132; d.) rechts unten: erstelulierendes Enantiomer des (R)-MeSO₂-PCB 4-132</i>	59
Abb. 30:	<i>Absolute Strukturen der vier MeSO₂-PCB Enantiomere, die in dieser Arbeit untersucht wurden: a.) links oben: erstelulierendes Enantiomer des (S)-MeSO₂-PCB 3-149; b.) rechts oben: zweitelulierendes Enantiomer des (R)-MeSO₂-PCB-3-174; c.) links unten: erstelulierendes Enantiomer des (R)-MeSO₂-PCB 3-132; d.) rechts unten: erstelulierendes Enantiomer des (R)-MeSO₂-PCB 4-132</i>	60
Abb. 31:	<i>Effekte der enantiomeren MeSO₂-CB149 auf Dexamethason-induzierte TAT-Aktivität in der hepatozytischen Reuber-Ratten Zelllinie. Die Zellen wurden Dexamethason (1nM) exponiert und die einzelnen Enantiomere (0,1-5 mM) 18 Stunden in dem Medium belassen. Die Konzentration von 10⁻⁸ M in dem Graph repräsentiert die Abwesenheit der Enantiomere, so daß dort die TAT-Aktivität gleich 100% gesetzt wurde. Bei dieser Konzentration konnten keine Anzeichen der Toxizität festgestellt werden. Jeder Meßpunkt repräsentiert den Durchschnittswert ± SD aus drei Messungen</i>	65
Abb. 32:	<i>̑ PCB und ̑ MeSO₂-PCB Konzentrationen in Rattenlebern, 1,2,4,8 Wochen (= W1-W8) nach Behandlung mit Chlophen A50. Die schmalen Balken repräsentieren die Standardabweichung mit n = 4</i>	67
Abb. 33 :	<i>Auf der 25 m langen chiralen 2,3-Me-6-TBDMS-b-CD-Säule (50 % in OV 1701) Säule angetrennte PCB149-Enantiomere mit und ohne Zugabe von Hepatozyten nach jeweils zwölfstündiger Inkubationszeit</i>	68
Abb. 34:	<i>Auf der 15 m langen chiralen 2,3-Me-6-TBDMS-b-CD-Säule (20% in SE 52) gaschromatographisch vollständig getrennte Enantiomere des PCB-Metaboliten 3-149 mit und ohne Zugabe von Hepatozyten nach jeweils zwölfstündiger Inkubationszeit</i>	69
Abb. 35:	<i>Mit Chlororganika kontaminierte Leber eines Wildschweins aus dem Revier Dessau-Nord</i>	84
Abb. 36:	<i>Konzentrationen der atropisomeren 3- und 4-MeSO₂-PCB [ng/g EOM] im Vergleich zu den Muttersubstanzen in Humanfettproben</i>	91
Abb. 37:	<i>Konzentrationen der atropisomeren 3- und 4-MeSO₂-PCB [ng/g EOM] im Vergleich zu den Muttersubstanzen in Pelikanfettproben</i>	91

Abkürzungsverzeichnis

Ah-Rezeptor	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AHH	Arylhydrocarbon-Hydroxylase
BG	Bestimmungsgrenze
CD	Cyclodextrine
CKW	chlorierte Kohlenwasserstoffe
DDE	1,1-Dichlor-2,2-bis[4-chlorphenyl]ethen
DDT	1,1,1-Trichlor-2,2-bis[4-chlorphenyl]ethan
ECOD	Ethoxycumarin- <i>O</i> -deethylase
EOM	Extrahierbare organische Matrix
ER	<i>enantiomeric ratio</i> = ER; Enantiomerenverhältnisse
EROD	Ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylase
FCKW	Fluorchlorkohlenwasserstoffe
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GSH	reduziertes Gluthathion
GST	Gluthathion- <i>S</i> -Transferase
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HO-PCB	Hydroxy-PCB
IC ₅₀	Konzentration, bei der eine 50%ige Inhibition erfolgt
IS	Interner Standard

IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K _{ow}	<i>n</i> -Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
LD ₅₀	Letale Dosis bei 50 Prozent der Versuchstiere
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LOAEL	<i>Lowest observed adverse effect level</i> (Niedrigster Wert, der toxische Effekte verursacht)
Log K _{ow}	Logarithmus des <i>n</i> -Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten
MAP	Mercaptursäure-Pfad (<i>mercapturic acid pathway</i>)
MeSO-PCB	Methylsulfoxid-PCB
MeSO ₂ -PCB	Methylsulfonyl-PCB
MeS-PCB	Methylthio-PCB
NG	Nachweisgrenze
NOAEL	No observed adverse effect level (Wert, bei dem keine toxischen Effekte verursacht werden)
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PVC	Polyvinylchlorid
SAM	<i>S</i> -Adenosylmethionin
TAT	Tyrosinaminotransferase
2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin, „Seveso-Dioxin“
TEF	<i>Toxic equivalency factors</i> , toxische Äquivalenzfaktoren
TEQ	<i>Toxic equivalent concentrations</i> , Toxizitätsäquivalenz-Konzentrationen
WFR	Wiederfindungsraten
WME	Williams Medium E
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Summenformeln, Nomenklatur, Isomerenverteilung auf die PCB-Homologen sowie deren Chlorierungsgrad (in %)	3
Tabelle 2:	Durchschnittliche Kontamination durch PCB	9
Tabelle 3:	Speziesvergleich der MeSO ₂ -PCB im Verhältnis zu den Gesamt-PCB	18
Tabelle 4:	In Biota nachgewiesene PCB, sowie deren MeSO ₂ -PCB-Metaboliten. (Chirale Kongenere sind fett gedruckt).	20
Tabelle 5:	Leistungsvergleich der relevanten HPLC-Trennsäulen, (t ₀ = 36 sec)	37
Tabelle 6:	Quantität und Reinheit der mittels HPLC getrennten Enantiomere	45
Tabelle 7:	Elutionsfolgenvergleich: HPLC-Enantiomerentrennungen auf einer 250 x 8 mm unvollständig oder permethylierten- b -CD-Phase, GC-Enantiomerentrennungen auf einer 15 m langen 2,3-Me-6-TBDMS- b -CD -Säule (20% in SE 52)	47
Tabelle 8:	Mit der 15 m langen mit der chiralen 2,3-Me-6-TBDMS- b -CD-Phase (20% in SE 52) belegten Säule gaschromatographisch getrennte PCB-Metaboliten	47
Tabelle 9:	Mit der 25 m langen mit der chiralen 2,3-Me-6-TBDMS- b -CD-Phase (50% in OV 1701) belegten Säule gaschromatographisch getrennte PCB im Überblick)	48
Tabelle 10:	Vergleich der Enantiomerentrennungen zwischen GC (15 m 2,3-Me-6-TBDMS- b -CD-Säule (20% in SE 52)) und HPLC (250 x 8 mm, unvollständig und permethylierte b -CD-Säulen)	49
Tabelle 11:	Polarimetrische Bestimmung der Drehrichtung von MeSO ₂ -PCB-Enantiomeren	50
Tabelle 12:	Übersicht und Zuordnung der R- und S-Konfigurationen der MeSO ₂ -PCB zu den Elutionsreihenfolgen der Enantiomere für die unvollständig und die permethylierte b -CD-HPLC-Säulen und die 2,3-Me-6-TBDMS- b -GC-Säule (20% in SE 52)	62

<i>Tabelle 13: Wiederfindungsraten (WFR) der PCB-Kongenere und MeSO₂-PCB (n= 3) für die Gesamtmethode, Bestimmungs (BG)- und Nachweisgrenzen (NG), sowie Retentionszeiten und für GC-MS/EI-Quantifizierung verwendete Ionen</i>	78
<i>Tabelle 14: Alle Bestimmungs (BG)- und Nachweisgrenzen (NG) der GC-ECD, GC-MS NCI und GC-MS EI-Messungen zur Bestimmung der MeSO₂-PCB im Überblick</i>	79
<i>Tabelle 15: Ergebnisse einer vergleichenden Untersuchung zweier Biotaprogen mit dem Veterinärinstitut in Prag und dem NILU in Tromsø</i>	81
<i>Tabelle 16: Wiederholbarkeit der Methode (n=4) anhand der Ermittlung des Mittelwertes (MW), der Standardabweichung (STABWN) und der prozentualen Abweichung (Abw.)</i>	83
<i>Tabelle 17: PCB-Konzentrationen in Leber, Lunge und Fettgewebe in Rehen (n=6), Wildschweinen (n=5) und Füchsen (n=3; nur Leber und Lunge)</i>	85
<i>Tabelle 18: PCB-Konzentrationen im Fettgewebe von Humanproben (n =11) und einer Pelikanprobe</i>	88
<i>Tabelle 19: Konzentrationen atropisomerer MeSO₂-PCB im Fettgewebe von Humanproben (n =11) und einer Pelikanprobe</i>	89
<i>Tabelle 20: Enantiomerenverhältnisse (ER= <i>erstelulierendes Enantiomer</i>/ <i>zweitelulierendes Enantiomer</i> = a/b) von MeSO₂-PCB in der Pelikanprobe</i>	89
<i>Tabelle 21: Verwendete Chemikalien</i>	112

1. Einleitung

1.1. PCB in der Umwelt

Einst stellte Wladimir Schatalow, ein russischer Kosmonaut fest: „Wir blicken zum Himmel auf, und er scheint unendlich zu sein. Wir atmen, ohne uns dessen bewußt zu sein, als sei das selbstverständlich. Ohne nachzudenken reden wir immer wieder vom endlosen Luftmeer. Aber dann setzt du dich in ein Raumschiff, wirst von der Erde losgerissen, und binnen zehn Minuten stößt du durch die Luftschicht, hinter der das Nichts ist: Leere, Kälte, Dunkelheit. Der unermeßliche blaue Ozean des Himmels, der uns das Atmen ermöglicht und vor abgründiger Weite und Tod schützt, hat sich als ein ganz zartes Häutchen erwiesen. Wie verhängnisvoll ist es, diese zarte Schutzhülle des Lebens auch nur im geringsten zu schädigen!“^[1] So konnten Wetter- und Umweltsatelliten erstmals um 1987 Hinweise auf die Existenz eines Ozonlochs erlangen, welches durch die bis dato sorglos verwendeten Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKW) verursacht wurde und wird. Kennzeichnend für die halogenierten Kohlenwasserstoffe, also auch für die Polychlorierten Biphenyle (PCB), ist die hohe Persistenz, so daß sie, einmal in die Umwelt gelangt, nach Jahren und Jahrzehnten noch eine beträchtliche Schadwirkung entfalten können.

1.1.1. PCB-Produktion

Diese weitreichenden Konsequenzen dürften O. Döbner 1876 nicht bewußt gewesen sein, als ihm durch Destillation von Dioxydiphenyl mit einem „Chlorphosphor“ die erstmalige Synthese eines Dichlorbiphenyls gelang.^[2]

Aufgrund der vielen Vorteile, die PCB in der technischen Anwendung bieten, wurde die großtechnische Produktion von PCB etwa 1930 aufgenommen.^[3] Die PCB-Herstellung erfolgt über die Chlorierung der bei der Destillation von Steinkohleteer anfallenden Biphenyle. Technische Gemische werden über den Chlorgehalt nach Gewichtsprozenten klassifiziert. Sie wurden von den Herstellern Bayer (Bundesrepublik Deutschland) unter den Namen Chlophen, von Monsanto (USA) als Aroclor, von Kanegafuchi (Japan) als Kanechlor, von Mitsubishi (Japan) als Santotherm, sowie von Prodolec (Frankreich) als Phenochlor und Pyralen hergestellt und vertrieben. Der Marktführer mit 98 % Marktanteil auf dem wichtigen US-Markt war unangefochten

Monsanto, deren Produktpalette von Aroclor 1232 bis Aroclor 1260 reichte. Die letzten beiden Ziffern der Aroclor-Produkte geben, mit Ausnahme des Aroclor 1016 (41% Chlorgehalt nach Gewichtsprozenten), den Chlorgehalt nach Gewichtsprozenten an.^[4]

1.1.2. Chemische und physikalische Eigenschaften der PCB

Zu den positiven chemischen und physikalischen Eigenschaften der PCB in der technischen Anwendung zählen^[4,5]:

- Hohe Hitzestabilität und damit schwere Entflammbarkeit
- Hoher Flammpunkt: 443-653 K
- Relativ beständig gegen Säuren, Laugen und andere Chemikalien
- Stabil gegen Oxidation und Hydrolyse in technischen Systemen
- Geringe Wasserlöslichkeit (0,1-7000 µg/L), aber gute Löslichkeit in unpolaren organischen Lösemitteln und auch in Fetten
- Niedriger Dampfdruck
- Sehr gute Wärmeleitfähigkeit
- Sehr geringe elektrische Leitfähigkeit (gute Isolatoren)
- Nicht explosiv
- Flüssig bei Raumtemperatur, Dichte ρ : 1,182-1,0566 g/cm³ bei Raumtemperatur

1.1.3. Klassifizierung und technische Anwendung von PCB

Insgesamt gibt es 209 verschiedenen PCB-Kongeneren, die sich durch Zahl und Stellung der Chloratome im Biphenylmolekül unterscheiden. Die PCB werden nach einer Nomenklatur von Ballschmiter und Zell klassifiziert,^[6,7] welche später von der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) übernommen wurde:

Tabelle 1: *Summenformeln, Nomenklatur, Isomerenverteilung auf die PCB-Homologen sowie deren Chlorierungsgrad (in %)*

Summenformel	PCB-homologe	Anzahl der Isomere	IUPAC-Nomenklatur	% Chlor
$C_{12}H_9Cl$	Mono	3	1-3	18,79
$C_{12}H_8Cl_2$	Di	12	4-15	31,77
$C_{12}H_7Cl_3$	Tri	24	16-39	41,30
$C_{12}H_6Cl_4$	Tetra	42	40-81	48,56
$C_{12}H_5Cl_5$	Penta	46	82-127	54,30
$C_{12}H_4Cl_6$	Hexa	42	128-169	58,93
$C_{12}H_3Cl_7$	Hepta	24	170-193	62,77
$C_{12}H_2Cl_8$	Octa	12	194-205	65,98
$C_{12}HCl_9$	Nona	3	206-208	68,73
$C_{12}Cl_{10}$	Deca	1	209	71,10

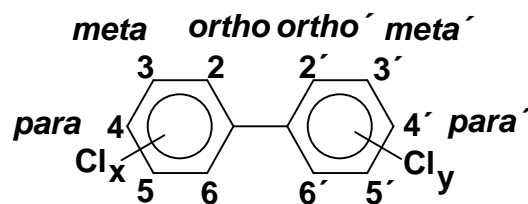


Abb. 1: Chemische Struktur von PCB

Aufgrund dieser vorteilhaften chemischen und physikalischen Eigenschaften ergeben sich viele Einsatzgebiete für PCB. Hierbei wird die Anwendung in „offenen“, d.h. umweltzugänglichen und „geschlossenen“ Systemen unterschieden. Theoretisch zeichnen sich „geschlossene“ Systeme dadurch aus, daß die PCB der Umwelt nicht zugänglich sind, aber in

der Praxis kommt es immer wieder durch Leckagen, Unfälle und illegale Deponierung zu beträchtlichen PCB-Emissionen in die Umwelt.

In offenen Systemen wurden PCB u.a. als Schmiermittel in Getriebeölen und Schraubenfetten, als Imprägnier- und Flammschutzmittel für Holz, Papier, Stoffe und Leder, zur Beschichtung von Transparent- und Durchschlagpapier, als Weichmacher in Kunststoffen, als Zusatzmittel in Klebstoffen, Dichtungsmassen und Fugenkitten, als Dispergiermittel in Druckfarbe und als Bestandteil von Antifoulingfarbe eingesetzt.^[8]

In geschlossenen Systemen wurden PCB als Zusatzdielektrikum für Kondensatoren, als Isolier- und Kühlflüssigkeit für Transformatoren, als Hydraulik-Flüssigkeit, in Hochdruckpumpen und automatischen Getrieben, vor allem im Bergbau eingesetzt.^[4,9]

So wurden z.B. 1974 in der Bundesrepublik Deutschland 1075 t PCB in Kondensatoren, 1130 t PCB in Transformatoren und 871 t PCB im Kohlebergbau eingesetzt. Der Anteil der verwendeten PCB sank bei Transformatoren und Kondensatoren kontinuierlich, so daß 1984 keine PCB in diesen „geschlossenen“ Anwendungen mehr verwendet wurden. Im Bergbau hingegen wurden 1984 immer noch 607 t eingesetzt. Insgesamt wurden in diesem Zeitraum in der Bundesrepublik Deutschland 23269 t PCB in diesen Bereichen eingesetzt. Dabei wurden zunehmend die höher- von den niederchlorierten PCB substituiert.

1972 schränkte Bayer die Lieferung von PCB auf den Gebrauch in „geschlossenen“ Systemen ein. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden etwa 23000 t PCB in „offenen“ Systemen verwendet.

1.1.4. Unfälle in der Umwelt mit PCB: Yusho und Yu Sheng

PCB wurden 1968 in das grelle Licht der Öffentlichkeit gerückt, als es in einer Lebensmittelfabrik in Japan ein Leck im Kühlsystem gab. Dabei kontaminierte das geruch-, farb- und geschmacklose PCB zunächst unbemerkt einen Reisöltank. Das kontaminierte Reisöl gelangte in den Verkauf, erreichte die Geschäfte und vergiftete etwa 14000 - 15000 Personen. Durchschnittlich nahmen die Menschen über einen Zeitraum von 6 Monaten 1,2 g Kanechlor 400 (41 % Chlorgehalt nach Gewichtsprozenten) auf. Dies führte zu Symptomen wie Lidschwellungen, Vergrößerungen und starker Sekretion der Meibom-Drüsen, Chlorakne, Sehstörungen, Taubheit in den Gliedmaßen, Schwäche und Müdigkeit. Verzögert kamen Blindheit, Hyperkeratose und deutliche Pigmentierung durch Akkumulation von Melanin in den Basalzellen der Epidermis, Gelbsucht, Diarrhoe, Veränderungen des Menstruationszyklus, Neuropathien, Kopfschmerz und Haarausfall. Die Symptome wurden weltweit als Yusho-Krankheit bekannt. Bei Frauen, die während der Schwangerschaft von der Yusho-Krankheit betroffen waren, kam es zu Totgeburten. Bei Lebendgeburten kam es zur

Hyperpigmentierung der Mund- und Schleimhaut, hyperplastische Veränderungen des Zahnfleisches, abnorme Verkalkung der Schädelknochen und deutlichem Untergewicht. Die als „fetales PCB-Syndrom“ umschriebenen Störungen wurden auf PCB-verursachte Beeinträchtigungen des Sexualhormon und Calciumhaushaltes zurückgeführt. Bis 1983 starben 120 Yusho-Patienten, 41 davon an Krebs. Am häufigsten betroffen war Lunge, Leber und Magen.

Die hinsichtlich der PCB-Problematik erwachte Öffentlichkeit wurde 1979 erneut durch kontaminiertes Reisöl, diesmal in Taiwan, erschüttert. Ein Gemisch aus Kanechlor 300 und 400 trat aus einem Gerät aus, welches in der Reisölproduktion verwendet wurde. Etwa 2000 Menschen waren diesmal betroffen, die Symptome ähnlich denen der Yusho-Krankheit. Die „Reisölkrankheit“ ging diesmal unter dem chinesischen Begriff Yu Sheng in die Geschichte ein und forderte bis Ende Februar 1983 24 Todesopfer.^[10-12]

1.1.5. Eintragsquantitäten von PCB in die Umwelt

Aber auch schon vorher, nämlich 1966 wurden von Jensen die persistenten PCB erstmalig in Umweltproben entdeckt.^[13] Dieser Befund war für viele Fachleute zunächst erstaunlich, hatte man doch in dem Glauben gelebt, daß die chemisch relativ inerten PCB, wenn sie in die Umwelt gelangen, erst über limnische Systeme transportiert werden, um dann einfach auf dem Grund der Ozeane zu sedimentieren. In der Tat werden PCB zwar auch auf diese Art und Weise transportiert, aber ihr Verhalten in der Umwelt gestaltet sich komplexer. So schätzten Tanabe und Tatsukawa in einer 1986 veröffentlichten Studie, daß 19 % (entspricht 230.000 t) der weltweiten PCB-Produktion in die Ozeane gelangt ist, von denen sich 99 % im Wasser befinden. Außerdem sollen sich 790 t in der offenen Ozean-Atmosphäre aufhalten. Demzufolge wird also nur ein verschwindend geringer Anteil sedimentiert.^[14]

Insgesamt wird die weltweite Produktion auf 1,2-1,5 Mio. t PCB geschätzt.^[14-16] Geht man von einer weltweiten Produktion von 1,2 Mio. t PCB aus, sind bereits etwa 30 % (400 000 t) in die Umwelt gelangt, 800 000 t PCB sind entweder noch in Gebrauch oder schon deponiert. Von den Deponien können die PCB nur durch Verdampfen entweichen. Etwa 4800 t PCB entweichen so jährlich in die Atmosphäre, dort verweilen sie mit einer Aufenthaltsdauer von 60 Tagen. Danach werden sie irreversibel in Ozeane transferiert.^[14]

Aber auch durch Leckagen in „geschlossenen“ Systemen, bei der Verbrennung in Hausmüllöfen unter 1273 K, der unsachgemäßen Entsorgung PCB-haltiger Altgeräte oder zuweilen auch einfach dadurch, „daß eine Handvoll Arbeiter“ in der kanadischen Arktis „altes Transformatorenöl“ verbrennt, können PCB in Gegenwart und Zukunft in die Umwelt gelangen.^[17,18]

1.1.6. Bestimmung des Umweltverhaltens von PCB durch physikochemische Parameter

Erklären lässt sich das Verhalten der PCB in der Umwelt recht umfassend anhand physikochemischer Parameter. Verglichen mit anderen Chemikalien haben PCB einen hohen *n*-Octanol-Wasser Verteilungskoeffizienten (K_{ow}), der üblicherweise als $\log K_{ow}$ -Wert angegeben wird und bei PCB zwischen 3,79 (PCB 1) und 8,23 (PCB 209) liegt.^[19] In der Konsequenz werden PCB an unpolaren Flächen adsorbiert und in lipophilen Matrices akkumuliert.

Ein weiterer wichtiger Parameter ist der nach dem Henryschem Gesetz ermittelbare temperaturabhängige Dampfdruck (p_B). Das Henrysche Gesetz gilt für reale Lösungen mit geringer Konzentration des gelösten Stoffes:^[20]

(Gleichung 1) $p_B = x_B K_B$

mit x_B : Molenbruch des gelösten Stoffes

K_B : Henry-Konstante [Pa]

So ist der Dampfdruck tri- und tetrachlorierter Biphenyle größer als 1×10^{-2} Pa, während die höherchlorierten hexa- und heptachlorierten Biphenyle einen um eine Größenordnung niedriger liegenden Dampfdruck haben.^[21] Demzufolge sollten theoretisch überwiegend niederchlorierte PCB in der Atmosphäre zu finden sein. Diese Tendenz wird auch in einer Studie über den Gehalt verschiedener PCB-Kongeneren in der Umgebungsluft in Augsburg bestätigt.^[5]

Die Verfrachtung der PCB erfolgt hauptsächlich über den gasförmigen Zustand oder über die Adsorption an Aerosole.^[22] Durch den marinen und atmosphärischen Transport werden die PCB global, auch in die entlegensten Gebiete, verteilt. Die chlororganischen Substanzen steigen in den wärmeren Regionen auf und kondensieren schließlich an den Polen, die die Senken für diese Substanzen bilden.^[23,24]

1.1.7. Biotransformation von PCB durch Bakterien

Zu einem geringen Anteil können PCB auch in der Umwelt abgebaut werden. Bakterien wie z.B. *Alcaligenes* oder *Acetivobacter* können vor allem niederchlorierte PCB zu einer Chlorbenzolcarbonsäure metabolisieren. Aber auch andere Oxydationsprodukte können entstehen. So bildet das Bakterium *Rhizopus Japonicus* hydroxylierte Metabolisierungsprodukte.

Steigt der Chlorierungsgrad, geht die Metabolisierungsrate in den meisten Fällen drastisch zurück. Nicht nur ein hoher Chlorierungsgrad, sondern auch die Position der Chloratome kann die Metabolisierung erschweren oder gänzlich verhindern. PCB mit zwei Chloratomen in *ortho*-Position zeigen eine hohe Resistenz gegenüber der Biotransformation. Wenn sich alle Chloratome an einem Phenylring oder in der 2,3-Position befinden, wird der mikrobielle Abbau erleichtert.^[25,26]

Häufig wird von den Laborbedingungen, unter denen den Bakterien nur PCB-haltige Lösungen als alleinige Nahrung angeboten werden, auf Umweltbedingungen geschlossen. Nicht selten zeigten sich Chlororganika unter Laborbedingungen abbaubar, während „überraschend“ hohe Konzentrationen dieser Schadstoffe in der Umwelt gefunden wurden. Hierbei wurde nicht berücksichtigt, daß Bakterien in der Umwelt in der Regel ein reichhaltiges Angebot an leichter zugänglichen Kohlenwasserstoffen vorfinden und deshalb die schwer metabolisierbaren Chlororganika häufig verschmähen (Marzipan-Effekt). Ferner können Matrixeffekte, z.B. Komplexierung mit Huminstoffen zu einer partiellen „Maskierung“ und damit erschwerten Transformation führen.

1.1.8. Bioakkumulation

Sehr umfangreiche Untersuchungen wurden bisher auf dem Gebiet der Bioakkumulierbarkeit der lipophilen PCB in verschiedenen Biota vorgenommen. In nahezu allen Kompartimenten wurden sie gefunden. Auf verschiedenen Wegen können PCB aufgenommen werden. Pflanzen können in gewissem Maße PCB absorbieren bzw. an den Blättern und Wurzeln adsorbieren.^[27] Terrestrische und marine Lebewesen werden überwiegend (90 %-95 %) durch Aufnahme von lipidreicher (*gr.*: *lipos* = Fett) Nahrung mit PCB belastet. Dabei ist es naheliegend, daß Herbivore geringer belastet werden als Carnivore und bei den letzteren diejenigen am stärksten, die am oberen Ende der trophischen Stufen stehen. So war z.B. in einer Studie von Letcher die Biokonzentration von Polarbären (*Ursus maritimus*) mit PCB am stärksten, gefolgt von Seehunden (*Poca hispida*) und arktischem Lachs (*Boreogadus saida*), gemäß der Rangfolge des arktischen Nahrungsnetzes.^[28] Ein weiterer Aufnahmepfad von PCB ist die Weitergabe an Schadstoffen über die Muttermilch.

Obwohl PCB seit 1983 in der Bundesrepublik Deutschland nicht mehr hergestellt und bereits 1978 die Anwendung auf „geschlossene Systeme“ beschränkt wurde, nimmt die Belastung der persistenten PCB z.B. in Muttermilch nur sehr langsam ab (**Abb. 2**). Erst 1989 erließ der Gesetzgeber eine Verbotsverordnung, die das Inverkehrbringen und Verwenden von PCB untersagte.^[29] Im Yusho-geschädigten Japan reagierte man bereits 1972 mit dem Verbot von Verwendung, Herstellung und Import von PCB. Die USA folgten den Japanern 1977 mit dem Verbot der Herstellung von PCB. Rätselhaft bleibt, warum der deutsche Gesetzgeber mit einer derartigen Verzögerung auf die PCB-Problematik reagiert hat.

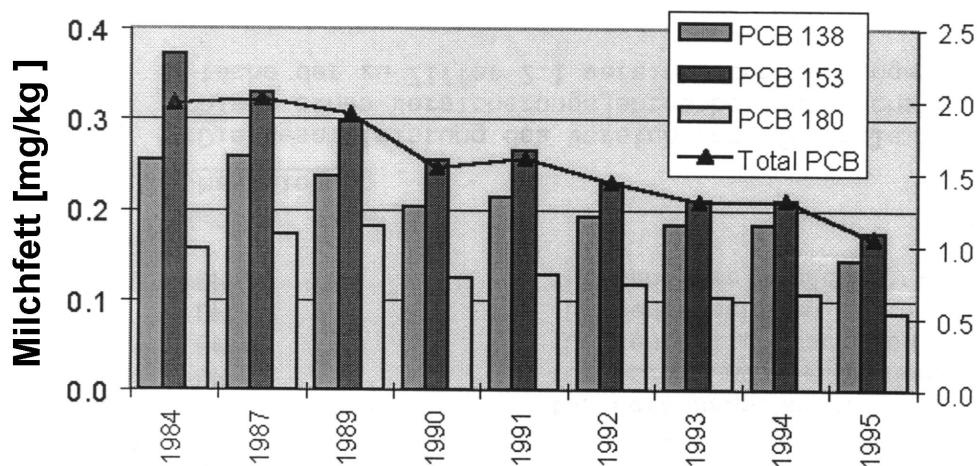


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf des PCB-Gehaltes in Muttermilch in Deutschland ^[30]

Ein Nebenaufnahmepfad ist die Absorption von PCB durch die Lunge oder Epidermis bei terrestrischen Lebewesen. Analoges gilt für die Kiemen oder Haut bei marinen Lebewesen. Für den Menschen ist die Aufnahme von PCB aus der Atmosphäre hauptsächlich in PCB-belasteten Innenräumen von Bedeutung.

In **Tabelle 2** sind einige durchschnittliche PCB-Belastungen für verschiedene Kompartimente enthalten.^[31] Deutlich wird noch einmal die ubiquitäre Verteilung und das Biokonzentrationsverhalten der persistenten PCB. Der Mensch als Endglied des Nahrungsnetzes ist von den PCB in besonderem Maße betroffen, wie die Belastung der Muttermilch zeigt.^[32] Spitzenwerte wurden im Fettgewebe der Inuit-Bevölkerung mit 2000 µg/kg Fett für das Kongener 153 oder 17 mg/kg für die gesamten Kongenere gefunden. In den Leberproben wurden Gesamtbelastungen von 12,2 mg/kg Fett und in Gehirnprouben 2,0 mg/kg Fett gefunden.^[33]

Tabelle 2: Durchschnittliche Kontamination durch PCB^[31]

Kompartiment	Konzentration
Luft (Bundesrepublik Deutschland)	5-30 ng/m ³
Trinkwasser	2-10 ng/L
Flüsse und Seen	10-100 ng/L
Süßwasserfische	1-20 mg/kg
Greif- und Seevögel (Fett)	50-1000 mg/kg
Sedimente und Böden	0,1-1 mg/kg
Pflanzenmaterial	5-15 µg/kg
Nutztiere (Fett)	150-200 µg/kg
Milchfett (Kuh)	50-150 µg/kg
Muttermilchfett	um 0,4-2 mg/kg

Keineswegs sind PCB heutzutage aus der Umwelt verschwunden, wie aktuelle Forschungsergebnisse von Luft, Sedimenten und Biota beweisen.^[34-36] So steht zu befürchten, daß PCB bis auf weiteres problematischer Bestandteil des Umweltkreislaufs bleiben werden.

1.2. Aufnahme und Verteilung von PCB im Körper

Nach der oralen Aufnahme gelangen die PCB zusammen mit Fetten nahezu unverändert in den Magen- und Darmtrakt. Die PCB werden in ein lipophiles Milieu eingebettet (sog. Kohlenwasserstoff-Kontinuum) und erreichen so schließlich das absorbierende Dünndarmepithel. Die hydrophoben PCB werden in den Darmmukosa-Zellen an Lipoproteine wie Chylomikronen, Albumin oder LDL (*low-density-lipoprotein*)-Proteine assoziiert, welche dann als Transportproteine fungieren.^[37]

Nach Erreichen des Extrazellulärraums und der Passage der Darmlymphe erreichen die Assoziante schließlich das Blutplasma. Von dort wird das innerhalb des Transportmediums Blut an die Transportproteine assoziierte PCB-Molekül zur Pfortader transportiert, weiter über die Leber zu allen anderen Organen, dem ZNS und alle weiteren Geweben des Körpers.^[38]

Da die Biotransformationsrate des hochchlorierten 2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorbiphenyls (PCB 180) mit 5 % im Vergleich zum monochlorierten 4-Chlorbiphenyl (96-97 %) sehr gering ist, wurde es für einen Langzeit-Fütterungsversuch einer Ratte verwendet, um die Bioakkumulierbarkeit des Mutter-PCBs zu ermitteln. Die Tendenz der hohen Biotransformationsrate von niederchlorierten PCB wurde in einem Human-Versuch mit einem freiwilligen Probanden bestätigt.^[39] Die höchsten Konzentrationen der mit PCB 180 über zwei Monate gefütterten Ratte wurden im Fettgewebe und in absteigender Reihenfolge, gefolgt von Trachea, Leber, Milz, zentralem Nervensystem (ZNS), Lunge und Blut gefunden.^[10] Daraus ist ersichtlich, dass die größte Quantität der PCB in den Fettzellen immobilisiert wird. Im Fettgewebe wurden etwa 1000 µg/kg Körpergewicht PCB 180 gefunden, während die nächst niedrigere Belastung in der Trachea unter 10% der Belastung des Fettgewebes lag. Allerdings ist die hohe Belastung der Trachea wohl eher auf die hohen oralen Aufnahmekonzentrationen des PCB 180 zurückzuführen und demzufolge eher kein Spiegel natürlicher Belastungspfade.

1.2.1. Aufnahme eines PCB-Lipoprotein-Assoziats in die Zelle

Am Beispiel eines Adipozyten im Fettgewebe sei die Aufnahme eines PCB-Chylomikron-Assoziats in die Zelle aufgezeigt. Die Aufnahme erfolgt durch transzelluläre Kanäle des Endotheliums zur Plasmamembran. Dort wird der Komplex via Endozytose durch die Plasmamembran in die Zelle aufgenommen (**Abb. 3-1**). Der Endozytose schließt sich intrazellulär die Entfernung des „Coats“ und die Fusion mit primären Lysosomen (**Abb. 3-2**), an, deren hydrolytische Enzyme dann die endozytierten Stoffe in den durch die Fusion entstandenen sekundären Lysosomen „verdauen“, was in diesem Fall die Freisetzung des PCBs zusammen mit Fettsäuren zur Folge hat. Nach der Metabolisierung des Proteins kann das PCB von den zahlreich vorhandenen Triglyceriden oder auch den Fettsäuren solubilisiert werden (**Abb. 3-3**). Das PCB verbleibt dort, bis das Fett mobilisiert wird.^[40]

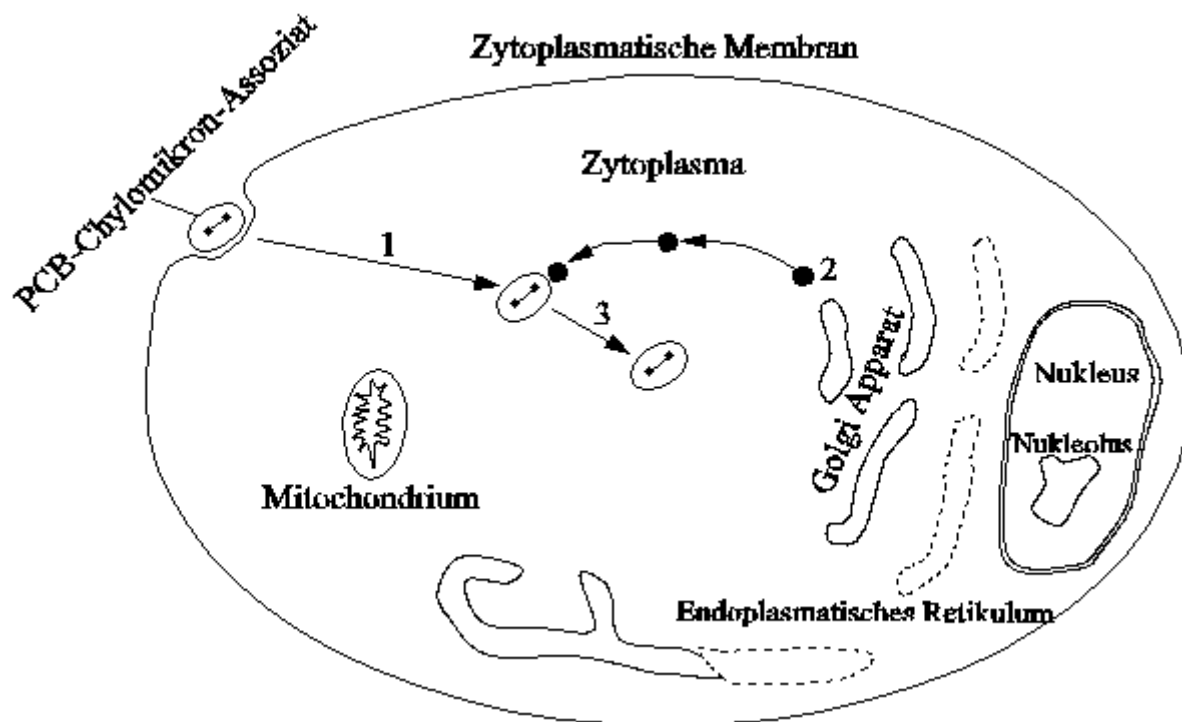


Abb. 3: Weg und Aufnahme eines PCB in einen Adipozyten: (1) Endozytose des PCB-Chylomikron-Assoziats. (2) Ein primäres Lysosom fusioniert mit dem PCB-Chylomikron-Assoziat. (3) Von Triglyceriden solubilisiertes PCB.

Die geschilderten Aufnahmemechanismen gelten für Zellen allgemein. Weitere Wege in der Zelle sind nach der Metabolisierung des Transportproteins, die Assoziation des PCB an verbliebene Proteinreste. Dieser Komplex kann seinerseits an das endoplasmatische Retikulum assoziieren oder auch in den Mitochondrien aufgenommen werden.

1.2.2. Eliminationsraten der PCB

Hunde schieden drei Tage nach intravenöser Injektion von radioaktiv markiertem PCB 153 3% mit dem Urin und 63% mit dem Kot aus. Dies Ergebnis zeigt, daß der überwiegende Anteil der Substanzen (Muttersubstanz, Metaboliten) den Organismus über den Darm verläßt. Die Geschwindigkeit der Ausscheidung wird durch die Elimination der PCB aus dem Fettgewebe und durch das Ausmaß ihrer metabolischen Umwandlung bestimmt.^[10] Bei der Analyse von Vollblut von Yu Sheng-Betroffenen im Zeitraum 1980-89 wurden Halbwertszeiten von 1,1-5,7 Jahren ermittelt. So verwundert es nicht, daß PCB in hohen Konzentrationen im Körper akkumuliert werden.^[10]

1.3. Toxikologie der PCB

Um die akute Toxizität der PCB beurteilen zu können, griff man auf die letale Dosis zurück, die bei 50 % der Versuchstiere zum Tod führt (LD_{50}). So lag der LD_{50} -Wert bei der oralen Gabe von Aroclor 1221 bei Ratten bei 4,25 g/kg Körpergewicht. Intoxikationserscheinungen waren Ulzerationen im Dünndarm und im Drüsenmagen. Eine einmalige orale Gabe von 50 mg/kg Körpergewicht Aroclor 1254 verursachte ebenfalls bei Ratten innerhalb von 12 Stunden Leberwachstum und eine Induktion hepatischer mikrosomaler Enzyme.^[10]

Bei Kaninchen wurden LD_{50} -Werte von 0,79 bis 3,17 g/kg Körpergewicht nach dermalen Auftragung von Aroclor 1221, 1242, 1248 und 1260 festgestellt. Nichtsdestotrotz liegt die mittlere tödliche Dosis von technischen PCB-Gemischen relativ hoch.^[10]

Nicht die akute, sondern die chronische Toxizität ist es, die zur weltweiten Ächtung von PCB geführt hat. Symptome chronischer Intoxikationen wurden bekannt, als Menschen in Japan und Taiwan hochgradig kontaminiertes Reisöl verzehrten. Unter dem Eindruck der Yu Sheng und Yusho-Opfer haben Wissenschaftler in zahlreichen Untersuchungen mit Versuchstieren versucht, näheres über die Intoxikation mit PCB herauszufinden.

Die meisten chronischen Studien wurden mit technischen PCB-Gemischen vorgenommen. Sie waren Grundlage bei der Ermittlung einer tolerablen PCB-Dosis für den Menschen. Ratten, denen über eine Periode von acht Monaten Aroclor 1254 und 1260 im Futter in unterschiedlichen Konzentrationen von 1,5-72 mg/kg Körpergewicht verabreicht wurde, zeigten einen dosisabhängigen Anstieg des relativen Lebergewichtes und vergrößerte Hepatozyten mit erhöhtem Lipidgehalt.^[10]

Ein breiteres Spektrum PCB induzierter Veränderungen wurde beim Rhesusaffen beobachtet. Nach über zweijähriger oraler Gabe von 0,28 mg/kg Körpergewicht fanden sich beim Rhesusaffen massive Veränderungen im Gewebe von Milz und Lymphknoten, Erosion und Ulzeration des Zahnfleisches, hypertrophe Gastrophatien mit cystischer Dilatation einzelner Drüsen, vergrößerte und nekrotische Hepatozyten, Hypertrophie des Gallengangepithels, Hyperplasie des Gallengangs, Hypertrophie des Gallenblasenepithels und ein nicht eindeutiger Anstieg der Zahl an Lysosomen in den follikulären Epithelzellen der Schilddrüse.^[10]

Der nach langfristiger Zufuhr beim Rhesusaffen ermittelte NOAEL-Wert (no observed adverse effect level) lag bei 0,8 mg/(kg*Tag) und der LOAEL-Wert (lowest observed adverse effect level) zwischen 0,1 und 0,2 mg/(kg*Tag)^[10]

1.3.1. Strukturspezifische Toxikologie

Die toxikologische Wirkung der PCB ist sehr stark von der Struktur der einzelnen Kongenere abhängig. Gemeinsam haben alle Kongenere, daß sie ein Cytochrom-P450-abhängiges Monooxygenase-System, besonders nach längerfristiger Aufnahme von PCB, induzieren können.

Die erste Klasse bilden die dem 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (sog. „Seveso-Dioxin“ oder 2,3,7,8-TCDD) strukturähnlichen planaren PCB 126, 169, 77, die das mikrosomale Monooxygenase-System Cytochrom P450 1A1 und 1A2 (ältere Nomenklatur: Cytochrom P-448-abhängige Arylhydrocarbon-Hydroxylase) auf folgende Weise induzieren: Im Zellinnern existiert ein Ah-Rezeptor, der normalerweise an ein „Heat-Shock-Protein“ (hsp 90) gebunden ist (**Abb. 4-A**). Wenn der Induktor an den Ah-Rezeptor bindet, dissoziiert das hsp 90 ab (**Abb. 4-B**). Sehr häufig handelt es sich bei dem Induktor schon um das Xenobiotikum selbst, so daß das Xenobiotikum seinen eigenen Metabolismus induziert (Autoinduktion) (**Abb. 4-C**).

Der Induktor-Rezeptor-Komplex bindet an den Ah-Rezeptor nukleärer Translocator (ARNT) (**Abb. 4-D**) und gelangt durch Translokation in den Nucleus (**Abb. 4-E**). Dort wird das Hetero-Dimer an bestimmte Stellen der nukleolären DNA, der „Xenobiotika Responsive-Enhancer“, XRE assoziiert (**Abb. 4-F**). Durch Bindung des Induktor-Ah-Rezeptor-Komplexes an die n-DNA wird die Transkription der nachfolgenden Strukturgene aktiviert (**Abb. 4-G**). Translation der messenger-RNAs (m-RNAs) bewirkt die Genexpression von CYP1A1 (**Abb. 4-H**). Dadurch kommt es zur „echten“, d.h. auf Aktivierung der Transkription beruhenden Enzyminduktion.

Nicht jeder Induktor des MC-3 (3-Methylcholanthren) Typs kann jedes Enzym der Ah-Gen Batterie gleichermaßen induzieren.^[41] Der Ah-Rezeptor besitzt Bindungsstellen für große planare hydrophobe Liganden. Eine der Bindungsstellen ist 1,0 x 0,7 nm und hat etwa die Abmessungen von „Dioxin“. Die andere ist 1,4 x 0,7 nm groß, so daß 3-Methylcholanthren hineinpaßt.^[10,42]

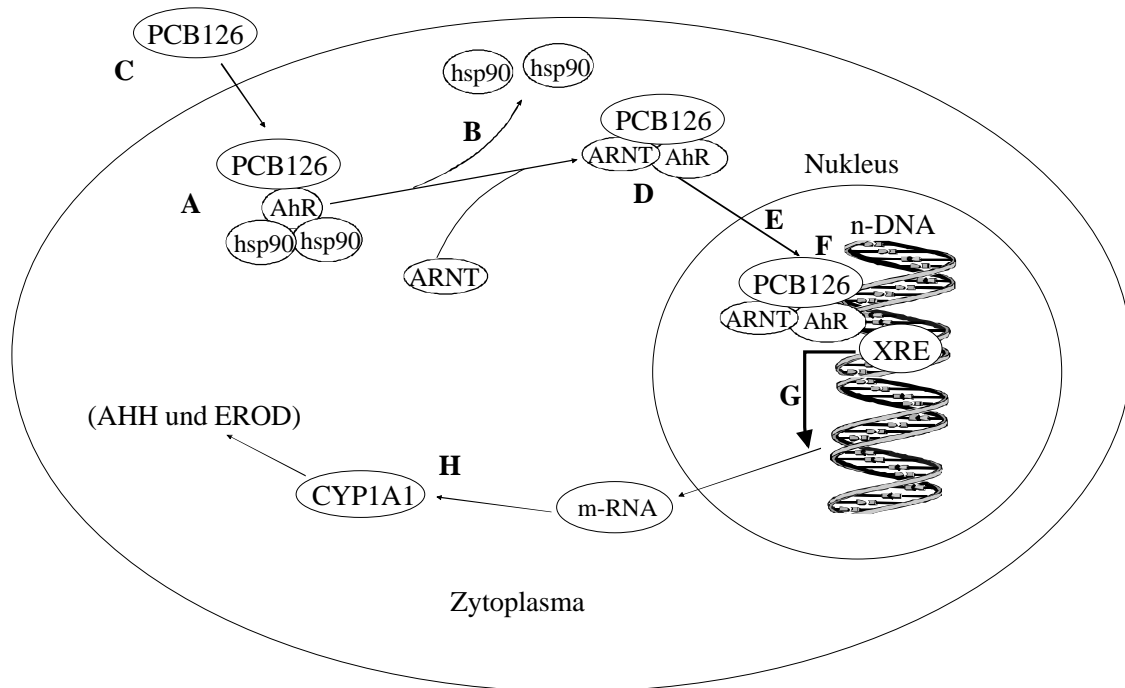
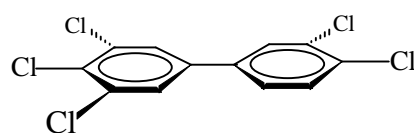
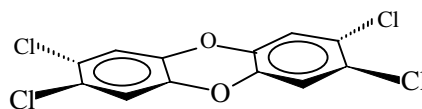


Abb. 4 : Molekularer Mechanismus der Induktion von CYP1A1 durch Genexpression am Beispiel des PCB 126

Die PCB dieser Klasse weisen zwei Chlorsubstituenten in beiden *para*-Positionen und mindestens zwei Chlorsubstituenten in den *meta*-Positionen auf. Wegen der Abwesenheit von Chlorsubstituenten in *ortho*-Position werden diese Kongenere auch als koplanare oder als non-*ortho* PCB bezeichnet. **Abb. 5** verdeutlicht die Strukturen am Beispiel des PCB 126, dem wirksamsten Kongener der non-*ortho* PCB im Vergleich zum ebenfalls koplanaren 2,3,7,8-TCDD.



PCB 126

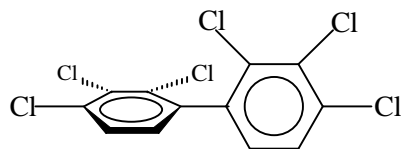


2,3,7,8-TCDD

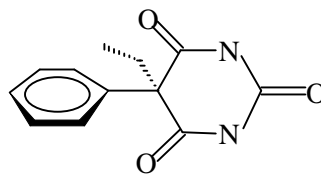
Abb. 5: Strukturvergleich von 3,3',4,4',5-Pentachlorbiphenyl (PCB 126, oben) und 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD, unten)

Die toxikologische Folge in der Gabe von unterschiedlichen Konzentrationen des planaren PCB 126 an schwangere Ratten, äußerte sich bei dem Nachwuchs überwiegend in starken Deformationen der Genitalien. Vermutlich wurden die Deformationen durch den Ah-Rezeptor-Signal-Pfad ausgelöst.^[43]

Zur zweiten Klasse gehören Kongenere mit mindestens zwei Chlorsubstituenten in *ortho*-Position. Sie induzieren das gleiche Cytochrom-P450 2B1 (ältere Nomenklatur: Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen), wie das als Antiepileptikum eingesetzte Barbiturat Phenobarbital.^[44] In diesem Fall ist die strukturelle Ähnlichkeit aufgrund der Ethyl-Gruppe des Phenobarbitals nicht ganz so offensichtlich, aber dennoch gegeben, wie in **Abb.6** visualisiert wird. Kongenere wie die PCB 128, 153, 155, 180, 149, 132 und weitere gehören zu dieser Klasse.



PCB 128



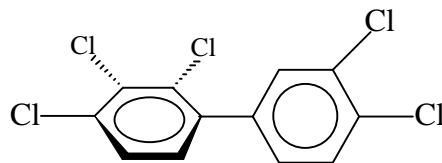
Phenobarbital

Abb. 6: Strukturvergleich von 2,2',3,3',4,4'-Hexachlorbiphenyl (PCB 128, oben) und Phenobarbital (unten)

Jahrelang glaubte man, daß mit den „Dioxin“-ähnlichen koplanaren PCB die Toxizität der PCB vollständig erfaßt wurde. Doch neuere Erkenntnisse belegen, daß vor allem die *ortho*-substituierten PCB in die Ca^{2+} -vermittelte Signalübertragung in Lymphozyten, neuronalen Zellen und Muskelzellen eingreifen können, also neuro- und immunotoxisch wirken können.^[45-47]

Die dritte Klasse bilden die Kongenere, die nicht symmetrisch an beiden Ringen substituiert sind, nur einen Chlorsubstituenten in *ortho*-Stellung und an beiden Ringen vicinal in *meta*- und *para*-Stellung weitere Chloratome aufweisen. Sie induzieren sowohl Cytochrom P450 1A1 und 1A2 als auch Cytochrom P-450 2B1 und werden als *mixed type inducer*

bezeichnet. Dazu zählen die PCB 105 und 118. Zur Veranschaulichung ist das PCB 105 in **Abb. 7** dargestellt.



PCB 105

Abb. 7: 2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl (PCB 105), ein *mixed type inducer*

Die toxischen Effekte der koplanaren und der annähernd koplanaren PCB und des 2,3,7,8-TCDD werden auf deren Bindung an den cytosolischen Ah(Arylhydrocarbon)-Rezeptor zurückgeführt. Der Ligand-Rezeptor-Komplex verursacht im Zellkern durch seine Wechselwirkungen mit speziellen DNA-Sequenzen, eine gesteigerte mRNA-Synthese, der im Cytosol eine dosisabhängige Induktion verschiedener Proteine insbesondere der Cytochrome P-450 1A1 und 1A2 folgt. Der Grad der Aktivierung wird in Immunoassays über die Arylhydrocarbon-Hydroxylase (AHH)-, die Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD)- oder die Ethoxycumarin-*O*-deethylase (ECOD)-Aktivität gemessen.^[48] Die Mindestdosis, um Cytochrome P-450 1A im Menschen zu induzieren, liegt bei >600 mg/kg; für PB-Typ-Induktoren deutlich niedriger bei >20mg/kg.^[49]

1.3.2. TEF-Konzept

Um die Toxizität technischer PCB-Mischungen beurteilen zu können, entwarf Safe 1990 ein System der toxischen Äquivalenzfaktoren (*toxic equivalency factors, abgekürzt TEF*). Die Toxizität der koplanaren oder annähernd koplanaren PCB sollte in Relation zu dem sehr giftigen „Seveso-Dioxin“, dem 2,3,7,8-TCDD gesetzt werden, welches eine maximale Ah-Rezeptor-Antwort aufweist und damit willkürlich den TEF-Wert von eins bekam.^[50] TEF-Werte der dioxinähnlichen PCB wurden in zahlreichen toxikologischen Untersuchungen ermittelt, sie reichen etwa von $1 \cdot 10^{-6}$ (PCB 167) bis 0,1 (PCB 126). Besondere Beachtung haben dabei die non-*ortho*-PCB (77,126 und 169) gefunden, denen die höchsten TEF-Werte zugeschrieben werden.^[51] Durch Multiplikation der TEF-Werte mit der Konzentration des betreffenden Kongeners und Addition aller Produkte läßt sich das Gesamt-Toxizitätsäquivalent (Gesamt-TEQ) bestimmen. Dieser TEQ-Wert entspricht in seiner toxischen Wirkung dann der Äquivalenzkonzentration derselben Menge an 2,3,7,8-TCDD.^[52]

Allerdings ist das TEF-System nicht ohne Kritikpunkte geblieben. Es berücksichtigt nur dioxinähnliche toxikologische Effekte und nimmt eine Additivität der einzelnen TEQ-Werte

an, so daß also implizit auf ein Fehlen von Antagonismen und Synergismen der Schadstoffe untereinander geschlossen wird. Dieser Schluß scheint aus heutiger Sicht zu simplifizierend zu sein, da PCB-Kongeneren mit anderen PCB-Kongeneren oder auch mit anderen Schadstoffen antagonistisch oder synergistisch interagieren können.^[53-55]

Hauptsächlich werden die TEF-Werte aus verschiedenen (semi)-chronischen *in vivo*-Studien mit Säugetieren extrahiert und zu einem einzigen Wert zusammengefügt. Im wesentlichen wurden die TEF-Werte für die Risiko-Beurteilung von Schadstoffen für Menschen zitiert. Allerdings können sich speziell für Fische und Vögel ganz andere TEF-Werte ergeben, so daß die Extrapolation auf z.B. das aquatische Ökosystem zu einer eklatanten Fehleinschätzung der Gefährdungssituation führen kann. Von daher stellt die Einführung von ECOTEF-Werten in Kombination mit NOAEL- und LOAEL-Werten eine sinnvolle Ergänzung zu den TEF-Werten dar.^[56] Auch wiesen Hühnerfuss *et al.* bereits 1994 auf die Bedeutung eines erweiterten TEF-Systems hin, das neben den koplanaren auch die atropisomeren PCB erfassen sollte, die eine wichtige Rolle in der Umwelt spielen, aber bisher bei der Beurteilung der Toxizität nur unzureichend berücksichtigt worden sind.^[57]

1.4. Methylsulfonyl-PCB in der Umwelt

Erstmalig entdeckten Jensen *et al.* 1976 die Methylsulfonyl-PCB (MeSO₂-PCB) im Fett von Seehunden in der Ostsee.^[58] Ebenfalls 1976 wiesen Mio *et al.* Methylthio-PCB (MeS-PCB) und MeSO₂-PCB in, zuvor mit PCB 52 gefütterten, Mäusen nach.^[59] Das daraufhin erweckte Interesse, auch an MeSO₂-PCB, förderte in der Folgezeit zahlreiche neue Erkenntnisse über die Metaboliten in Umweltproben zu Tage. So fanden z.B. Haraguchi *et al.* 1986 MeSO₂-PCB ebenfalls in Gewebeproben von in schwedischen Küstengewässern lebenden Seehunden, aber auch in japanischen Humanproben.^[60,61] Damit war klar, daß diese Metaboliten in vielen Spezies vorkommen können.

Forschungsschwerpunkt bildeten die marinen Säugetiere, in denen teilweise Gesamt-PCB-Konzentrationen (nur Mutterverbindungen ohne Metaboliten) im zweistelligen µg/g extrahierbare organische Matrix (EOM)-Bereich gefunden wurden. Setzt man die summarischen MeSO₂-PCB-Konzentrationen in das Verhältnis zu den Gesamt-PCB-Konzentrationen, findet man speziesabhängig Werte von 2-20 % (**Tabelle 3**). Am umfangreichsten ist das Datenmaterial über die Untersuchungen von Polarbären (*Ursus maritimus*). Dort lag der Anteil an MeSO₂-PCB-Metaboliten um die 5 %.

Polarbären enthalten, verglichen mit ihrer Hauptnahrung den Seehunden (*Halichoerus grypus*), ein deutlich einfacheres Muster an PCB-Kongeneren. Daraus kann geschlossen werden, daß ein Teil der Metaboliten nicht aus der Nahrung stammt, sondern daß das

effiziente Enzymsystem der Polarbären für die Bildung von Metaboliten verantwortlich ist. Der größte Teil der Metaboliten in Polarbären stammt, Letcher *et al.* zufolge, jedoch aus der Nahrung.^[62] Diese These wird durch die Arbeit von Kato *et al.* unterstützt, in der Ratten verschiedene Dosen eines 3-MeSO₂-PCB verabreicht wurden und die hepatische Konzentration dieses Metaboliten nahezu dosisabhängig zunahm.^[63]

Deutliche Unterschiede zeigen sich zu den Vögeln, wie z.B. den Kormoranen (*Phalacroconax carbo*) und den Albatrossen (*Diomedea immutabilis*), in denen nur etwa 0,2 bis 0,3 % der Gesamt-PCB MeSO₂-PCB waren. Möglicherweise sind höhere Exkretionsraten oder aber eine geringere Bildung von MeSO₂-PCB dafür verantwortlich. Beachtenswert ist, daß bis zu etwa 50 % der Gesamt-PCB-Konzentration Hydroxy-PCB ausmachen.^[64] In **Tabelle 3** wurden jeweils die Durchschnittswerte mehrerer Untersuchungen zugrunde gelegt.^[65-71]

Tabelle 3: Speziesvergleich der MeSO₂-PCB im Verhältnis zu den Gesamt-PCB

Spezies	Organ/ Gewebe	ΣPCB [µg/g Fett]	ΣMeSO ₂ -PCB [µg /g Fett]	$\frac{\sum MeSO_2-PCB}{\sum PCB} \cdot 100$ in % (gerundet)
Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Fett	30,3	0,5	2
	Leber	12,9	0,7	5
	Lunge	9,3	0,7	7
Polarbär (<i>Ursus maritimus</i>)	Fett	5,7-15,9	0,3-0,7	4-5
	Leber	25,6	1,1	4
Belugawal (<i>Delphinapterus leucas</i>)	Fett	4,2-22,6	0,1-0,4	2-4
	Leber	8,0	1,0	13
Seehund (<i>Halichoerus grypus</i>)	Fett	28,0-790	2,7-3,4	2-10
Gestreifter Delphin (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	Fett	21,5	0,2	1
Otter (<i>Lutra lutra</i>)	Muskel	11,2	0,4	4
	Leber	67,6	13,5	20
Wilder Nerz (<i>Mustela vison</i>)	Muskel	20,5	0,2	1
	Leber	25,3	1,3	5
Kormoran (<i>Phalacroconax carbo</i>)	Fett	31,8	0,06	0,2
Albatros (<i>Diomedea immutabilis</i>)	Leber	3,3	0,01	0,3

Damit MeSO₂-PCB gebildet werden können, müssen sie einige strukturelle Voraussetzungen mitbringen: Das PCB muß an einem Phenylring in den 3,4- oder 4,5-Positionen vicinale Wasserstoffatome besitzen. Es kann in den 2,5- oder 2,5,6-Positionen über Chlorsubstituenten verfügen (**Abb. 8**).^[72-74] Umgekehrt formuliert, führt die Abwesenheit von 3,4- oder 4,5-vicinalen Wasserstoffatomen zu einer bevorzugten Akkumulation dieser PCB im Körper.^[75] Oftmals wird die 4'-Chlorsubstitution am zweiten Phenylring als weitere strukturelle Voraussetzung genannt. Allerdings ist fraglich, ob dieses ein notwendiges Kriterium darstellt, da auch einfache Chlorbenzole MeSO₂-PCB-Metaboliten bilden.^[76]

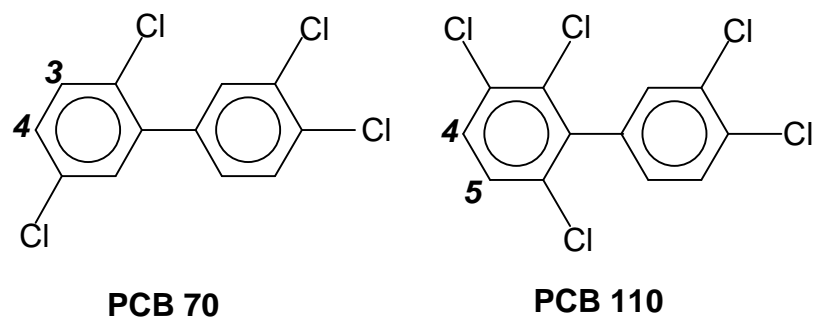


Abb. 8: PCB 70 und 105 mit notwendigem Substitutionsmuster zur Bildung von MeSO₂-PCB

Alle in **Tabelle 4** aufgeführten MeSO₂-PCB entsprechen den zuvor genannten strukturellen Mindestanforderungen. In verschiedenen Biota-Proben wurden bisher mindestens 28 verschiedene Kongenere nachgewiesen, davon sind zehn bei Raumtemperatur stabile chirale Kongenere.^[68] Zu beachten ist die durch Einführung einer Methylsulfonylgruppe bisweilen geänderte Priorität gemäß der IUPAC-Nomenklatur.

Tabelle 4: *In Biota nachgewiesene PCB, sowie deren MeSO₂-PCB-Metaboliten. (Chirale Kongenere sind **fett gedruckt**).*

Mutter-PCB (Ballschmitter- Nomenklatur)	Position der Chlorsubstituenten	MeSO ₂ -PCB	Position der MeSO ₂ - Gruppe und der Chlorsubstituenten
31	2,4',5	3-31	3-MeSO ₂ -2,4',5
		4-31	4-MeSO ₂ -2,4',5
49	2,2',4,5'	3-49	3-MeSO ₂ -2,2',4',5
		4-49	4-MeSO ₂ -2,2',4',5
52	2,2',5,5'	3-52	3-MeSO ₂ -2,2',5,5'
		4-52	4-MeSO ₂ -2,2',5,5'
64	2,3,4',6	3-64	3-MeSO ₂ -2,4',5,6
		4-64	4-MeSO ₂ -2,4',5,6
70	2,3',4',5	3-70	3-MeSO ₂ -2,3',4',5
		4-70	4-MeSO ₂ -2,3',4',5
87	2,2',3,4,5'	3-87	3-MeSO ₂ -2,2',3',4',5
		4-87	4-MeSO ₂ -2,2',3',4',5
91	2,2',3,4',6	3-91	3-MeSO₂-2,2',4',5,6
		4-91	4-MeSO₂-2,2',4',5,6
95	2,2',3,5',6	3-95	3-MeSO₂-2,2',5,5',6
		4-95	4-MeSO₂-2,2',5,5',6
101	2,2',4,5,5'	3-101	3-MeSO ₂ -2,2',4',5,5'
		4-101	4-MeSO ₂ -2,2',4',5,5'
110	2,3,3',4',6	3-110	3-MeSO ₂ -2,3',4',5,6
		4-110	4-MeSO ₂ -2,3',4',5,6
132	2,2',3,3',4,6'	3-132	3-MeSO₂-2,2',3',4',5,6
		4-132	4-MeSO₂-2,2',3',4',5,6
141	2,2',3,4,5,5'	3-141	3-MeSO ₂ -2,2',3',4',5,5'
		4-141	4-MeSO ₂ -2,2',3',4',5,5'
149	2,2',3,4',5',6	3-149	3-MeSO₂-2,2',4',5,5',6
		4-149	4-MeSO₂-2,2',4',5,5',6
174	2,2',3,3',4,5,6'	3-174	3-MeSO₂-2,2',3',4',5,5',6
		4-174	4-MeSO₂-2,2',3',4',5,5',6

1.4.1. Organ- und Gewebe-spezifische Akkumulation von 3- bzw. 4-MeSO₂-PCB

Weiterhin können die einzelnen PCB-Metaboliten auch unterschiedlich stark in den Organen bzw. Geweben akkumuliert werden. Am Beispiel von HO-PCB-Metaboliten konnten Bergman *et al.* in einer aufschlußreichen Studie zeigen, daß Ratten Metaboliten gewebe- und organdifferenziert akkumulieren.^[77] Die Ratten wurden drei Tage lang mit je 25 mg/kg Körpergewicht Aroclor 1254 gefüttert und nach der letzten Gabe im Abstand von 1, 7 und 14 Tagen getötet. Die Konzentration der Muttersubstanzen, gemessen am PCB 153, nahm in der Lunge, Leber, Nieren und Fettgewebe stetig ab. 4-HO-2,3,5,3',4'-pentaCB konnte, bis auf das Fettgewebe, in allen Organen nachgewiesen werden. Besonders interessant ist das Verhältnis vom Hydroxy-Metaboliten zum nicht abgebauten PCB 153. In der Lunge lag es am ersten Tag bei 5 % und stieg im Verlauf von 14 Tagen auf 90 %. Für die Leber ist im gleichen Zeitraum ein Anstieg von 10 % auf 100 % zu verzeichnen. Erstaunlicherweise sinkt das Verhältnis in den Nieren von 20 % am 7.Tag auf 3 % nach 14 Tagen.

Bei Seehunden dominierte in einer Studie von Janák *et al.* das 3-101 gegenüber dem 4-101 im Fettgewebe, gefolgt von der Leber, während in der Lunge nur eine sehr geringe Konzentration dieses Metaboliten nachgewiesen werden konnte. Das chirale 3-149 wurde in der Leber in der höchsten Konzentration, gefolgt von der deutlich niedrigeren Konzentration in der Lunge und einer sehr niedrigen Konzentration im Fettgewebe, nachgewiesen.^[78] In einer ähnlichen Studie konnten Prud'homme *et al.* die Ergebnisse von Janák *et al.* für das 3-101 im Fettgewebe von Seehunden bestätigen. Darüber hinaus wurde festgestellt, daß aus den Kongeneren 31, 49, 70 und 101 überwiegend die 3-MeSO₂-PCB und daß aus den Kongeneren 87, 110 und 149 hauptsächlich die 4-MeSO₂-PCB gebildet werden.^[79] Besonders augenfällig war bei von Westrand *et al.* untersuchten Humanproben die selektive Bildung von dem 3-132 (19,8 ng/g EOM) gegenüber dem 4-132 (0,07 ng/g Fett) in der Leber. Im Fettgewebe hingegen lagen die Konzentrationen der 3- und 4-132-Isomere im Bereich von 0,4 bzw. 0,7 ng/g Fett.^[70] In untersuchten Otterlebern fanden sich nach einer Studie von Haraguchi *et al.* fast ausschließlich die 3-MeSO₂-PCB. Die Leber-spezifische Retention der 3-MeSO₂-PCB wurde auch bei wilden Nerzen, wenn auch nicht so ausgeprägt wie beim Otter, festgestellt.^[80] Wahrscheinlich führen sterisch anspruchsvolle Chlorsubstituenten in Vicinalstellung zum Epoxid zu einer bevorzugten Bildung der entsprechenden 3- oder 4-MeSO₂-PCB.

1.4.2. Entstehung von MeSO₂-PCB

Außer der unveränderten Akkumulation im Körper können PCB auch metabolisiert werden. Dazu müssen sie, analog dem oben für einen Adipozyten beschriebenen Weg in einen Hepatozyten gelangen. Auf der cytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums befinden sich u.a. die Cytochrome P-450 2B, die das beispielhaft verwendete 2,3,4',6-Tetrachlorobiphenyl (PCB 64) (**Abb. 9-A**) epoxidieren können (**Abb. 9-B**), sofern sie die unter 1.4 bereits genannten strukturellen Voraussetzungen mitbringen. Sofern das Epoxid gebildet ist, teilen sich die Metabolisierungspfade zu den Hydroxy-PCB (HO-PCB) und den MeSO₂-PCB.

Das Epoxid, ein sogenannter Phase-I-Metabolit, migriert in das Cytosol und wird dort durch den cysteinischen Schwefel des Phase-II-Enzyms, des Tripeptids Glutathion (GSH), an der 3- oder 4-Position nucleophil angegriffen (**Abb. 9-C1**). Generell kann so immer die 3- oder 4-Position substituiert werden; aber um die **Abb. 9** übersichtlicher zu gestalten, sei hier beispielhaft die Entstehung des 3-MeSO₂-2,4',5,6-Tetrachlorobiphenyls (3-64) dargestellt. Diese Reaktion kann durch Glutathion-S-Transferasen (GST) stark beschleunigt werden. Sie halten das Substrat an einer lipophilen Bindungsstelle in räumlicher Nähe des gebundenen Glutathions fest. Als Reaktionsprodukt entsteht ein Monohydroxy-PCB/GSH-Addukt (**Abb. 9-C2**). Ausgehend von diesem Addukt kann Glutathion durch Einwirkung weiterer Peptidasen eliminiert werden, so dass ein HO-PCB-Metabolit gebildet wird (**Abb. 9-D**). Hydroxy-PCB können außerdem auch noch auf anderem Wege, durch die direkte Insertion einer Hydroxy-Funktion, gebildet werden.^[41]

Das nach Dehydration entstandene Cystein-Addukt (**Abb. 9-E**) wird weiter über den Mercaptursäure-Pfad (*mercapturic acid pathway*=MAP) metabolisiert. Im einzelnen spaltet zuerst γ -Glutamyltranspeptidase Glutaminsäure vom Komplex ab (**Abb. 9-F**). Dann erfolgt die Abspaltung von Glycin mittels Cysteinglycinase (**Abb. 9-G**). Als letzter Schritt im MAP wird das Konjugat acetyliert. *N*-Acetyltransferase ist hierfür verantwortlich (**Abb. 9-H**).

Die entstandene Mercaptursäure kann den Hepatozyten verlassen und in der Gallenflüssigkeit zum Gastrointestinal-Trakt gelangen. Einmal im Gastrointestinal-Trakt angekommen, erfolgt teilweise eine reversible Deacetylierung der Mercaptursäure und dann eine Spaltung der C-S-Bindung von β -Lyasen. Das erhaltene Thiol (**Abb. 9-I**) kann als freies Thiol ausgeschieden oder weiter methyliert werden. Die Methylierung wird durch in intestinal basierten Mukosa-Zellen enthaltene S-Methyltransferasen katalysiert, die S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppen-Donor verwenden. Der Methylthio-Metabolit (**Abb. 9-J**) kann über den enterohepatischen Kreislauf zurück in die Hepatozyten transportiert

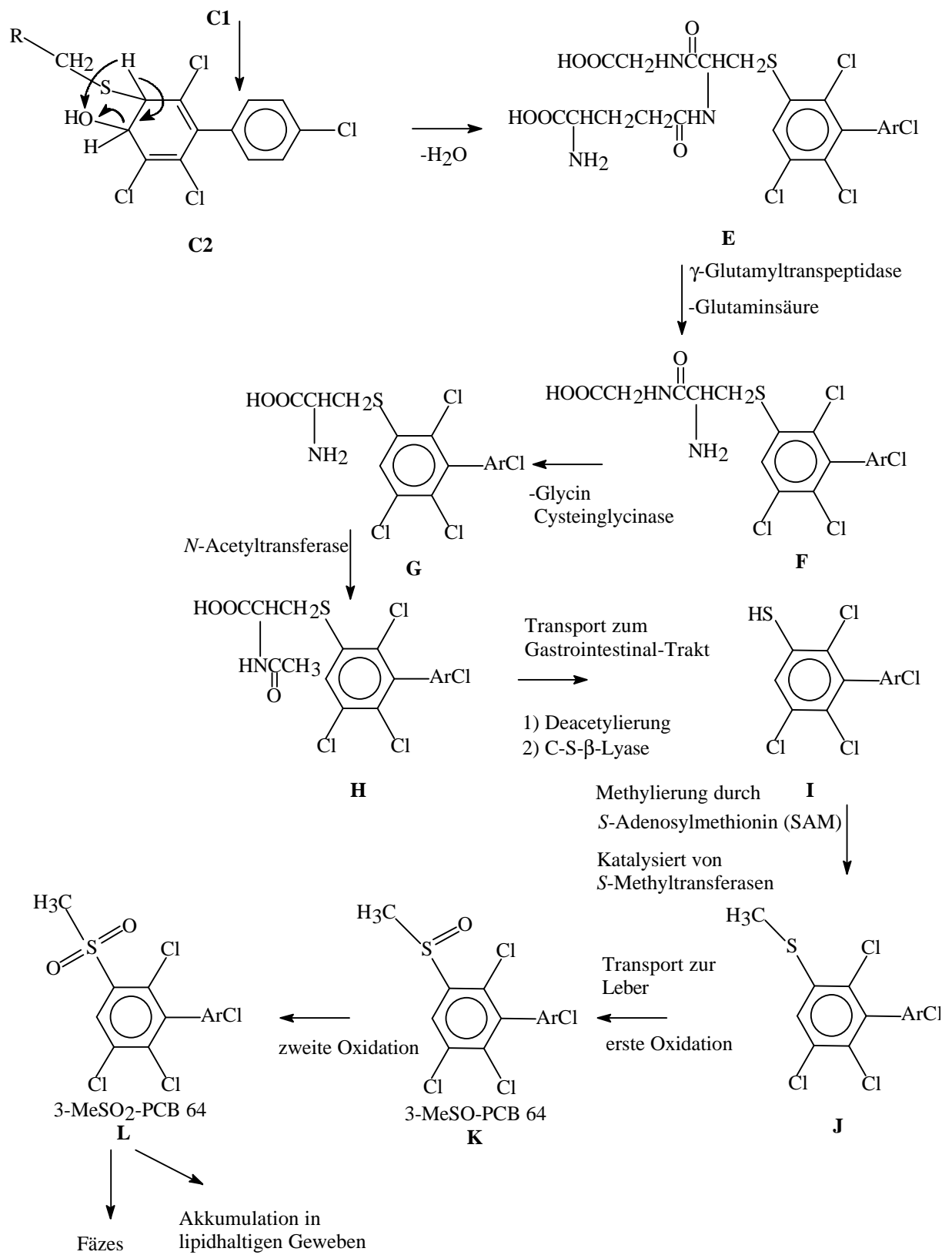


Abb. 9: Metabolisierungspfade am Beispiel des PCB 64

1.4.3. Toxikologie der MeSO₂-PCB

Oftmals sind es gerade die bei der Biotransformation entstehenden Metaboliten, die die Giftwirkung auslösen. Ein gängiges Beispiel ist der in der Bevölkerung weit verbreitete chronische Alkoholkonsum (ca. 1,5 Mio Alkoholranke in Deutschland). Der Alkohol wird hauptsächlich durch das Enzym Alkoholdehydrogenase zunächst zu Acetaldehyd metabolisiert. Anhaltende Ethanolzufuhr führt zu einem Anfluten des reaktiven Metaboliten, des Acetaldehyds, der am Zustandekommen nekrotischer Veränderungen beteiligt ist und in schweren Fällen letztendlich zu einer Leberzirrhose führen kann.^[10,82] Insbesondere schädigen hohe Acetaldehydspiegel die Mitochondrien und vermindern die Effizienz des Krebszyklus. Der reaktive Acetaldehyd kann Pyridoxalphosphat (Vitamin B6) von seinem Apoprotein verdrängen und damit zum -bei Alkohol-Kranken häufigen- Vitamin B6-Mangel beitragen.^[83]

Ein klassischer Vertreter einer großen Gruppe von Umweltchemikalien ist das bei unvollständiger Verbrennung organischer Materialien (z.B. Zigarettenrauch, gegrilltes oder geräuchertes Fleisch) entstehende Benzo(a)pyren. Dieses Prokarzinogen gehört zu den Substanzen, die erst durch körpereigene Biotransformation sogenannte ultimale Karzinogene bilden. Interessanterweise entstehen bei der Biotransformation von Benzo(a)pyren über 50 Metaboliten, die wiederum Einfluß auf die einzelnen metabolischen Schritte nehmen (Hemmung oder Stimulation). So können Entgiftung und Giftung gleichzeitig ablaufen. Das ultimale Karzinogen, nämlich das (+)-Benzo(a)pyrene-7,8-diol-9,10-epoxid reagiert kovalent mit Guanin in der nukleären DNS und löst damit die erste Stufe der Karzinogese aus.^[84]

Aus dem Gesagten geht hervor, daß auch die Metaboliten der ubiquitären Umweltgifte, der PCB, besondere Aufmerksamkeit erlangten. Nach mehr als einjähriger Applikation einer MeSO₂-PCB-Kongeneren-Mischung nahm die Reproduktionsrate bei Nerzen um fast die Hälfte ab. Teilweise hatten die Metaboliten einen stärkeren Einfluß auf die Reproduktionsrate als bei der Applikation der Mutter-PCB.^[85] Aber nicht in jedem Fall sind die Metaboliten aktiver als ihre Muttersubstanzen, so zeigten z.B. Hydroxy-PCB eine geringere Ah-Rezeptor Bindungsaffinität als ihre Muttersubstanzen.^[86] In Versuchen mit Ratten zeigte sich, daß 3-MeSO₂-PCB, im Gegensatz zu 4-MeSO₂-PCB, starke PB-Typ-Induktoren der hepatischen P 450-Enzyme sind.^[63] Im Vergleich zu den Muttersubstanzen können einige 3-MeSO₂-PCB die Cytochrome P-450 2B1, 2B2, 3A2 und 2C6 in Rattenlebern um ein vielfaches stärker induzieren.^[87] Wirft man einen Blick zu den bromierten Biphenylen, scheinen sich keine fundamentalen Unterschiede zu den PCB zu ergeben.^[88] Die größere sterische Beanspruchung der Brom- gegenüber den Chlorsubstituenten scheint keine Auswirkungen auf enzymatische Reaktionen zu haben.

Mitunter ist es bereits gelungen, Bindungsproteine für diverse MeSO₂-PCB auszumachen. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um ein Uteroglobulin-ähnliches 14 kDa-Protein, das aus

dem Lungenzytosol von Ratten partiell isoliert werden konnte.^[89] Das Protein wird für die Akkumulation von MeSO₂-PCB im Lungengewebe von Ratten verantwortlich gemacht.^[90]

Bedenklich ist, daß MeSO₂-PCB auch auf Hormone, wie z.B. das Schilddrüsenhormon Thyroxin wirken können. *Kato et al.* (L-3,5,3',5'-Tetraiodthyronin, Abk. T4), dessen Pegel die MeSO₂-PCB reduzierten.^[91] In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß MeSO₂-PCB auch auf weitere hormonelle Systeme wie das Glucocorticoid-System Einfluß ausüben können (**siehe Kap. 5.1**).

1.5. Atropisomere PCB

Vom griechischen *cheir* (Hand) abgeleitet, wurde der Begriff der Chiralität geprägt. Chiral werden Objekte oder Moleküle bezeichnet, die nicht mit ihrem Spiegelbild zur Deckung gebracht werden können. Chirale Moleküle sind auch optisch aktiv, da sie die Schwingungsebene von linear polarisiertem Licht drehen. Ein chirales Molekül und sein Spiegelbild bilden ein Enantiomerenpaar (*gr. Enantion*= Gegenteil), die die Ebene des polarisierten Lichts um den gleichen Betrag, aber in entgegengesetzte Richtung drehen. Die theoretische Beschreibung besagt, daß ein Molekül nur dann chiral sein kann, wenn es keine Drehspiegelachse S_n besitzt. Sofern ein Molekül ein Inversionszentrum i besitzt, ist es zwingend achiral und damit optisch inaktiv.^[92]

Häufig kommt in der belebten Natur nur eines von beiden Enantiomeren vor. Beispiele dafür sind die Aminosäure L-Alanin oder die Milchsäure, die in der Zellflüssigkeit nur als L-Lactat auftritt. Phänomenal ist auch das in der Natur enantiomerenrein auftretende Carvon. Das eine Enantiomere duftet nach Dillsamen, während das andere als Geruch von Krauseminzen wahrnehmbar ist. Obwohl sich die Enantiomere nicht bezüglich ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften unterscheiden, werden oftmals biochemisch sehr unterschiedliche Wirkungen gefunden.^[93] In diesem Zusammenhang wird Contergan[®] immer wieder als ein trauriges und schon fast klassisches Beispiel genannt. Der chirale Wirkstoff des Contergans[®] Thalidomid (**Abb. 10**) wurde als Racemat in den Verkauf gebracht. Vor allem werdenden Müttern wurde das 1957 auf den Markt gebrachte Contergan[®] verschrieben, damit sie „eine ruhige und angenehme Nacht“ verbringen konnten, so zumindest damals das Werbeversprechen. Das eine Enantiomer erbrachte auch tatsächlich die gewünschte sedative Wirkung. Das andere entfaltete hingegen eine fruchtschädigende Wirkung. Erst vier Jahre später, 1961, wurde das Medikament vom Markt genommen. Bis dahin wurden bereits etwa 5000 Kinder mit schweren Mißbildungen geboren. Allerdings hätte

der enantiomerenreine Wirkstoff diese Tragödie nicht verhindert, da diese Substanz im Körper racemisiert wird.^[94]

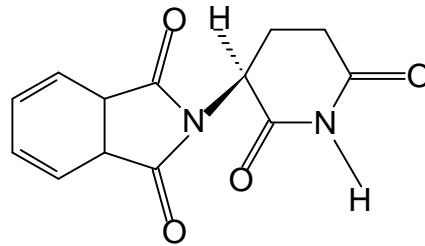


Abb. 10: Strukturformel von (-)-Thalidomid

Unter dem Begriff Chiralität wird häufig die zentrale Chiralität mit asymmetrisch substituierten C-Atomen verstanden. Daneben gibt es noch die planare, die helicale und die axiale Chiralität.^[95] Die axiale Chiralität wird bei Biphenylen auch als Atropisomerie bezeichnet. Von den 209 möglichen PCB-Kongeneren sind 78, theoretischen Berechnungen von Püttmann *et al.* zufolge, chiral, 19 davon sind auch noch bei Raumtemperatur gegen Racemisierung stabil. Dabei handelt es sich um die PCB 45, 84, 88, 91, 95, 131, 132, 135, 136, 139, 144, 149, 171, 174, 175, 176, 183, 196 und 197. Die Energiebarriere wird fast ausschließlich durch die sterisch anspruchsvollen *ortho*-Chlorsubstituenten und nur in der deutlichen Minorität durch elektronische Effekte bestimmt.^[96] Die bei Raumtemperatur stabilen PCB weisen eine Energiebarriere gegen Racemisierung von über 80 kJ/mol auf.^[97]

2. Chromatographische Trennverfahren unter Verwendung chiraler Trennsäulen

2.1. Chromatographische Trennverfahren

Unter dem Oberbegriff Chromatographie (*gr.*: *chroma* = Farbe; *graphein* = schreiben) werden zahlreiche physikalische Trennverfahren zusammengefaßt. Dieser Name ist historisch bedingt, da zunächst nur farbige Substanzen getrennt wurden. Alle chromatographischen Trennverfahren arbeiten mit einer mobilen und einer stationären Phase. Im wesentlichen unterscheidet man die Chromatographie nach den beiden Prinzipien der Verteilungs- und Adsorptionschromatographie.

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) arbeitet zum Beispiel nach dem Prinzip der Ausschlußchromatographie. Genauer gesagt, handelt es sich um eine Größenausschlußchromatographie, bei der größere Moleküle nicht in die Poren der porösen stationären Phase hineindiffundieren können und somit zuerst eluieren, während kleinere Moleküle durch Diffusion in die Poren länger auf der Säule gehalten werden. Diese Eigenschaft ist in der Umweltanalytik von unschätzbarem Vorteil, da störende Matrix, vor allem Lipide, von den zumeist kleineren Analyten abgetrennt werden können.

Die Gaschromatographie (GC) und die *High performance liquid chromatography* (HPLC) funktionieren nach dem Prinzip der Adsorptionschromatographie. Ein Gemisch aus mehreren Substanzen kann durch unterschiedlich starke Adsorption der Analyten an die stationäre Phase in die einzelnen Bestandteile aufgetrennt werden. Je stärker die Wechselwirkungen mit der stationären Phase ausgeprägt sind, desto länger ist die Retentionszeit. Allerdings spielt auch die Diffusion eine Rolle und zwar um so mehr, je länger die Analyten auf der Säule verweilen. Bei langen Retentionszeiten kann sich die Trennleistung durch Diffusion, die sich bei der Auswertung der Chromatogramme als *tailing* bemerkbar macht, deutlich verschlechtern. Optimiert sind demzufolge die kürzesten Retentionszeiten, bei gleichzeitig maximaler Trennung der Substanzen. Da beides gleichzeitig nur schwer zu verwirklichen ist, wird in der Praxis, je nach Anspruchslage, entweder die zeitliche oder die qualitative Komponente stärker betont. Grundsätzlich kann man die chromatographischen Trennverfahren qualitativ und quantitativ betreiben. Gerade die HPLC eignet sich auch für präparative Trennungen.

Oftmals reicht es in der Umweltanalytik aus, Substanzengemische mit einer achiralen stationären Phase zu trennen, da man nur an deren Identifizierung und Quantifizierung

interessiert ist. Schwierig wird das Unterfangen, wenn chirale Substanzen untersucht werden sollen, etwa weil man sich neue Erkenntnisse über enantioselektive Enzymprozesse erhofft. Während achirale Phasen für die Trennung von sterisch und physikochemisch häufig sehr unterschiedlichen Substanzen eingesetzt werden, müssen chirale Phasen die physikochemisch gleichen und nur räumlich anders angeordneten Enantiomere trennen können. Die Enantiomerentrennung wird zu Recht als die Königsdisziplin der Chromatographie bezeichnet, weil hier höchste Ansprüche an das Säulenmaterial und die die Trennung beeinflussenden Parameter gestellt werden müssen.^[98]

Die Güte der Enantiomerentrennung kann mit Hilfe von folgenden chromatographischen Kennzahlen beschrieben werden:

Der Retentionsfaktor k ist ein Maß für die Verweilzeit einer Substanz auf einer Säule. k hängt von der Temperatur, der Flußgeschwindigkeit (= *flow*) und vom Phasensystem (der Art von mobiler und stationärer Phase) ab:

(Gleichung 2)
$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

mit t_R = Retentionszeit der Substanz und t_0 = Der Totzeit der Säule

Der Trennfaktor α wird aus dem Quotienten der Retentionsfaktoren k_2 und k_1 gebildet. Um in der HPLC zu erreichen, sollte α bei einem Wert über 1,05 liegen:

(Gleichung 3)
$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

mit $k_{1/2}$ = Retentionsfaktoren der beiden Enantiomere

Eine weitere Kennzahl ist die Auflösung R :

(Gleichung 4)
$$R = \frac{1}{4}(\alpha - 1)\sqrt{N} \frac{k}{k + 1}$$

mit N = Trennstufenzahl

Aus der letztgenannten Formel läßt sich folgern, daß eine Verdoppelung der Säulenlänge die Auflösung R lediglich um den Faktor 1,4 verbessert ($\sqrt{2}$). Erst ab einer Auflösung von $R \geq 1,5$ sind die *peaks* basislinien-getrennt.

Oftmals ist es in der Praxis schwierig, R zu bestimmen. Da das Hauptinteresse bei einer quantitativen HPLC-Trennung in einer Basislinien-Trennung besteht, ist es sinnvoll, einen möglichst einfach handzuhabenden Parameter T zu bestimmen, der die Relation zwischener

minimalen Höhe h_{\min} zwischen den Enantiomerenpeaks und der maximalen Peakhöhe h_{\max} des ersteluirenden peaks als prozentualen Wert angibt (**Abb. 11**). Bei einem T-Wert von null ist das Racemat nicht angetrennt, bei einem Wert von 100 handelt es sich um eine Basislinien-Trennung. Das entspricht einem R-Wert von 1,5. Jeder dazwischenliegende T-Wert zeigt sozusagen die Qualität der Enantiomertrennung an und wird nach folgender Formel berechnet:

(Gleichung 5)
$$T = \left(1 - \left(\frac{h_{\min}}{h_{\max}} \right) \right) * 100$$

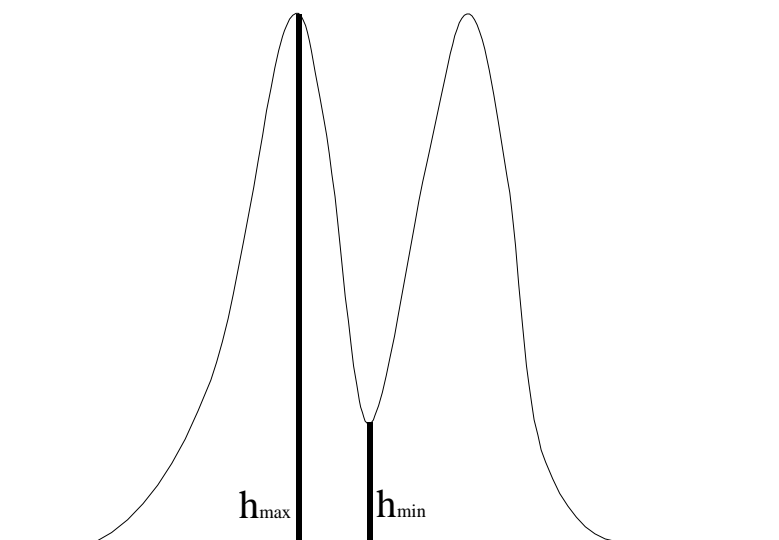


Abb. 11: Variablenermittlung der Trennqualität T

2.1.1. Cyclodextrine

Als besonders geeignet für chirale Trennungen haben sich in der Vergangenheit Cyclodextrinphasen erwiesen. Die Cyclodextrine (CD) wurden Ende des 19. Jahrhundert von Villiers entdeckt und bestehen aus 6, 7 oder 8 1,4- α -glykosidisch verknüpften D-Glucopyranose-Einheiten und werden als **a**-, **b**- und **g**-Cyclodextrine bezeichnet (**Abb. 12**).^[99,100] Cyclodextrine entstehen beim enzymatischen Abbau von Stärke durch den *Bacillus circulans* unter Einwirkung von Cyclodextringlycosyltransferase und werden durch selektive Ausfällung gewonnen. In ihrer dreidimensionalen Struktur erinnern sie an einen Basketballkorb mit unterschiedlich großen Ringdurchmessern (**Abb. 12**). Das Innere des Hohlraums ist lipophil, so daß ein unpolarer Teil des Analyten in den Cyclodextrinring eindringen kann.

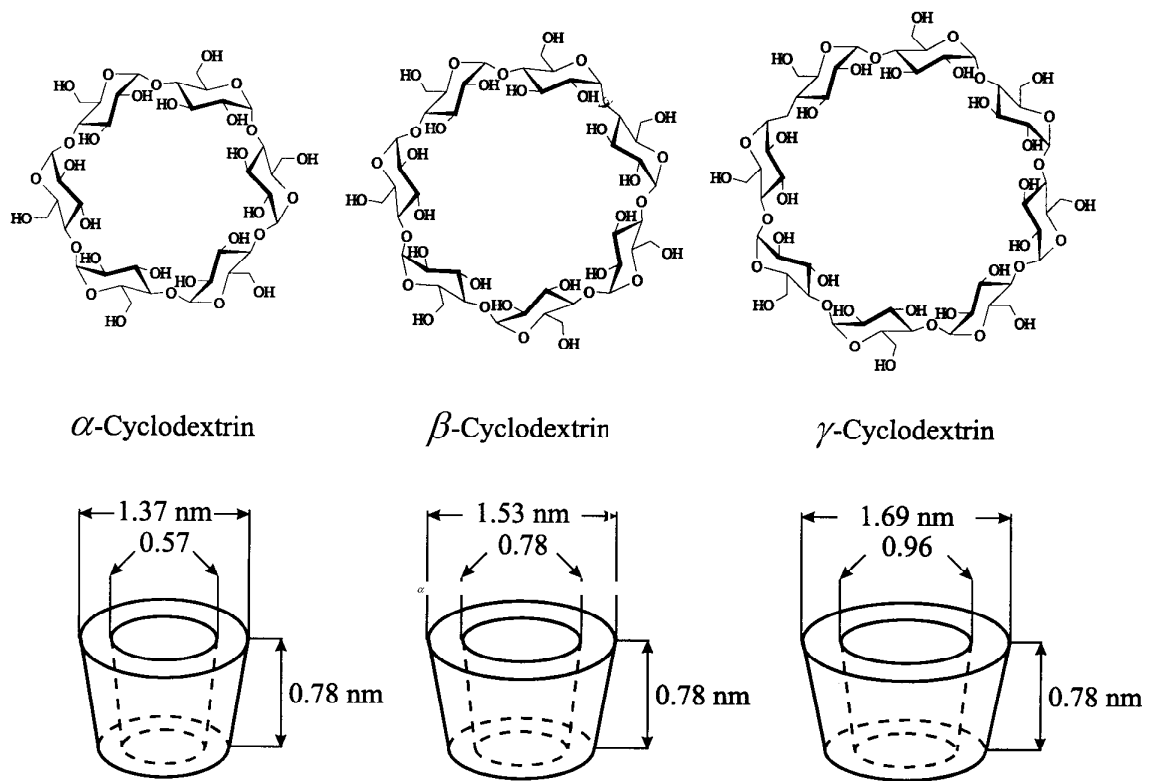


Abb. 12: Strukturformeln und Abmessungen der **a**-, **b**- und **g**-Cyclodextrine

2.1.2. Enantioselektive Gaschromatographie mit modifizierten Cyclodextrinen

Zwar gelang 1983 Koscielsky *et al.* erstmalig die gaschromatographischen Trennungen von **a**- und **b**-Pinen mit einer in Formamid gelösten nativen **a**-Cyclodextrin-Phase, aber für die hochauflösende Gaschromatographie erwiesen sich die nativen Cyclodextrine als ungeeignet, weil sie sich beim Schmelzen zersetzen und nicht in den in der Gaschromatographie gängigen Polysiloxanphasen lösen lassen.^[101] Abhilfe schafften derivatisierte Cyclodextrine, die heute ihre vielfältigen Anwendungen in der Gaschromatographie gefunden haben. Mit derivatisierten Cyclodextrinphasen wurde bisher eine Bandbreite sehr unterschiedlicher Substanzen wie den Terpenen, Pheromonen, Pharmaka, Agrochemikalien und viele Umweltschadstoffe wie die PCB sowie deren Metaboliten enantioselektiv getrennt.^[102-107]

Zu den in der Gaschromatographie gebräuchlichen Phasen gehören z.B.:

- Heptakis(6-*O*-methyl-2,3-di-*O*-*n*-pentyl)-**b**-cyclodextrin
- Heptakis(2,6-di-*O*-methyl-3-*O*-*n*-pentyl)-**b**-cyclodextrin
- Octakis(2,3,6-tri-*O*-ethyl)-**g**-cyclodextrin (TEG-CD)
- Octakis(3-*O*-butyryl-2,6-di-*O*-*n*-pentyl)-**g**-cyclodextrin (Lipodex E[®])
- Heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-**b**-cyclodextrin (2,3-Me-6-TBDMS-**b**-CD)

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich das letztgenannte **b**-Cyclodextrinderivat in verschiedenen Mischungsgraden mit den achiralen Säulenmaterialien OV 1701 und SE 52 verwendet.

2.1.3. *Enantioselektive HPLC mit modifizierten Cyclodextrinen*

In der HPLC werden neben den Cellulose- und Amylolederivaten in jüngerer Zeit auch verstärkt makrozyklische Glykopeptide eingesetzt. Armstrong stellte diese makrozyklischen Antibiotika, die als chirale stationäre Phasen verwendet werden können erstmals 1994 auf einer Konferenz in Pittsburgh (USA) vor. Zu diesen Antibiotika zählen die Vancomycin- (Handelsname: Chirobiotic V), die Teicoplanin- und die Ristocetin A-Phasen. Eine ganze Reihe von Pharmaka, wie z.B. Ibuprofen, Warfarin, Mephobarbital und Fenopropfen, konnte mit diesen chiralen Phasen getrennt werden.

Die Cyclodextrine werden in der HPLC nativ oder derivatisiert mittels eines sogenannten *Spacers* chemisch an modifizierte Kieselgele gebunden. Die Immobilisation der Cyclodextrine ist in der HPLC notwendig, weil die polaren Lösungsmittel sie andernfalls aus der Säule spülen würden. Die Cyclodextrinphasen, insbesondere die **b**-Cyclodextrine, wurden sehr erfolgreich in der enantioselektiven Trennung von PCB, sowie deren Metaboliten eingesetzt.

Neben den nativen **a**-, **b**-, **g**-Cyclodextrinen werden derivatisierte Cyclodextrine wie die permethylierten (PerMe) **a**-, **b**- und **g**-Cyclodextrine oder auch speziellere Phasen wie das monofunktionalisierte PerMe-**b**-Cyclodextrin Mono[6-*O*-(aminohexyl)-2,3-di-*O*-methyl]heptakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)cyclomalto-heptaose eingesetzt. Entweder werden die Cyclodextrine einfach mittels eines Alkylspacers oder, etwas aufwendiger, mittels eines

funktionalisierten *Spacers* an die modifizierten Kieselgel, oftmals Aminopropylkieselgel gebunden, wie **Abb. 13** veranschaulicht. ^[108]

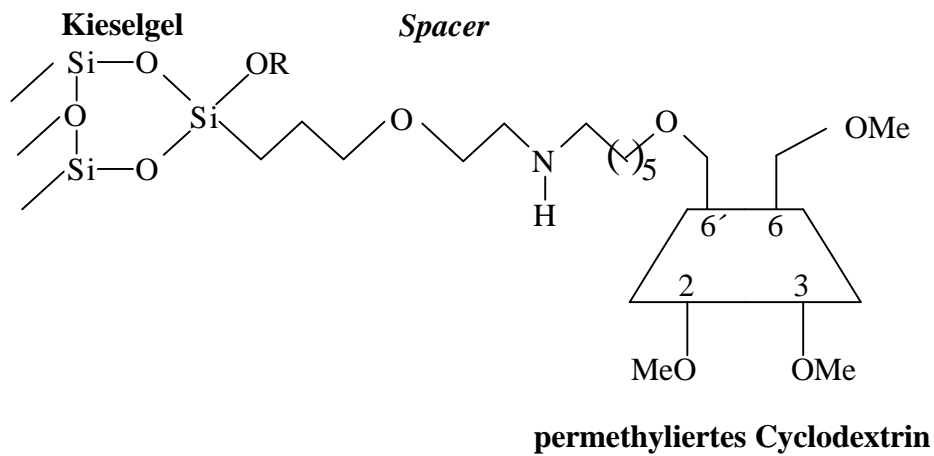


Abb. 13: PerMe-*b*-CD an Aminopropylkieselgel gebunden

2.1.4. Optimierung der HPLC-Parameter

Neben dem Säulenmaterial gibt es noch zahlreiche weitere Parameter, die die Trennung der Enantiomeren beeinflussen:

- Lösungsmittelzusammensetzung
- Art der Lösungsmittel
- Temperatur
- Fließgeschwindigkeit (*flow*)
- Puffersysteme

Im *reversed-phase* Modus werden polare Lösungsmittel eingesetzt, die sich nach ihrer Stärke unterscheiden: Acetonitril > Methanol > Wasser. Um optimale Trennungen zu erzielen, werden zur Feinabstimmung häufig Lösungsmittelgemische wie z.B. Methanol/Wasser eingesetzt. Da die Lösungsmittel die Analyten unterschiedlich gut von der Cyclodextrinphase eliminieren können, besteht ihre Wirkung vor allem in der Variation der Retentionszeit. Generell wird die Trennung der Enantiomeren mit zunehmender Retentionszeit besser, verbunden allerdings mit zunehmenden nachteiligen Diffusionseffekten, die die verbesserte Trennung wieder aufheben können.

Ein weiterer wichtiger und leicht zu ändernder Parameter ist die Temperatur. Generell wird die enantioselektive Trennung durch niedrige Temperaturen positiv beeinflusst. Hierin liegt gegenüber der Gaschromatographie ein erheblicher Vorteil, da auch thermisch sensible Substanzen enantioselektiv getrennt werden können. Allerdings muß in der Nähe des Gefrierpunktes des Lösungsmittels mit großer Vorsicht gearbeitet werden, da die Hochdruckpumpe der HPLC sonst großen Schaden nehmen kann.

Zwar gilt auch für die Fließgeschwindigkeit, daß die Trennung um so besser wird, je geringer der *flow* eingestellt wird. Bei zu geringem *flow* nimmt die Diffusion deutlich zu, verschlechtert also das Ergebnis. Das Optimum kann unter Beachtung der Van-Deemter-Kurve gefunden werden. Erfahrungsgemäß spielt die Diffusion erst bei sehr geringen Fließgeschwindigkeiten eine größere Rolle, die in der Praxis aufgrund zu langer Retentionszeiten aber nicht angestrebt werden.

Insbesondere bei chiralen Pharmaka kann die Variation des pH-Wertes des Lösungsmittels durch den Einsatz von Puffersystemen wie z.B. Essigsäure/Triethylamin (TEA) oder Triethylaminacetat/Ammoniumnitrat entscheidende Vorteile erbringen. So kann z.B. Phenylalanin erst bei pH 4 unter Einsatz des Essigsäure/TEA-Puffers Basisliniengetrennt werden, während bei pH 6 noch überhaupt keine Antrennung zu verzeichnen ist. Für die PCB-Metaboliten ist der Einsatz von Puffersystemen nicht sinnvoll und auch nicht erforderlich, da durch Optimierung der anderen Parameter ausreichende Enantiomeren-trennungen erreicht werden konnten.

2.1.5. Voraussetzungen für chirale Diskriminierung

Voraussetzung für die chirale Diskriminierung ist nach der Pirkle-Regel mindestens eine Drei-Punkt-Interaktion zwischen Adsorbat und Adsorbens.^[109] Koshland und Mesecar fanden heraus, daß die Drei-Punkt-Interaktion für viele biochemische Prozesse nicht ausreichend ist und befürworteten deshalb eine Vier-Punkt-Interaktion als Mindestvoraussetzung für diese Systeme.^[110] Diese Interaktion zwischen Adsorbat und Adsorbens führt zur chiralen Diskriminierung, so daß die Enantiomere unterschiedlich stark retardiert werden. Die eingangs erwähnten Adsorptionskräfte des Adsorbats an dem Adsorbens lassen sich durch folgende Wechselwirkungen noch näher spezifizieren:

- π - π Wechselwirkungen
- Wasserstoffbrückenbindungen
- Inklusion
- Sterische Wechselwirkungen

- Dipol-Dipol Wechselwirkungen
- Ionenaustausch

Beeinflussen lassen sich diese Wechselwirkungen durch geeignete Wahl der stationären Phase sowie durch die zahlreichen zuvor genannten Parameter. Durch die Vielfalt der die Trennung beeinflussenden Parameter zählt die HPLC einerseits zu den diffizilen chromatographischen Verfahren, andererseits eröffnen sich gerade dadurch Chancen, auch bisher nicht oder nur schwer trennbare chirale Substanzen zu separieren.

2.2. Qualitative HPLC/ Optimierung der Trennqualität

Zuerst sollten für die Enantiomerentrennung der Metaboliten verschiedene Säulen getestet werden:

1. 30 x 4 mm natives **b**-Cyclodextrin (*Macherey–Nagel*)
2. 30 x 4 mm PerMe **a**-Cyclodextrin (*Macherey–Nagel*)
3. 30 x 4 mm unvollständig methyliertes **b**-Cyclodextrin (*Macherey–Nagel*)
4. 30 x 4 mm **g**-Cyclodextrin (*Macherey–Nagel*)
5. 250 x 8 mm an Aminopropyl gebundenes PerMe-**b**-Cyclodextrin (*Dittmann et al*)
6. 250 x 8 mm unvollständig methyliertes **b**-Cyclodextrin (*Macherey–Nagel*)
7. 250 x 8 mm PerMe**b**-Cyclodextrin (*Macherey–Nagel*)

Die kommerziellen Säulen werden mit einem oder mehreren Spacern versehen, weil die Synthese eines garantiert nur monofunktionalisierten Cyclodextrin nicht wirtschaftlich durchgeführt werden kann. Eingesetzt werden unpolare an Kieselgel gebundene *spacer*, während *Dittmann et al. spacer* mit polaren Gruppen in der Alkylkette synthetisierten. Außerdem ist seine Synthese so aufgebaut, daß die Autoren nur monofunktionalisierte PerMe-Cyclodextrine erhalten haben und keine statistisch verteilte Funktionalisierung wie bei den kommerziellen Phasen. Zieht man in Betracht, daß mindestens eine Drei-Punkt-Interaktion zwischen Adsorbat und Adsorbens zur chiralen Diskriminierung notwendig ist, sollten möglichst reine Phasen für eine optimale Enantiomerentrennung eingesetzt werden.

Qualitativ getrennt werden sollten die folgenden MeSO₂-PCB: 3-91, 4-91, 3-132, 4-132, 3-149, 4-149, 3-174 und der PCB-Metabolit 4-MeO-149. Die **a**- und **g**-PerMe-

Cyclodextrinphasen, die native **b**-Cyclodextrinphase, sowie die von Ellerichmann verwendete monofunktionalisierte PerMe-**b**-Cyclodextrin-Säule erwiesen sich zur Lösung dieser Trennprobleme als ungeeignet und wurden deshalb im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht mehr eingesetzt. Möglicherweise hat die monofunktionalisierte PerMe-**b**-Cyclodextrin-Säule eine im Laufe der Zeit ungünstige chemische Veränderung erfahren, so daß nur noch der Einsatz der kommerziellen HPLC-Säulen ratsam erschien.

Diese kommerziellen präparativen 250 x 8 mm PerMe-**b**-Cyclodextrin-Säulen unterschieden sich durch ihre Methylierungsgrade. Generell zeichnen sich permethylierte Trennphasen dadurch aus, daß alle Hydroxy- durch Methoxygruppen ersetzt sind. Haglund setzte zwei solcher hintereinandergeschalteter PerMe-**b**-CD-Säulen des gleichen Herstellers erfolgreich ein, um damit die meisten chiralen PCB mittels der HPLC zu trennen.^[111] HPLC-Säulen diesen Typs (aber anderer Chargen!) wurden auch erfolgreich für die Enantiomerentrennung der PCB-Metaboliten eingesetzt. Zuerst wurde die PerMe-**b**-CD-Säule eingesetzt, die, wie in **Tabelle 5** ersichtlich, die wichtigen MeSO₂-PCB 3-149 und 3-174 entweder gar nicht oder schlechter als die kleine mit unvollständig methyliertem **b**-Cyclodextrin gepackte 30 x 4 mm Säule trennte. Jaus *et al.* stellten in ihren Untersuchungen ebenfalls fest, daß unvollständig methylierte Cyclodextrinphasen besser trennen können als permethylierte Cyclodextrinphasen.^[107,112,113] Glücklicherweise gelang es dem Chemiker Riering von *Macherey-Nagel* eine weitere 250 x 8 mm Säule mit dem nicht vollständig permethylierten **b**-Cyclodextrin zu packen und so ein erfolgreiches *up-scale* für die quantitativen Enantiomerentrennungen zu ermöglichen. Die exakte chemische Zusammensetzung der Säulenmaterialien konnte leider im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden, da sich bereits an Kieselgel gebundene Cyclodextrinderivate ihrer Analyse nahezu entziehen.^[107,112,113]

Eigentlich sollte man erwarten können, daß es entweder keine deutlichen Unterschiede in der Trennleistung der beiden Säulen geben würde oder daß eine der beiden Säulen die andere vollständig überragt. Nicht verwunderlich wäre es, wenn es sich dabei um die vollständig permethylierte **b**-Cyclodextrin-Säule handeln würde. Erstaunlicherweise unterschieden sich die beiden Säulen bisweilen erheblich und ebenso erstaunlich ergänzten sie sich oft komplementär, wie in **Tabelle 5** und den **Abb. 14** und **Abb. 15** demonstriert wird. Während die unvollständig permethylierte **b**-Cyclodextrin-Säule die MeSO₂-PCB 3-149 und 3-174 besser trennte, war die PerMe-**b**-Cyclodextrin-Säule bei der Trennung der Metaboliten 3-91, 3-132, 4-132, 4-149 und 4-MeO-149 zum Teil deutlich überlegen. Die geringfügigen Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der beiden Säulen bewirkten sehr unterschiedliche Trennleistungen der strukturell im Grunde sehr ähnlichen MeSO₂-PCB. Allerdings kann die Regel von Pirkle, der zufolge der Einsatz eines möglichst reinen chiralen Selektors die besten Enantiomerentrennungen hervorbringen müßte, in dieser Arbeit nicht gestützt werden, weil die besten Enantiomerentrennungen in einigen Fällen auf der chemisch

eher uneinheitlichen unvollständig methylierten **b**-Cyclodextrin-Säule erhalten wurden. Im wesentlichen gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten:

Entweder ist ein unvollständig methyliertes Cyclodextrinderivat der einzig aktive chirale Selektor und die restlichen Cyclodextrinderivate nur Füllmaterial oder die verschiedenen modifizierten Cyclodextrine wirken in der Kombination als chirale Selektoren. Nach dem bisherigen Erkenntnisstand ist es wahrscheinlicher, die letztgenannte Möglichkeit in Betracht zu ziehen, also die Kombination verschieden methylierter **b**-Cyclodextrin-Spezies als optimale chirale Selektoren.

So wird noch einmal verdeutlicht, daß chirale Trennungen mit der HPLC nur unter Optimierung der zahlreichen Parameter und des Säulenmaterials möglich sind. Die Trennbedingungen konnten unter Einstellung einer Flußgeschwindigkeit von 1,5 mL/min, einer Säulentemperatur von 278 K und einem Lösungsmittelgemisch von 80/20 (Methanol/Wasser) optimiert werden. Diese optimalen Einstellungen wurden für alle in **Tabelle 5** genannten MeSO₂-PCB verwendet.

Tabelle 5: Leistungsvergleich der relevanten HPLC-Trennsäulen, ($t_0 = 36$ sec)

PCB-Metabolit	Untermethylierte b -Cyclodextrin-Säule				PerMe- b -Cyclodextrin-Säule			
	Ret. 1 [min]	Ret. 2 [min]	α -Wert	T-Wert [%]	Ret. 1 [min]	Ret. 2 [min]	α -Wert	T-Wert [%]
3-91	33,7	24,3	1,10	50	28,9	34,1	1,18	100
4-91	24,3	25,0	1,03	5	37,8	38,8	1,03	5
3-132	37,8	-	1,00	0	44,4	47,4	1,06	60
4-132	26,2	-	1,00	0	37,4	39,7	1,06	55
3-149	47,7	56,0	1,17	100	48,6	-	1,00	0
4-149	32,6	-	1,00	0	42,3	48,2	1,14	100
4-MeO-149	29,3	30,9	1,05	20	57,1	60,8	1,06	80
3-174	33,7	47,7	1,41	100	28,2	29,9	1,06	80

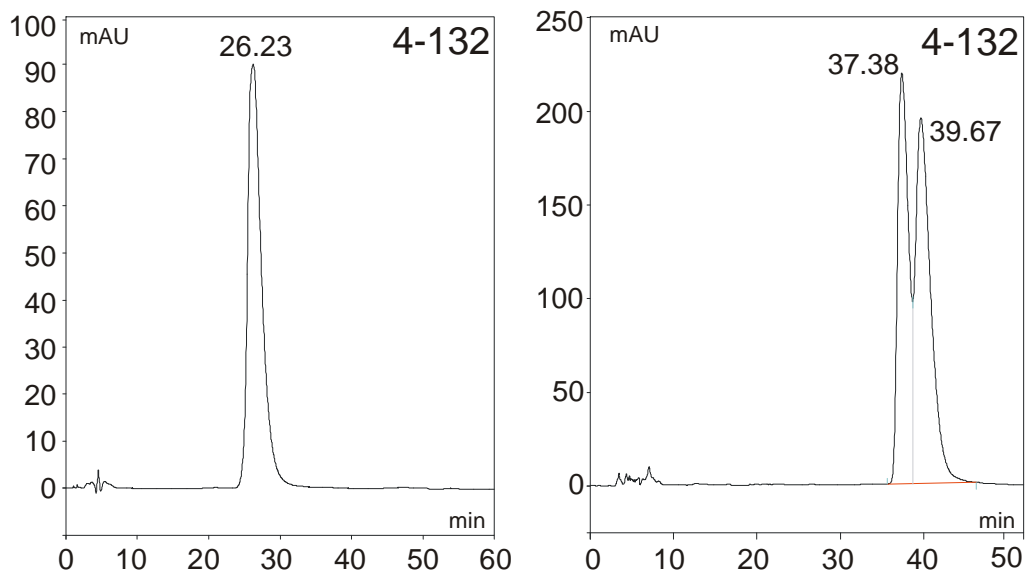


Abb.14: Vergleich der Enantiomerentrennung von 4-132 auf der unvollständig methylierten *b*-CD-Säule (li.) und der PerMe-*b*-CD-Säule (re.)

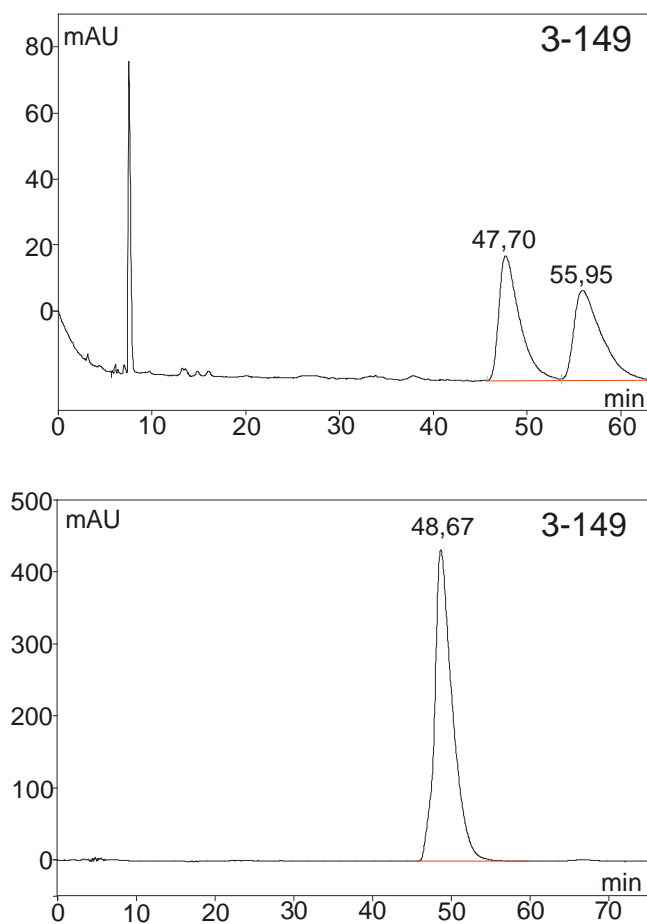


Abb.15: Vergleich der Enantiomerentrennung von 3-149 auf der unvollständig methylierten *b*-CD-Säule (oben) und der PerMe-*b*-CD-Säule (unten)

2.3. Verfahrensentwicklung einer quantitativen Enantiomerentrennung mittels HPLC

Wenn bei der qualitativen HPLC zur Diskriminierung der Enantiomere eine Antrennung von $T = 20\%$ reichen kann, um die Enantiomere eindeutig zuzuordnen, wird bei der quantitativen HPLC eine weitestgehende Enantiomerentrennung benötigt, um einerseits überhaupt enantiomerenreine Verbindungen zu erhalten und andererseits minimale Substanzverluste verkraften zu müssen. Quantitativ sollten die MeSO₂-PCB 3-91, 3-132, 4-132, 4-149, 3-149 und 3-174 getrennt werden. Für die Trennung der letztgenannten beiden MeSO₂-PCB wurde die präparative unvollständig methylierte **b**-Cyclodextrin-Säule, für die restlichen Metaboliten die präparative PerMe-**b**-Cyclodextrin-Säule eingesetzt.

Mit zunehmender Injektionsmenge wird eine Säule höher belastet. Dies hat zur Folge, daß die Trennqualität T abnimmt. Wenn eine geringe Injektionsmenge gewählt wird, sollte im Idealfall eine Basislinientrennung erhalten werden. Vorteilhaft ist, daß sofort ohne eine weitere Aufreinigung reine Enantiomere erhalten werden. Nachteilig kann die große Anzahl an Injektionen, gekoppelt mit einem hohen Lösungsmittelverbrauch und dementsprechend höheren Kosten, sein.

Deshalb wurden zwei unterschiedliche Verfahren zur quantitativen Enantiomerentrennung getestet: Das erste Verfahren (= Verfahren 1) verfolgte das Ziel, mit vielen niedrig dosierten Injektionen ohne weitere Aufreinigung sofort reine Enantiomere zu erhalten. Bei dem zweiten Verfahren (= Verfahren 2) sollten wenige, zugleich hoch dosierte Injektionen erfolgen. Dabei wird die Säule zwar höher belastet, zugleich sinkt der Lösungsmittelsatz deutlich. Das führt zu Zeit- und Kosteneinsparungen, bei gleichzeitig geringerer Umweltbelastung. Nachteilig sind die zusätzlichen Aufarbeitungsschritte, da die Enantiomere bei der ersten Trennung meistens nicht rein erhalten werden. Ebenfalls nachteilig ist der mit den weiteren Reinigungsschritten verbundene Substanzverlust. Soweit die theoretische Gegenüberstellung der beiden Verfahren; im Folgenden wird der praktische Vergleich erläutert.

2.3.1. Quantitative Enantiomerentrennung mit Verfahren 1

Pro Lauf wurden etwas über 10 µg des MeSO₂-PCB-Metaboliten 3-174 injiziert. Insgesamt waren 200 HPLC-Läufe notwendig, um 2,1 g Racemat aufzutrennen. Abweichend von den sonst üblichen HPLC-Parametern wurde bei diesen Trennungen mit einem *flow* von 0,5 mL/min gearbeitet. Um die basislinien-getrennten Enantiomere (**Abb. 16**) aufzufangen, wurde ein Retentionszeiten-gesteuerter *autosampler* verwendet. Bei Erreichen der voreingestellten Retentionszeiten fing der *autosampler* beide Enantiomere getrennt in zwei

250 mL-Kolben auf. Um die Qualität der Enantiomerentrennung zu erhöhen, wurde das zwischen den basislinien-getrennten Enantiomeren anfallende Eluat verworfen. Insgesamt wurden 4,8 L Methanol, 1,2 L Wasser und 2 L *n*-Hexan verbraucht. Die Aufarbeitung der enantioselektiv getrennten Analyten erfolgte durch dreimaliges Ausschütteln des polaren Lösungsmittelgemisches mit *n*-Hexan und anschließendem Einengen zur Trockene.

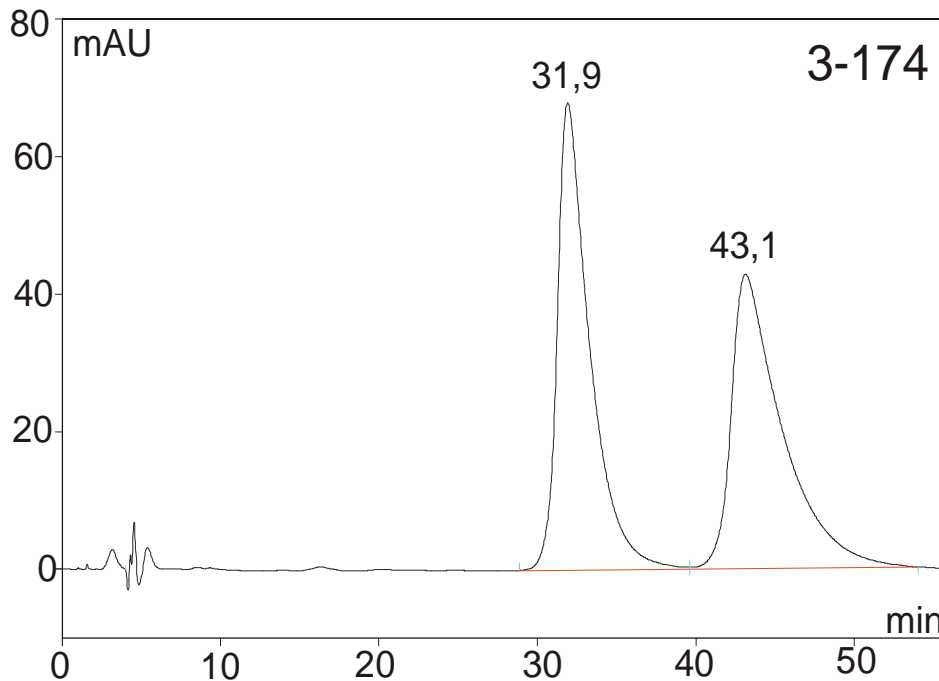


Abb. 16: Quantitative Enantiomerentrennung des 3-174 in niedriger Konzentration

Klar ist, daß es bei 200 HPLC-Läufen eine Schwankungsbreite der Retentionszeiten geben muß, deshalb sollte die Reinheit der erhaltenen Enantiomere überprüft werden. Dazu wurden den Eluat eine Probe entnommen und erneut injiziert. Die Reinheit ergibt sich aus dem Verhältnis der Verunreinigung zu der gewünschten Substanz und betrug bei der ersten Fraktion 98,7 % und bei der zweiten 94 %. Die Ausbeute lag bei 0,8 mg bzw. 0,7 mg.

Insgesamt war der Zeit-, Lösungsmittel- und Kostenaufwand des Verfahrens 1 recht hoch. Die zweite Fraktion wurde trotz Basislinientrennung nicht in ausreichender Reinheit erhalten, so daß weitere *clean-up*-Schritte notwendig wurden (**Abb. 17**). Das heißt, daß die vorgereinigte Fraktion auf ein Volumen von 1,0 mL eingengt und erneut jeweils in einem Injektionsvolumen von 250 μ L injiziert wurde. Diese Prozedur wurde gegebenenfalls wiederholt, bis eine hohe Enantiomerenreinheit erreicht wurde. Ursache für die Notwendigkeit des weiteren *clean-up* ist die große Anzahl der HPLC-Läufe und die damit verbundenen Schwankungen der Retentionszeiten. Da der *autosampler* bei fest voreingestellten Retentionszeiten aktiviert wurde, konnte der Retentionszeiten-*shift* nicht berücksichtigt werden. Obwohl das zwischen den Enantiomeren anfallende Eluat verworfen wurde, konnte das zweiteluierende Enantiomer nicht ohne weitere Aufreinigung in

zufriedenstellender Reinheit erhalten werden. Nachteilig ist des weiteren, daß die Substanzverluste sowie die Kontaminationsgefahr mit steigender Zahl der HPLC-Läufe größer werden.

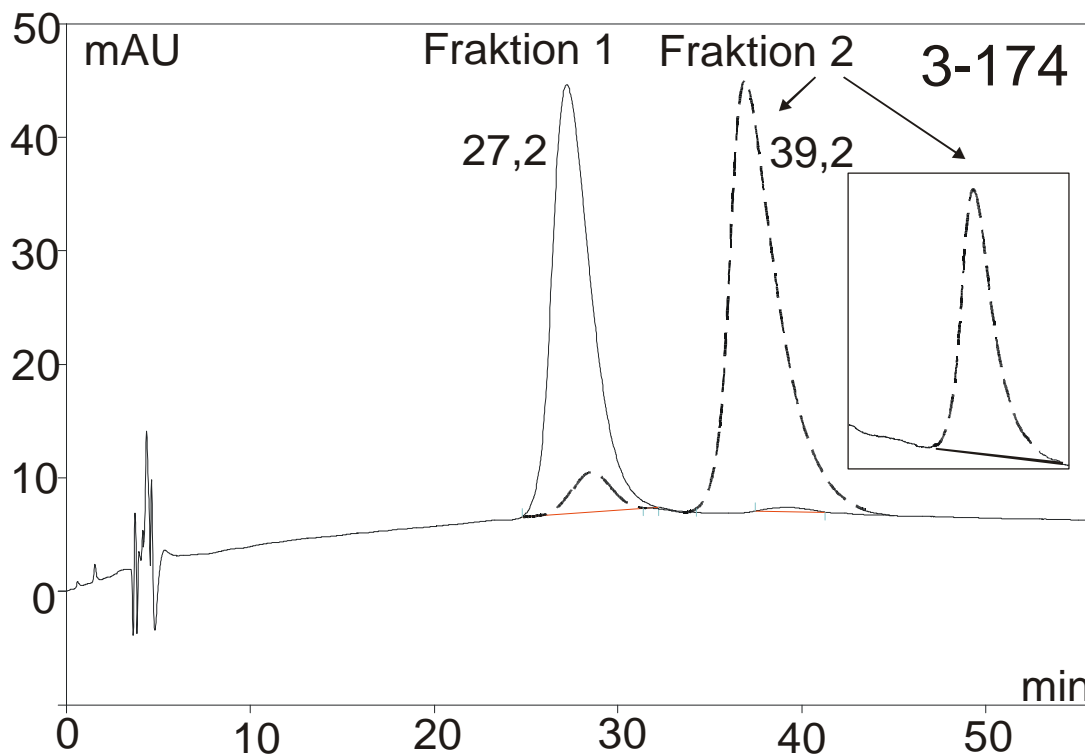


Abb. 17: Ersteluirendes Enantiomer (= Fraktion 1) mit einer Reinheit von 98,7 %; zweiteluierendes Enantiomer (= Fraktion 2) mit einer 94 %igen Reinheit und nach weiterer Aufreinigung mit einer Reinheit von 99,x % (eingebblendete Grafik)

2.3.2. *Quantitative Enantiomerentrennung mit Verfahren 2*

Mit Einführung dieses Verfahrens sollte versucht werden, das erste drastisch zu verbessern. Dazu wurde die Menge pro Injektion mit 0,46 mg mehr als vervierzigfacht, wodurch die Zahl der HPLC-Läufe von 200 auf 12 reduziert werden konnte, bei gleichzeitiger Erhöhung der zu trennenden Racematmenge von 2,1 auf 2,8 mg. Die Fließgeschwindigkeit wurde von 0,5 mL/min auf 1,5 mL/min verdreifacht.

Außerdem wurde die starre zeitabhängige *autosampler*-Steuerung aufgegeben und durch eine flexible *peak*-Höhen-abhängige ersetzt. Sobald der UV-Detektor ein signifikant ansteigendes Signal verzeichnete, wurde der *autosampler* nach einer gewissen Totzeit, die sich aus der Fließgeschwindigkeit und der zurückgelegten Weglänge vom Detektor zum

autosampler ermitteln läßt, aktiviert. Bei Überschreiten einer vorher festgelegten *peak*-Höhe fing der aktivierte *autosampler* an, das Enantiomer im Kolben zu sammeln, beendete den Sammelvorgang nach Unterschreiten einer zweiten Marke. Mit dem zweiteluierenden Enantiomer wurde genauso verfahren. Allerdings müssen die Aktivierungs- bzw. Deaktivierungsmarken individuell festgelegt werden. Dabei ist zu beachten, daß sich die *peak*-Höhe vom Grundlinienrauschen deutlich genug abheben muß, weil es sonst zu einer Fehlsteuerung des *autosamplers* kommen kann. Diese Methode ist gegenüber einer zeitabhängigen *autosampler*-Steuerung unbedingt vorzuziehen, weil die Retentionszeiten der Substanzen trotz gleicher Konditionen sehr stark variieren können.

Trotz der vielfach höheren Injektionsmenge wurde immer noch eine hervorragende Basislinientrennung des 3-174 erhalten (**Abb. 18**). Die Ausbeute des ersteluierenden Enantiomers lag bei 2,3 mg und die des zweiteluierenden bei 1,9 mg.

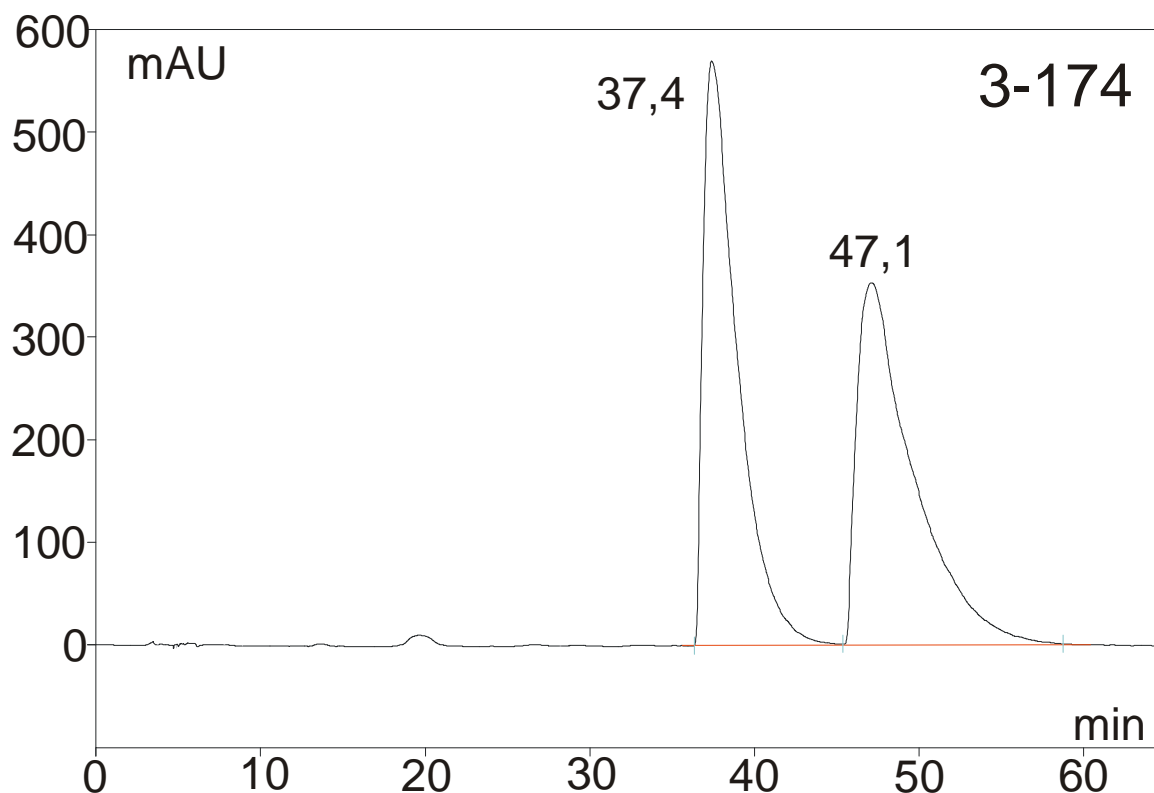


Abb. 18: Quantitative Enantiomerentrennung des 3-174, Injektionsvolumen 250 μ L, Konzentration 2,2 mg/mL

Insgesamt bleibt festzuhalten, daß im Vergleich des Verfahren 2 zum Verfahren 1 der Lösungsmittelverbrauch um 80 %, der Zeitbedarf um über 90 % und die Kosten dem entsprechend, reduziert werden konnten. Des weiteren wurden aufgrund der verbesserten Trennparameter und vor allem des Einsatzes des *peak*-Höhen-abhängig gesteuerten *autosamplers*, die Enantiomere ohne jegliche weitere Aufarbeitung in sehr hoher Reinheit

erhalten (99, x %)(**Abb.19**). Natürlich ist der 3-174-Metabolit ein Ausnahmefall bei der Enantiomerenentrennung von MeSO₂-PCB, weil in diesem Fall die Retentionszeiten der Enantiomere außergewöhnlich weit auseinanderliegen .

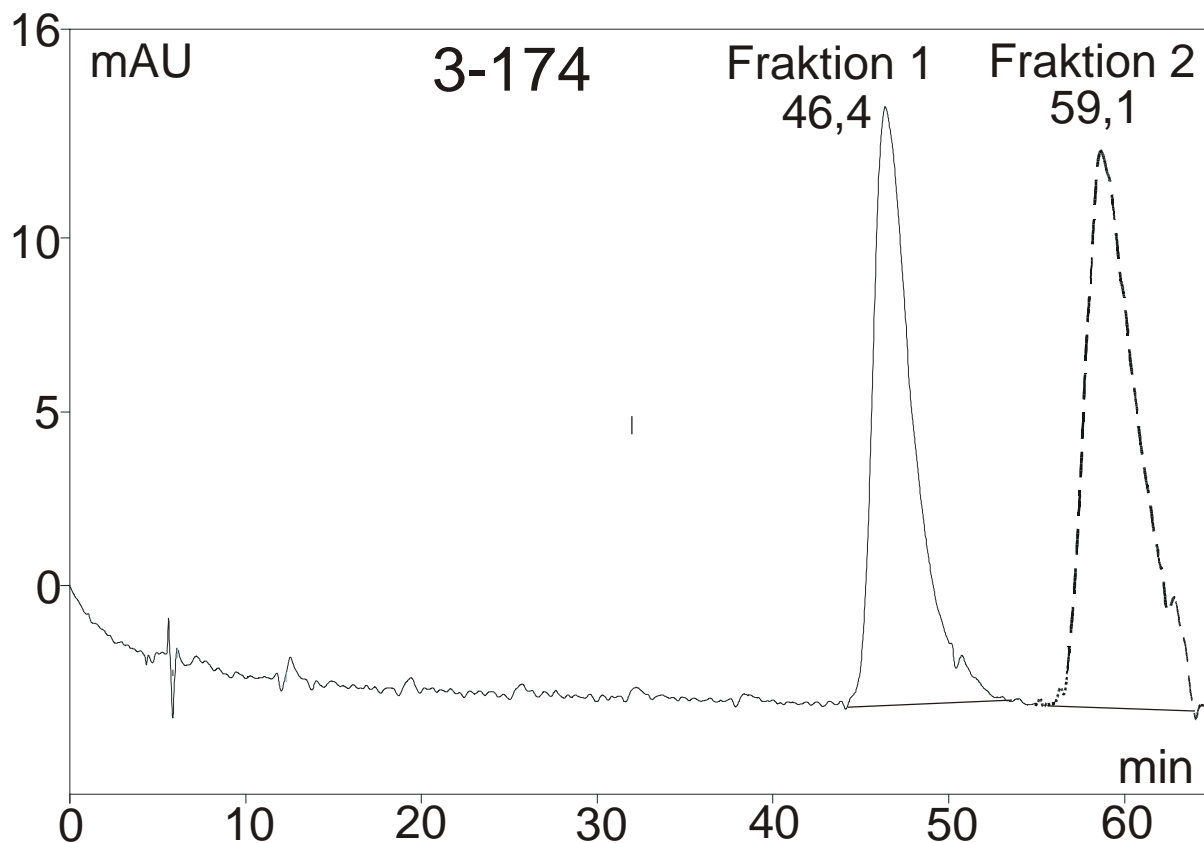


Abb. 19: Enantiomerenreine Fraktionen 1 und 2 des 3-174 (Die Fraktionen 1 und 2 sind aus Anschauungsgründen in einem Chromatogramm zusammengefaßt)

Oftmals müssen auch unvollständig getrennte Enantiomere wie z.B. das 4-132 (T= 55 %) quantitativ getrennt werden (**Abb.14**). Das ersteluirende Enantiomer konnte als Reinsubstanz erhalten werden, wenn es bis maximal h_{\min} aufgefangen wurde (**Abb. 20**). Demgegenüber wurde das zweiteluirende Enantiomer durch das *tailing* des ersten unvermeidbar verunreinigt (**Abb. 20**) und bedurfte weiterer Aufreinigungsschritte, die immer darin bestanden, das Eluat auf ca. 1 mL einzuengen und anschließend in einem Injektionsvolumen von jeweils 250 μ L erneut zu injizieren. Das Eluat wurde so aufgefangen, daß möglichst nur die gewünschte Fraktion erhalten wurde.

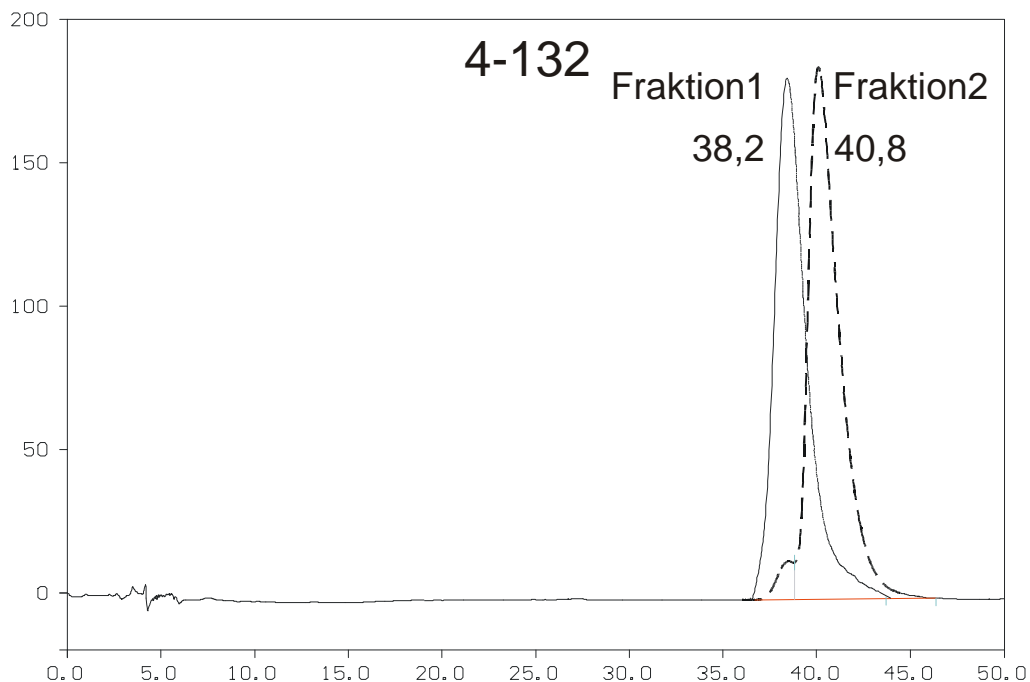


Abb. 20: Überprüfung der Enantiomerenreinheit des 4-132 (Zur Veranschaulichung sind beide Fraktionen in einem Chromatogramm abgebildet).

Um die Verunreinigung *ab initio* zu verringern, wurde das Eluat, ausgehend von t_{\min} , einige Sekunden lang verworfen, bevor das zweiteluierende Enantiomer aufgefangen wurde. Bei den Reinigungsschritten wurde die *peak*-Höhen-Erkennung so eingestellt, daß der *autosampler* erst nach Passieren der Verunreinigung aktiviert wurde. **Abb. 21** zeigt das zweiteluierende Enantiomer nach dem ersten Reinigungsschritt. Für diese Enantiomertrennung war ein Reinigungsschritt ausreichend. In einigen Fällen war auch noch ein zweites *clean-up* erforderlich.

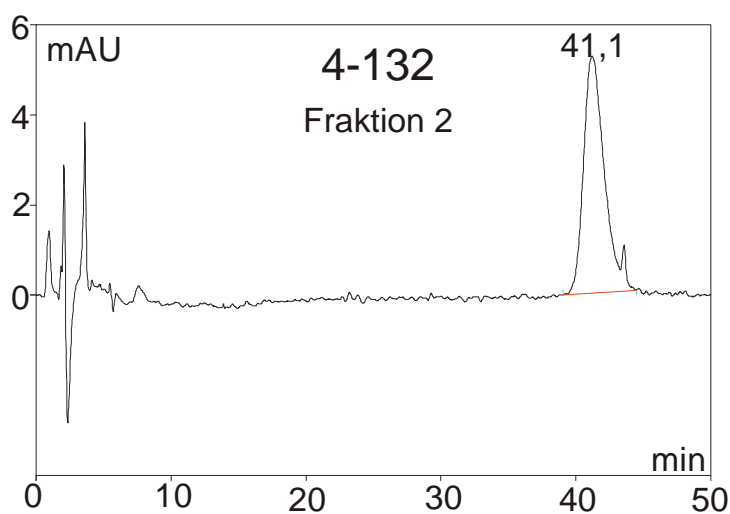


Abb. 21: Fraktion 2 des 4-132 nach Aufreinigung

Alle weiteren Racemate wurden nach dem Verfahren 2 in ihre Enantiomere getrennt. Bei der Aufreinigung ist ein gewisser Substanzverlust nicht zu verhindern, deshalb wurde von dem zweiteluierenden Enantiomer eine etwas geringere Ausbeute erhalten. Nichtsdestoweniger ist der Substanzverlust als gering anzusehen, so daß sich eine weitere Aufarbeitung des verworfenen Eluats nicht lohnt, auch deshalb nicht, weil mit steigender Zahl der Aufarbeitungsschritte die Kontaminationsgefahr zunimmt. **Tabelle 6** gibt einen Überblick über die Quantität und Reinheit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten Enantiomere.

Tabelle 6: *Quantität und Reinheit der mittels HPLC getrennten Enantiomere*

Metabolit	Fraktion 1 [mg]	Reinheit [%]	Fraktion 2 [mg]	Reinheit [%]
3-91	0,3	99,x	0,6	99,x
3-132	1,8	99,x	1,4	98,5
4-132	2,1	99,x	1,4	99,x
3-149	2,3	99,x	2,2	99,x
4-149	0,4	99,x	0,5	99,x
3-174	2,3 und 0,8	99,x und 98,7	2,6	99,x

Anm.: 99,x %ige Reinheit bedeutet, daß die Reinheit größer gleich 99 % ist.

2.4. Überprüfung der Enantiomerenreinheit mittels GC

Die Reinheit der mittels HPLC getrennten Enantiomere wurde zum einen mit der HPLC selbst überprüft, zur weiteren Absicherung auch noch gaschromatographisch mit einer 15 m langen chiralen Heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-*b*-cyclodextrin (20% in SE 52)- Säule (2,3-Me-6-TBDMS-*b*-CD). Die Ergebnisse der HPLC konnten gaschromatographisch bestätigt werden, beispielhaft ist die Überprüfung der Enantiomere des 3-149 in **Abb. 22** gezeigt.

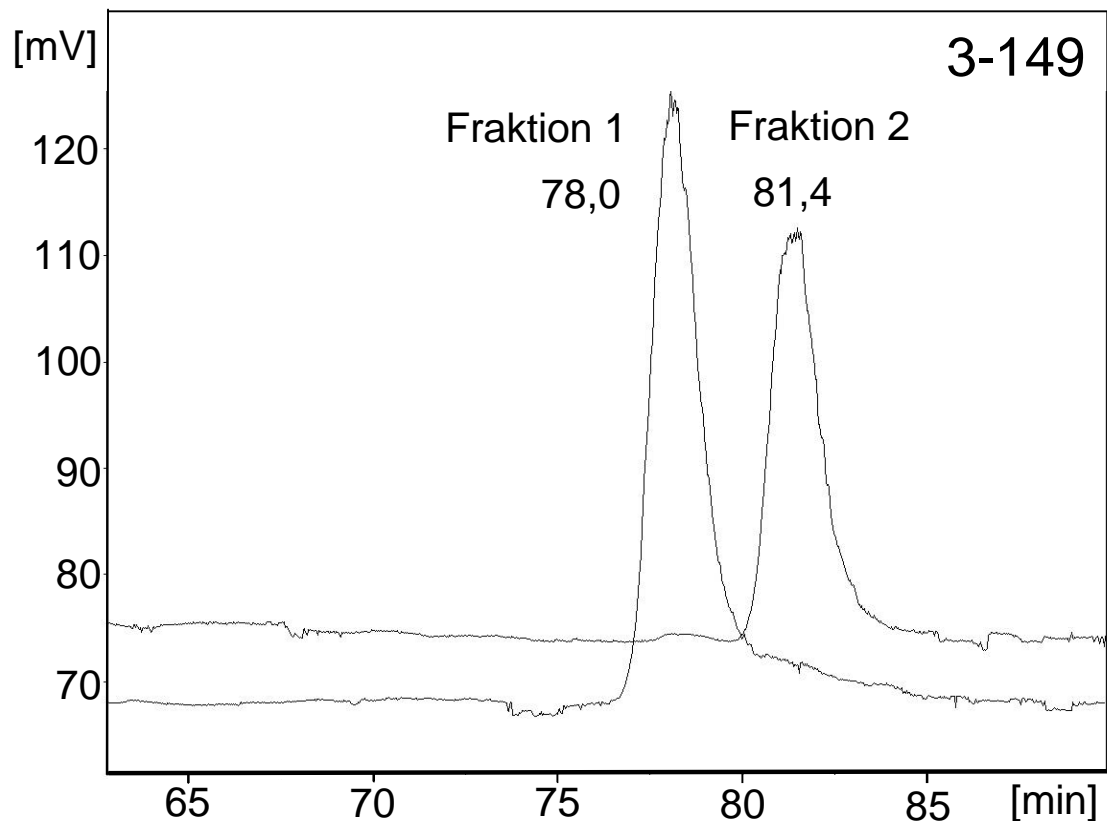


Abb. 22: Gaschromatographische Überprüfung mit einer 15 m langen chiralen Heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-*b*-cyclodextrin (20% in SE 52)- Säule der zuvor mit der HPLC getrennten Enantiomere

2.4.1. Vergleich der Elutionsreihenfolgen: GC vs. HPLC

Die Enantiomerentrennung auf gaschromatographischen Säulen läßt sich wesentlich besser beherrschen, weil die Wechselwirkungen des unsolvatisierten Analyten mit dem chiralen Säulenmaterial nur von wenigen Parametern abhängt. Im Gegensatz dazu lassen sich Enantiomerentrennungen mittels chiraler HPLC-Phasen aufgrund der zahlreichen Einflußgrößen auf die Analyten bis *dato* nur sehr schwer vorhersagen. Hinzu kommt, daß die Analyten durch das Lösungsmittel solvatisiert werden. Das hat zur Folge, daß die komplexen Parameter bei Enantiomerentrennungen immer noch empirisch bestimmt werden müssen.

Das Enantiomer mit den stärkeren Wechselwirkungen mit der chiralen Phase wird länger auf der Säule retardiert und eluiert später als das schwächer wechselwirkende Enantiomer. Obwohl die Säulen in der HPLC und GC chemisch relativ ähnlich sind, erfahren die Enantiomere andere Wechselwirkungen, so daß die Elutionsreihenfolgen identisch sein können, aber nicht müssen, wie in **Tabelle 7** verdeutlicht wird.

Tabelle 7: *Elutionsfolgenvergleich: HPLC-Enantiomerentrennungen auf einer 250 x 8 mm unvollständig oder permethylierten-**b**-CD-Phase, GC-Enantiomerentrennungen auf einer 2,3-Me-6-TBDMS-**b**-CD-Säule (20% in SE 52);15m*

Enan	HPLC Elutionsfolge	Gleiche Elutionsfolgefolge GC?
3-91	1	Nein
3-91	2	Nein
3-132	1	Nein
3-132	2	Nein
4-132	1	Ja
4-132	2	Ja
3-149	1	Ja
3-149	2	Ja
4-149	1	Ja
4-149	2	Ja
3-174	1	Ja
3-174	2	Ja

2.5. Vergleich der Enantiomerentrennungen: GC vs. HPLC

Alle gaschromatographisch getrennten Enantiomere der PCB-Metaboliten und der PCB wurden in einer Übersicht in den **Tabellen 8** und **9** dargestellt. Für die Enantiomerentrennung der MeSO₂-PCB erwies sich eine 2,3-Me-6-TBDMS-**b**-CD-Säule (20% in SE 52) am besten, für die Mutterverbindungen eine 2,3-Me-6-TBDMS-**b**-CD-Säule (50% in OV 1701).

Tabelle 8: *Mit der 15 m langen mit der chiralen 2,3-Me-6-TBDMS-**b**-CD-Phase (20% in SE 52) belegten Säule gaschromatographisch getrennte PCB-Metaboliten*

Metabolit	Enantiomer 1 [Ret. In min]	Enantiomer 2 [Ret. in min]	α -Wert	T-Wert [%]
3-91	51,5	-	1	0
4-91	54,7*	56,8	1,03	100
4-95	52,3	54,8*	1,05	100
3-132	98,9	100,7	1,02	50
4-132	104,3	108,7	1,04	100
4-MeO-149**	26,2	-	1	0
3-149	78,0	81,5	1,04	100
4-149	87,1	93,2	1,07	100
3-174	143,3	154,0	1,07	100
4-174	159,5	172,0	1,08	100

*Das ersteluerende Enantiomer des 3-91 koeluiert mit dem zweiteluerenden Enantiomer des 4-95; ** Nicht trennbar

Tabelle 9: Mit der 25 m langen mit der chiralen 2,3-Me-6-TBDMS-*b*-CD-Phase (50% in OV 1701) belegten Säule gaschromatographisch getrennte PCB im Überblick)

PCB	Enantiomer 1	Enantiomer 2	α -Wert	T-Wert
	[Ret. In min]	[Ret. in min]		[%]
91	38,8	40,0	1,03	85
95	35,0	36,0	1,03	85
132	68,3	69,0	1,01	6
149	65,0	66,3	1,02	35
174	141,5	-	1	0

2.6. Zusammenfassung der chromatographischen Ergebnisse

Qualitativ konnte durch die einmalige Kombination der unvollständig- und der permethylierten *b*-CD-Säulen die MeSO₂-PCB 3-91, 3-149, 4-149 und 3-174 basisliniengetrennt, die 3-132, 4-132 und 4-MeO-149 weitgehend angetrennt und das 4-91 leicht angetrennt werden. Zur besseren Beurteilung der Güte von Enantiomerentrennungen wurde als neuer Parameter die Trennqualität T eingeführt.

Quantitativ konnten die Enantiomere der MeSO₂-PCB 3-91, 3-132, 4-132, 3-149, 4-149 und 3-174 in Mengen zwischen 0,3 und 3,1 mg erfolgreich getrennt und in sehr hohen Reinheiten von zumeist 99,x % erhalten werden. Unter Optimierung der Trennparameter sowie Einführung eines *peak*-Höhen-gesteuerten *autosamplers* konnte der Zeit-, Kosten- und Lösungsmittelaufwand minimiert werden. Zusätzlich erlaubt das Verfahren 2 selbst dann quantitative Enantiomerentrennungen bei gleichzeitig hohen Ansprüchen an die Reinheit, wenn die Enantiomere nur angetrennt sind (T > 50 %).

Vergleicht man die gaschromatographischen Enantiomerentrennungen und die Enantiomerentrennungen mittels HPLC (**Tabelle 10**), trennte die HPLC trotz geringerer Trennstufenzahl N in zwei Fällen (3-91 und 4-MeO-149) besser, in zwei Fällen (4-91 und 4-132) schlechter und in vier Fällen (3-132, 3-149, 4-149, 3-174) gleich gut, wobei die Enantiomere bis auf das 3-132 basisliniengetrennt sind.

Wichtig war, bei genauerer Betrachtung, daß vor allem die in Umweltproben dominierenden Methylsulfonyl-Metaboliten des PCB 132 und 149 auch der präparativen enantioselektiven HPLC-Trennung zugänglich waren. Die Enantiomere der 4-91- und 4-MeO-149-Metaboliten konnten zwar angetrennt werden, aber da sie in nur in einer sehr

geringen Menge vorhanden waren, war eine quantitative Trennung nicht durchzuführen. Meines Wissen ist die qualitative Enantiomerentrennung des 4-MeO-149 mittels HPLC in dieser Arbeit erstmalig gelungen. Eine weitergehende Optimierung steht noch aus. Somit können jetzt nicht nur MeSO₂-PCB in kurzer Zeit quantitativ und enantiomerenrein mittels der HPLC getrennt werden, sondern es scheint bei entsprechender Optimierung nunmehr auch möglich zu sein, Methoxy- und Hydroxy-PCB enantioselektiv zu trennen.

Tabelle 10: Vergleich der Enantiomerentrennungen zwischen GC (15 m **2,3-Me-6-TBDMS-b-CD**-Säule (20% in SE 52)) und HPLC (250 x 8 mm, unvollständig und permethylierte **b-CD**-Säulen)

Metabolit	T-Wert GC [%]	T-Wert HPLC [%]	Die HPLC-Trennungen waren im Vergleich zu den GC-Trennungen....
3-91	0	100	Besser
4-91	100	5	Schlechter
4-95	100	-*	Nicht vergleichbar*
3-132	50	60	Gleich gut
4-132	100	55	Schlechter
4-MeO-149	0	80	Besser
3-149	100	100	Gleich gut
4-149	100	100	Gleich gut
3-174	100	100	Gleich gut
4-174	100	-*	Nicht vergleichbar*

*Die Racemate 4-95 und 4-174 existierten nur in Konzentrationen von maximal 100 ng/mL und waren dementsprechend der HPLC nicht zugänglich.

3. Polarimetrie

Schon Pasteur betrachtete 1848 die Salze der Traubensäure sehr genau. Dabei fiel ihm auf, daß das Salz aus einer Mischung zweier Kristalle bestand, die sich wie Bild und Spiegelbild verhielten. Unter der Lupe trennte er die chiralen Kristallformen voneinander und löste jede Kristallart in Wasser auf. Er war erstaunt, als er feststellte, daß die chiralen Natriumammonium-Salze der Weinsäure in der Lage waren, die Schwingungsebene linear polarisierten Lichts um den gleichen Betrag in entgegengesetzte Richtungen zu drehen. Das Prinzip polarimetrischer Untersuchungen funktioniert folgendermaßen: Monochromatisches Licht einer Natriumdampflampe trifft auf einen Polarisator, der das Licht linear polarisiert. Dieses Licht durchquert die mit der gelösten optisch aktiven Substanz gefüllte Meßzelle, und dabei wird die Schwingungsebene des linear polarisierten Lichts mit oder gegen den Uhrzeigersinn gedreht. Drehrichtung und Drehwinkel werden von einem Analysator erfaßt. Dreht das Enantiomer die Schwingungsebene des polarisierten Lichts im Uhrzeigersinn nach rechts, so wird die Drehrichtung konventionsgemäß durch (+) gekennzeichnet, hingegen erhält die Drehrichtung entgegen dem Uhrzeigersinn ein (-)-Vorzeichen. Die Größe des Drehwinkels und die Drehrichtung sind Stoffkonstanten.

Da die polarimetrisch untersuchten MeSO₂-PCB nur geringe und somit ungenaue Drehwinkel aufwiesen, wurde auf deren Bestimmung verzichtet. In einigen Fällen (3-91, 3-149 und 3-174) konnte trotz mehrmaliger Wiederholung auch keine Drehrichtung bestimmt werden, da sich das Vorzeichen schon durch eine simple 180°-Drehung der Küvette änderte. Die gesamte Quantität der mittels enantioselektiver HPLC erhaltener Enantiomere wurde in jeweils 10 mL *n*-Hexan gelöst, in eine vorher gereinigte Küvette überführt und bei der einzig verfügbaren Wellenlänge von 589 nm, bei einer Temperatur von 293 K, vermessen. Den Enantiomeren des 3-132 und 4-132 konnte eindeutig eine Drehrichtung zugeordnet werden (**Tabelle 11**). Die Ergebnisse konnten auch bei halbiertem Konzentration der beiden letztgenannten Metaboliten bestätigt werden. Eine umfangreichere Konzentrationsreihe konnte aufgrund der geringen Substanzmengen und der niedrigen Drehwinkel nicht erstellt werden.

Tabelle 11: *Polarimetrische Bestimmung der Drehrichtung von MeSO₂-PCB-Enantiomeren*

MeSO ₂ -PCB-Enantiomer	Elutionsfolge (HPLC)	Drehrichtung
3-132	1	+
3-132	2	-
4-132	1	-
4-132	2	+

4. VCD-Spektroskopie

4.1. Einleitung

Wie bereits erwähnt, wurde in jüngerer Zeit beobachtet, daß einige der MeSO₂-PCB in Biota selektiv in dem Lungen- und Lebergewebe akkumuliert werden.^[114] Der Mechanismus für diese Selektivität ist noch immer nicht ganz verstanden worden, obwohl reversible Bindung in Proteinen eine wichtige Rolle in der Retention der MeSO₂-PCB in der Leber spielt, z.B. an das Fettsäure-bindende Protein (*Fatty acid binding Protein, FABP*), während die Retention in der Lunge davon abhängt, ob die MeSO₂-PCB an Uteroglobulin binden können.^[115-117] Zu den wichtigsten MeSO₂-PCB in Lebern von Säugetieren gehören die chiralen Metaboliten 3-149, 3-132 und 4-132 (**Abb. 23**), die nur etwas weniger hydrophob als ihre Muttersubstanzen sind, so daß sie lange in der Biosphäre bleiben.^[105] Wie schon eingangs erwähnt, haben *Kato et al.* herausgefunden, daß einige 3-MeSO₂-PCB verschiedene Cytochrome signifikant induzieren können.^[63,118] Daher ist es anzunehmen, daß ein Teil der toxischen Effekte, die von PCB induziert werden, von den MeSO₂-PCB stammen. Sowohl enantioselektive Transformation als auch verschiedene toxische Effekte der Enantiomere sind postuliert worden. Eine Verifizierung dieser Annahmen erforderte die enantioselektive HPLC-Trennung der MeSO₂-PCB-Enantiomere, die Bestimmung der absoluten Strukturen und eine systematische Untersuchung der enantioselektiv bedingten toxischen Effekte der MeSO₂-PCB-Enantiomere. Das Wissen über die absoluten Strukturen wird einen tieferen Einblick in die Enzym-Substrat-Wechselwirkungen bezüglich der PCB-Transformationsprozesse erlauben und nähere Erkenntnisse bezüglich des Mechanismus der chiralen Substrat-Selektion einiger Enzyme liefern können.

Bisher wurde die absolute Struktur meistens mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Da einige Substanzen nur schlecht oder gar nicht kristallisieren oder unter natürlichen Umständen nicht in kristalliner Form vorliegen, suchte man nach neuen Möglichkeiten der Aufklärung der absoluten Konfiguration und stieß auf die Möglichkeiten des VCD (*vibrational circular dichroism*). Weil keine MeSO₂-PCB-Einkristalle zu erhalten waren, entschieden wir uns für den VCD in Verbindung mit quantenchemischen *ab initio* Berechnungen.

VCD ist eine IR-spektroskopische Polarisationsmethode. Aufbauend auf dem Phänomen des Zirkulardichroismus, welches seit 1847 bekannt ist, hat der VCD erst weitreichende Anwendung gefunden, nachdem die französische Firma *Jouan* 1960 erfolgreich einen Dichrograph entwickeln konnte.^[119] Man verwendet links und rechts zirkular polarisiertes Infrarotlicht (**Abb. 24**) und ermittelt das Differenzspektrum, das erhalten wird, wenn die

Absorption von rechts zirkular polarisiertem Licht von der Absorption des links zirkular polarisierten Lichts subtrahiert wird.

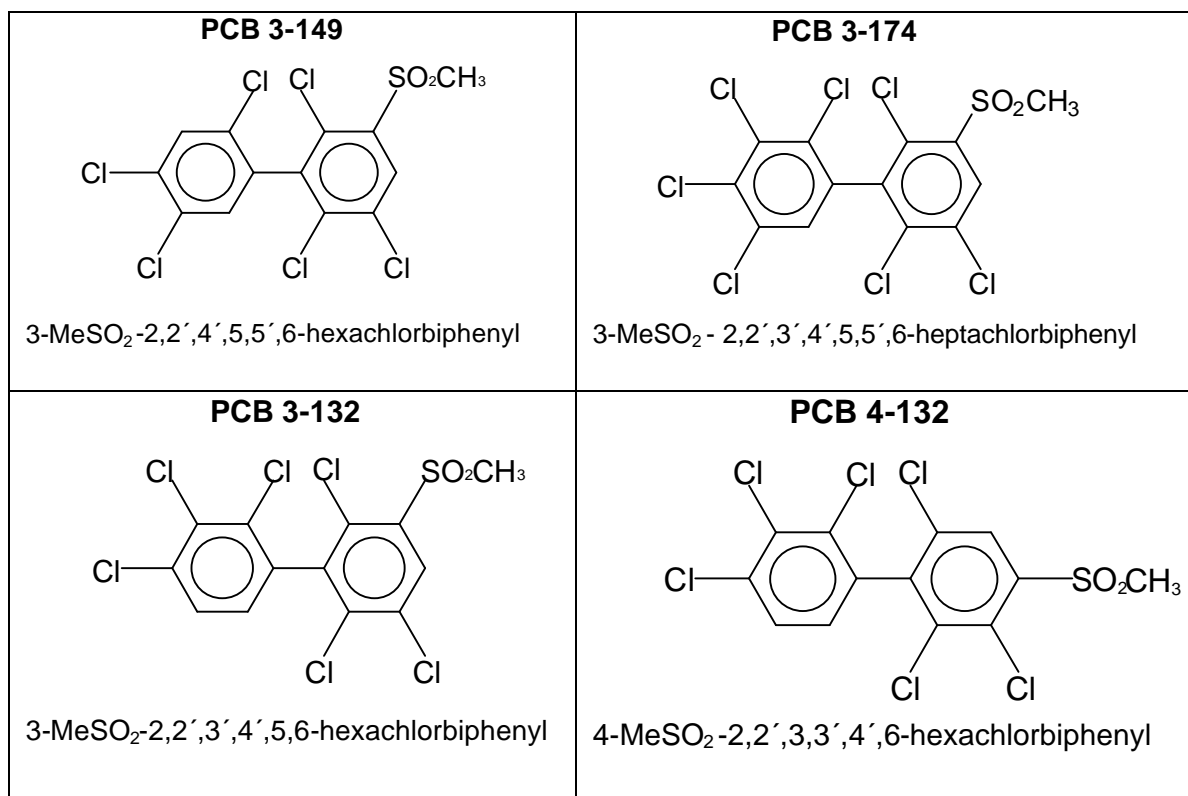


Abb. 23: Strukturen der untersuchten MeSO₂-PCB

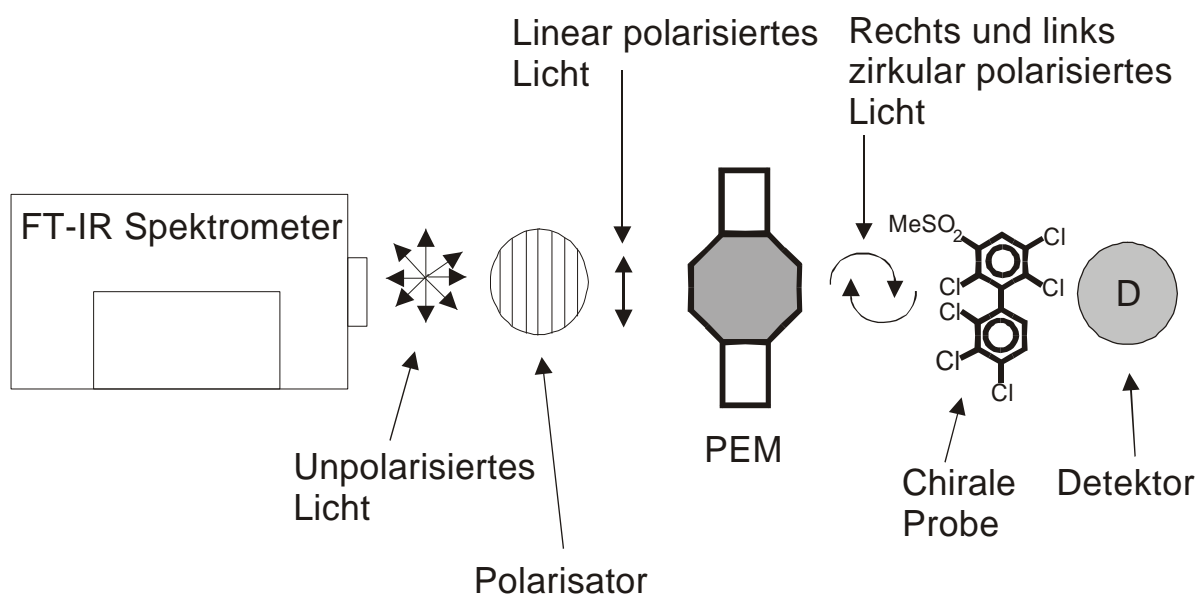


Abb. 24: Schematischer Aufbau eines VCD-Spektrometers (PEM = Photoelastischer Modulator)

Für achirale Substanzen oder racemische Mischungen ist diese Differenz gleich null, während bei chiralen Verbindungen die reinen Enantiomere zu komplementären Spektren führen. VCD-Spektren sind schwierig zu erhalten, weil die Differenz zwischen den Wechselwirkungen mit links und rechts zirkular polarisiertem Licht im Bereich von 10^{-4} bis 10^{-5} Absorptions-Einheiten liegen, so daß nur sehr hochwertige und empfindliche Spektrometer in Frage kommen.

Für jedes Enantiomer wurden spezifische VCD-Spektren erhalten, aber ein Rückschluß des Spektrums auf das respektive Enantiomer nur auf empirischer Basis ist unmöglich, weil es schwierig ist, die Interaktionen von einer bestimmten Vibrationsschwingung mit zirkular polarisiertem Licht vorherzusagen. Somit müssen computersimulierte Spektren erzeugt werden, um die absolute Konfiguration der Enantiomere aus den experimentellen Daten abzuleiten. Es müssen quantenchemische *ab initio*-Berechnungen angestellt werden, welche die Valenz- und Deformationsschwingungen eines Moleküls und dessen Interaktion mit zirkular polarisiertem Licht im Computer simulieren können.^[120] Normalerweise kann eine Zuweisung der Banden in dem experimentellen Vibrationsspektrum zu den Normalschwingungen des Moleküls ausgeführt werden. In dem Fall der PCB-Derivate wäre dies extrem schwierig, weil die Anzahl der Normalschwingungen für diese Moleküle sehr hoch ist. Weiterhin kann nur eine begrenzte Region des Spektrums wegen der relativ geringen Empfindlichkeit der VCD-Methode aufgenommen werden. Deshalb ist in der vorliegenden Arbeit die Zuordnung der VCD-Spektren der Enantiomere durch Vergleich der experimentellen mit den berechneten Spektren erfolgt.

4.2. VCD-Messungen

Jedes der reinen Enantiomere 3-149, 3-132, 4-132 und 3-174 (1,4 - 3,1 mg) wurde in 100 μL CDCl_3 gelöst.^[121] Die Enantiomere 3-91 und 4-149 wurden nicht untersucht, weil für die VCD-Messungen nicht genügend Substanz vorhanden war. Zuerst wurde ein unpolarisiertes Absorptionsspektrum mit einem IFS66/S FTIR Spektrometer (*Bruker*, Ettlingen, Deutschland) unter Verwendung ein 210 μm CaF_2 -Flüssigkeitszelle, mit einer Auflösung von 6 cm^{-1} und 32 *scans*, aufgenommen. Als Beispiel ist ein unpolarisiertes Spektrum des 3-149 in **Abb. 25** gezeigt. Danach wurden VCD-Spektren in einem Bereich zwischen 1800 und 1000 cm^{-1} auf demselben Spektrometer, welches mit einem PMA 37-Modul verknüpft war, unter Verwendung eines photoelastischen Modulators für die Erzeugung zirkular polarisierten Lichts aufgenommen.

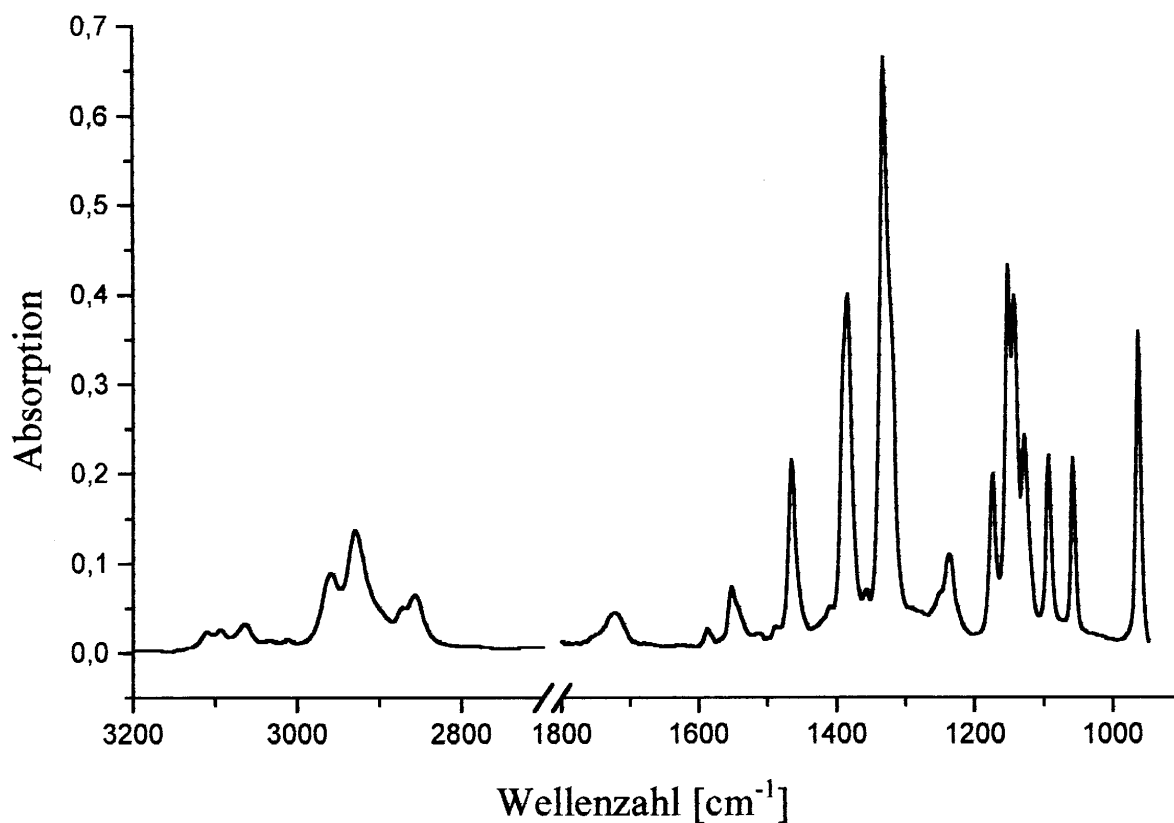


Abb. 25: Unpolarisiertes Infrarotspektrum des MeSO_2 -3-149

4.3. *Ab initio*-Kalkulationen

Die unterschiedlichen MeSO₂-PCB wurden aus einem Biphenyl-Templat durch adäquate Substitution der Wasserstoffatome gegen Chloratome und einer Methylsulfonylgruppe mit der Software GaussView modelliert.^[122] Die volle Geometrieoptimierung wurde mit der Gauß 98-Software mit einem 6-31G* Basissatz im Rahmen der Dichtefunktional-Theorie in der Form der „Becke’s Drei-Parameter-Ansatz dichtefunktionaler Hybridmethoden“ in Kombination mit der Korrelationskorrektur von Lee, Yang und Parr (B3-LYP) vorgenommen.^[123-127] Für das 3-149 wurde die Energiepotentialfläche für die Rotation der Methylsulfonylgruppe berechnet. Für diese Prozedur wurde die optimierte Geometrie fixiert. Die Torsionswinkel wurden systematisch in 10° Inkrementen variiert, und außerdem wurden ein-Punkt Energie-Berechnungen angestellt. Diese Berechnungen führten zu drei verschiedenen Energieminima. In einer analogen Weise wurden die drei verschiedenen Konformere konstruiert. Eine Geometrieoptimierung wurde für jeweils ein Enantiomer der vier in dieser Arbeit betrachteten MeSO₂-PCB durchgeführt. Aufeinanderfolgend wurden Frequenzberechnungen und Berechnungen der VCD-Parameter vorgenommen. Die berechneten Frequenzen schienen systematisch zu hoch zu sein. Deshalb wurde eine einfache Anpassungsprozedur mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate und eines einheitlichen Skalenfaktors unter Verwendung der dominantesten Banden im experimentellen VCD-Spektrum, vorgenommen. Alle Skalenfaktoren lagen in der Größenordnung zwischen 0,983 und 0,988.

4.4. *Resultate*

Abb. 25 zeigt das unpolarisierte Infrarotspektrum vom MeSO₂-PCB 3-149. Die C-H-Streckschwingungen der Phenylringe lagen über 3000 cm⁻¹ und etwas unterhalb 3000 cm⁻¹ die C-H-Streckschwingungen der aliphatischen Methylgruppe. Die Banden im Bereich zwischen 1400 und 1600 cm⁻¹ wurden den Deformationsschwingungen der Phenylringe zugeordnet. Weitere Banden in der Region unter 1400 cm⁻¹ entsprachen den *out-of-plane*-Schwingungen der aromatischen Ringe und den Deformationsschwingungen der Sulfonylgruppe. Die Geometrieoptimierung führte zu Strukturen mit Minima in den respektiven Energiehyperflächen für alle vier in dieser Arbeit untersuchten MeSO₂-PCB-Enantiomere. Dieser Schluß kann aus dem *Faktum* abgeleitet werden, daß keine imaginären Frequenzen bei der Frequenzberechnung auftraten. Schlußendlich waren viele Schritte notwendig, um die Konvergenz-Kriterien zu erreichen. Eine Analyse der adäquaten Konvergenzparameter (d.h., Kräfte, die auf die einzelne Atome in den Molekülen wirken und ihre Verlagerung zwischen zwei Optimierungsschritten) hat offen gelegt, daß die Kräfte im Verlauf der finalen Optimierungsschritte rapide abnahmen. Auf der anderen Seite, blieb die Verlagerung der Kräfte relativ groß, bis die Konvergenzzone erreicht werden konnte, was indiziert, daß die Minima der Energiehyperflächen flach sind. Die Winkel zwischen den Ebenen der beiden Phenylringe lagen zwischen 88° bis 90°, d.h., in allen vier hier betrachteten Fällen, erreichten die Ringe eine fast rechtwinklige Stellung zueinander.

Zuerst wurde das VCD-Spektrum für die optimierte Geometrie des 3-149 berechnet (**Abb. 26**), aber der Vergleich zu den experimentellen Spektren der beiden Enantiomere lieferte unbefriedigende Resultate. Da aus der Literatur gut bekannt ist, daß lokale Konformationen einen signifikanten Einfluß auf die VCD-Spektren ausüben können, wurde daraufhin die Energiehyperfläche für die Rotation der Methylsulfonylgruppe um die C-C-Bindung in die Berechnungen einbezogen.^[128] Die Energie des Moleküls wird in **Abb. 27** in Abhängigkeit vom Winkel zwischen den Atomen 1/2 und den Atomen 3/4, dargestellt (die Zuordnung der Atome 1-4 erfolgt in **Abb. 26**). Offensichtlich wurden drei unterscheidbare Energieminima beobachtet. Zwei der drei Strukturen sind bezüglich dieser Energieminima gleich, sie unterscheiden sich nur dadurch, daß sich der MeSO₂-Substituent auf verschiedenen Seiten der benachbarten Phenylringe befindet. Diese Strukturen wären identisch, wenn das Molekül eine Spiegelebene hätte, aber aufgrund der Chiralität des Moleküls gibt es eine kleine Energiedifferenz. Das dritte Minimum ist sehr flach und zeigt eine vergleichsweise hohe Energie.

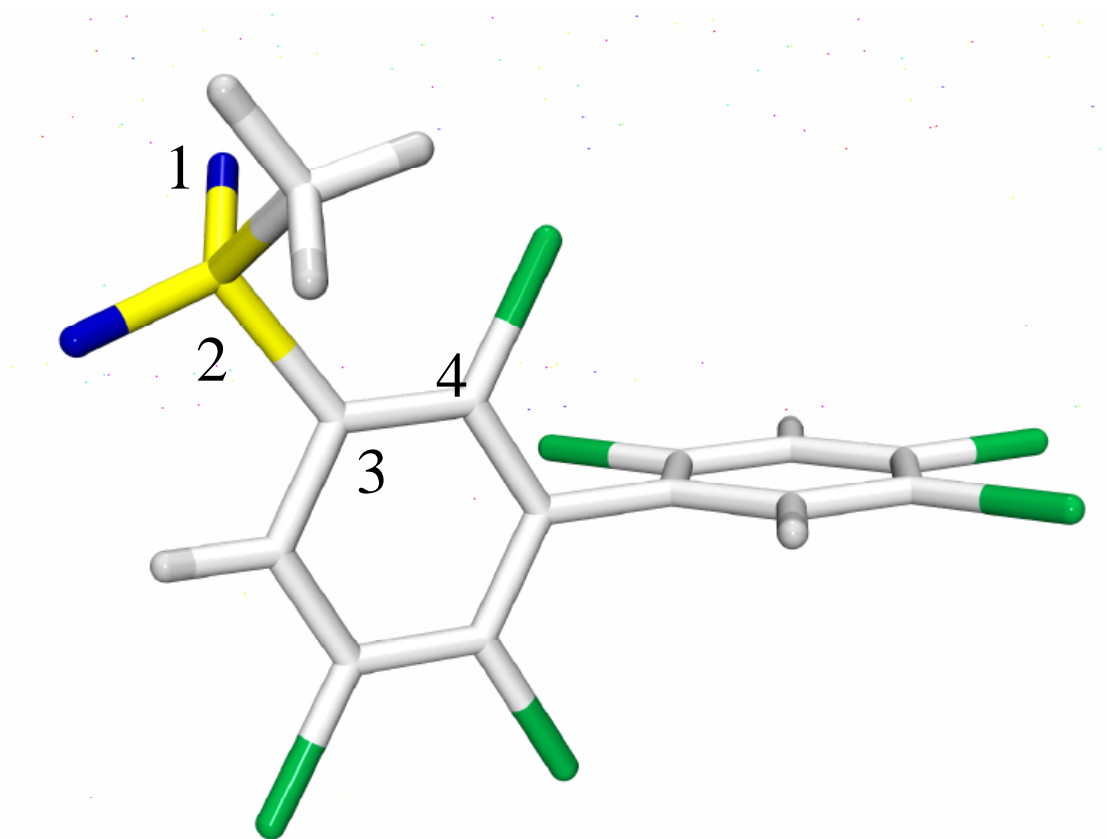


Abb. 26: Mit der Gauß 98-Software mit einem 6-31G* Basissatz im Rahmen der Dichtefunktional-Theorie in der Form der „Becke’s Drei-Parameter-Ansatz dichtefunktionaler Hybridmethoden“ in Kombination mit der Korrelationskorrektur von Lee, Yang und Parr (B3-LYP) berechnete Geometrie des MeSO₂-PCB 3-149

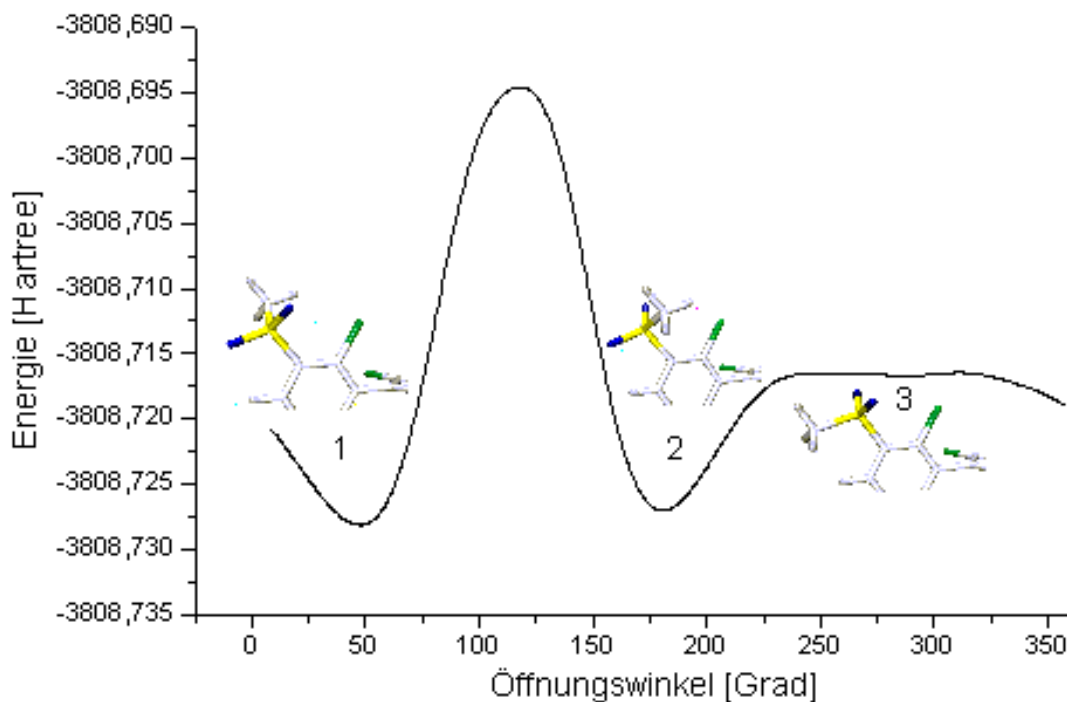


Abb. 27: Energiehyperflächen-Scan für die Rotation der MeSO₂-Gruppe des MeSO₂-PCB 3-149 mit Abbildungen der Energie-minimierten Geometrien

Auf Basis der drei Energieminima für die Rotation der Methylsulfonyl-Gruppe wurde die Optimierungsprozedur unter Berücksichtigung der Rotation um die C-C-Achse zwischen den beiden Phenylringen wiederholt, d.h., daß für die jeweiligen Berechnungen diesmal die Orientierung der MeSO₂-Gruppe in einer der drei Energieminima-Positionen fixiert wurde. Jede Berechnung führte zu einer unterschiedlich optimierten Struktur. Die folgende Frequenzanalyse für die berechneten Strukturen erbrachte keinen Hinweis auf imaginäre Frequenzen. Das impliziert, daß alle drei Konformationen des Moleküls Energieminima sind. Unter Berücksichtigung der Infrarotintensitäten für unpolarisiertes Licht wurden VCD-Intensitäten für die drei verschiedenen Konformere berechnet und VCD-Spektren, unter der Annahme, daß es sich um Lorentz-Banden mit einer Halbwertsbreite von 8 cm⁻¹ (geschätzt auf Grundlage der experimentellen Daten) handelt, für diese Resultate simuliert. Die resultierenden simulierten VCD-Spektren der verschiedenen Konformere werden in **Abb. 29** gezeigt. Es ist evident, daß einige der Banden sehr abhängig von der lokalen Konformation der MeSO₂-Gruppe sind, da sich alle Spektren auf ein Enantiomer beziehen. Eine genauere Betrachtung der Normalschwingungen, im Sinne der Eigenvektoren, in Abhängigkeit von der Konformation der MeSO₂-Gruppe zeigte, daß alle Bänder sensitiv auf signifikante Bewegungen der MeSO₂-Gruppe oder der benachbarten CH-Gruppe des Phenylrings antworten. Da die Vibrationsbewegungen schneller als die Rotationsbewegungen sind, würde man ein gemittelttes Ergebnis aus den verschiedenen Konformationen in diesem Experiment erwarten. Somit wurde ein Durchschnitt der simulierten VCD-Spektren für den Vergleich

zwischen Experiment und Kalkulation berechnet. Eine gleichwertige Population der zwei fast gleichen Konformere wurde vermutet. Das Spektrum des dritten Konformers wurde wegen seines höheren Energieniveaus, im Gegensatz zu den ersten beiden, nur zur Hälfte gewichtet.

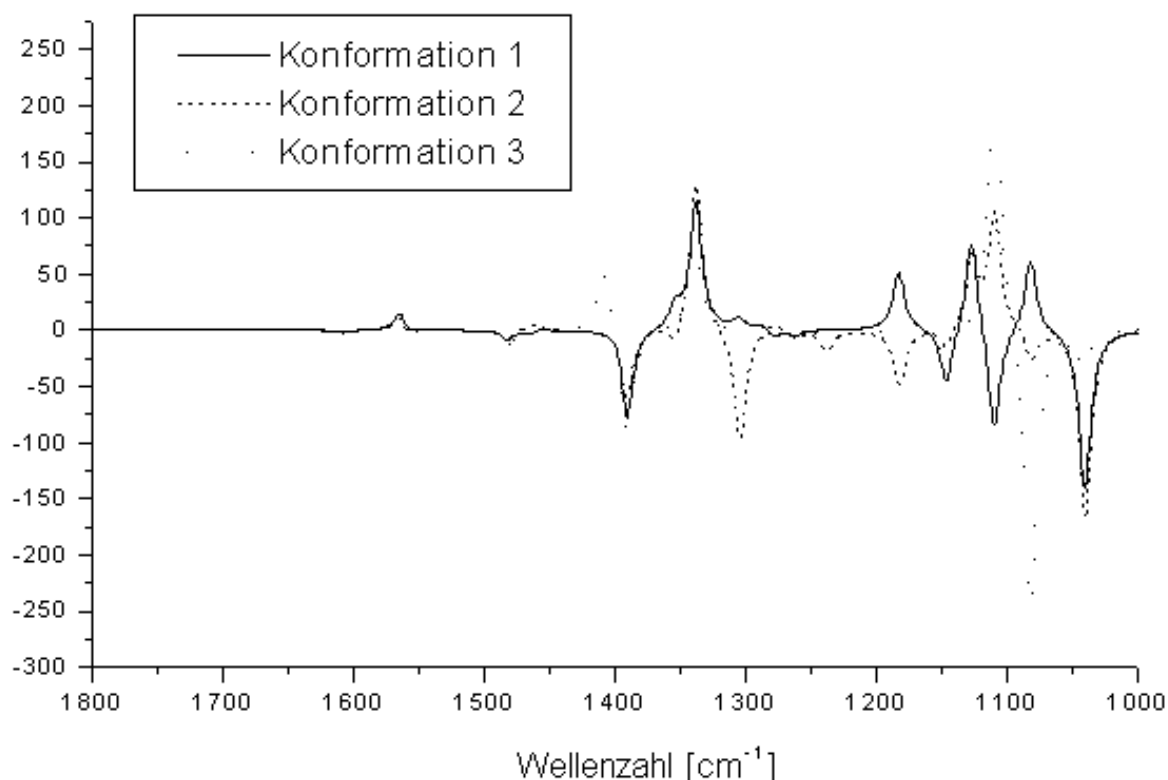


Abb. 28: Simulierte VCD-Spektren der verschiedenen Konformationen des $\text{MeSO}_2\text{-PCB}$ 3-149 (die Zuordnungen zu den Konformeren sind identisch mit **Abb. 27**).

Das experimentelle VCD-Spektrum des 3-149 ist in **Abb. 29** im Vergleich zum Durchschnitt der berechneten Spektren gezeigt. Die Spektren stimmen in dem Bereich von 1800 cm^{-1} bis 1200 cm^{-1} gut überein. Alle dominanten Banden in dem experimentellem Spektrum sind von den quantenchemischen Berechnungen reproduziert worden, obwohl einige Abweichungen der Wellenzahlen der Banden beobachtet wurden. Diese Abweichungen befinden sich in einem Bereich zwischen 5 und 15 cm^{-1} und liegen damit in einer Fehlerbreite, die von dieser Methode für die quantenchemischen Berechnungen erwartet werden kann. Unterhalb von 1200 cm^{-1} ist die Übereinstimmung zwischen den experimentellen und den berechneten Daten weniger zufriedenstellend, insbesondere weichen die simulierten von den beobachteten Intensitäten ab.

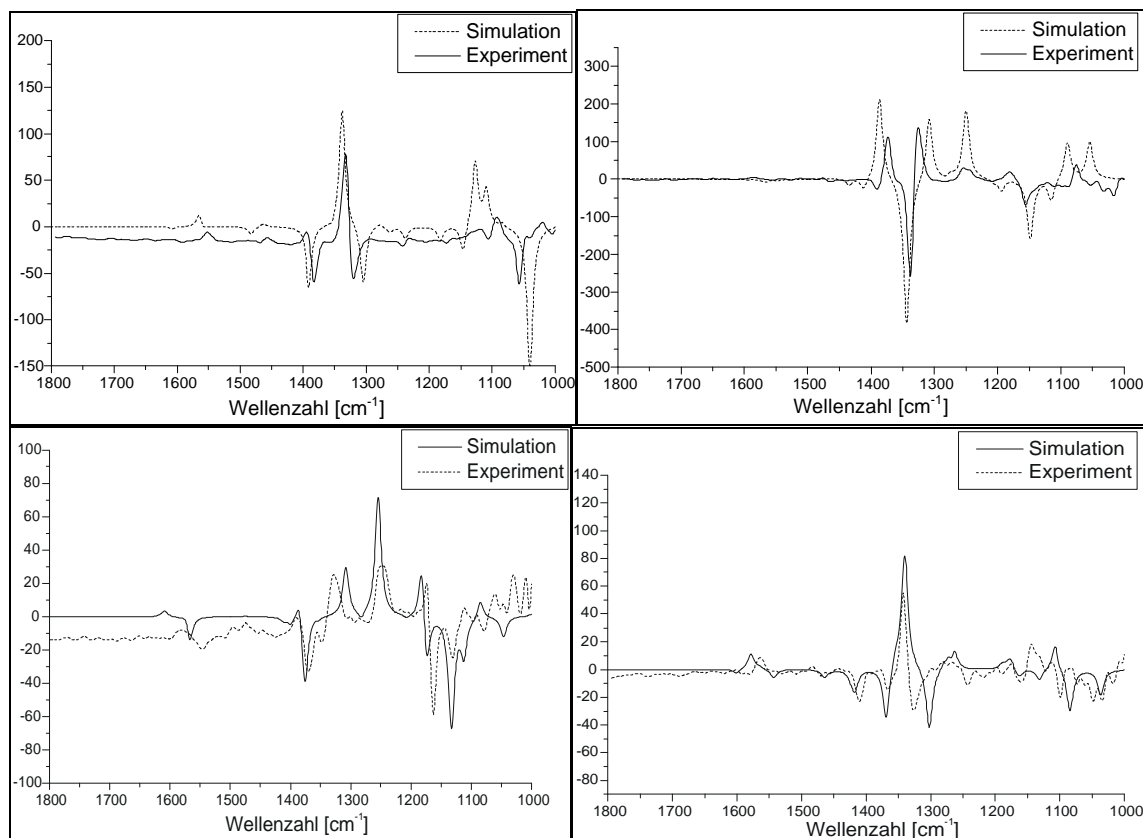


Abb. 29: Experimentelle und simulierte VCD-Spektren von a.) links oben: ersteluerendes Enantiomer des (*S*)-MeSO₂-PCB 3-149; b.) rechts oben: zweiteluierendes Enantiomer des (*R*)-MeSO₂-PCB 3-174; c.) links unten: ersteluerendes Enantiomer des (*R*)-MeSO₂-PCB 3-132; d.) rechts unten: ersteluerendes Enantiomer des (*R*)-MeSO₂-PCB 4-132

Ferner werden die experimentellen und simulierten Spektren des 3-174 in **Abb. 29** verglichen. Augenscheinlich ist dort eine gute Übereinstimmung, zwischen dem experimentellen und dem kalkulierten Spektrum, zu sehen. Verglichen mit dem 3-149 zeigen die dominanten Banden eine höhere VCD-Intensität. Im Gegensatz zu dem Spektrum des 3-149 sind keine Banden in einem Bereich über 1400 cm⁻¹ sichtbar. In der Region zwischen 1400 und 1100 cm⁻¹ wurde eine gute Übereinstimmung zwischen dem Experiment und der Kalkulation erhalten. Unterhalb von 1100 cm⁻¹ ist die Übereinstimmung zwischen dem Experiment und den berechneten Daten weniger zufriedenstellend.

Weiterhin zeigt **Abb. 29** die experimentellen und berechneten Spektren für das 3-132. Offenbar ist die Intensität der VCD-Banden deutlich niedriger als bei den Metaboliten 3-174 und 3-149. Dieser Befund entspricht aber auch den in der Simulation reproduzierten Resultaten. Insgesamt ist die Übereinstimmung zwischen den experimentellen und simulierten Daten mit den zuvor diskutierten Spektren vergleichbar. Die beste Übereinstimmung der intensivsten Banden wurde in der Region von 1600 bis 1100 cm⁻¹ beobachtet.

Schließlich werden in **Abb. 29** VCD-Spektren für das 4-132 dargestellt. Wie im Fall des 3-132 war die Intensität der Banden im Vergleich zu den anderen Kongeneren dieser Studie insgesamt niedrig. Das läßt vermuten, daß das Chlor-Substitutionsmuster dieses Kongeners generell zu niedrigen VCD-Intensitäten führt. Die Übereinstimmung zwischen den experimentellen und den berechneten Spektren ist etwas besser als im Fall des 3-132.

Die absoluten Strukturen der vier MeSO₂-PCB Enantiomere lassen sich aus den oben beschriebenen Daten schließen und werden in **Abb. 30** wiedergegeben. Es ist interessant zu beobachten, daß diese Strukturen sehr ähnlich aussehen. Zum Beispiel liegen bei allen vier Kongeneren die Winkel zwischen den Ebenen der beiden Phenylringe zwischen 88° und 90°, d.h., die Ringe erreichen zueinander eine fast rechtwinklige Konformation. Weiterhin sind die Methylsulfonylgruppen ebenfalls fast rechtwinklig bezüglich des mit ihnen verbundenen Phenylrings ausgerichtet.

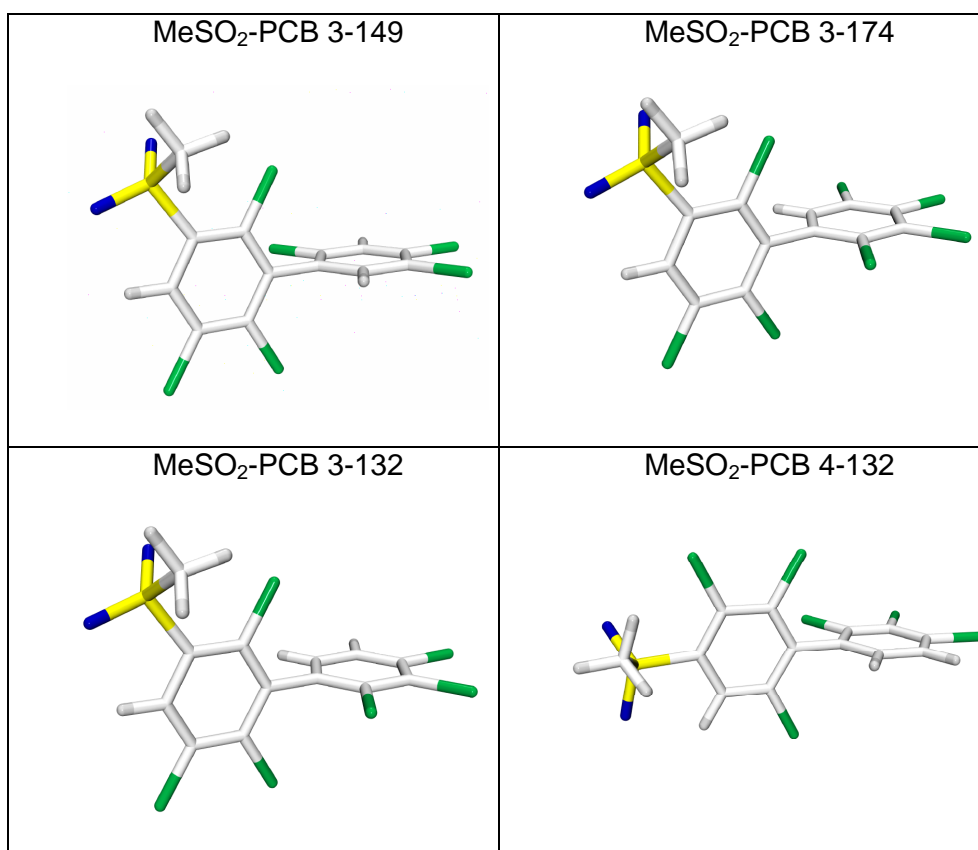


Abb. 30: Absolute Strukturen der vier MeSO₂-PCB Enantiomere, die in dieser Arbeit untersucht wurden: a.) links oben: ersteluerendes Enantiomer des (*S*)-MeSO₂-PCB 3-149; b.) rechts oben: zweiteluierendes Enantiomer des (*R*)-MeSO₂-PCB-3-174; c.) links unten: ersteluerendes Enantiomer des (*R*)-MeSO₂-PCB 3-132; d.) rechts unten: ersteluerendes Enantiomer des (*R*)-MeSO₂-PCB 4-132

Schließlich läßt sich die *R*- und *S*-Konfiguration für diese MeSO₂-PCB nach der IUPAC-Nomenklatur bestimmen, nachdem wir Kenntnis von der absolute Struktur erhalten konnten. Dazu geht man von der Biphenylachse als „stereogenes Zentrum“ aus. Dazu faßt man die beiden C-Atome, über die die beiden im 90°-Winkel zueinander stehenden Phenylringe verknüpft sind (also die 1- und 1'-Positionen) formal zu einem fiktiven stereogenen Zentrum zusammen. Danach werden analog zur Vorgehensweise bei einem realen stereogenen C-Atom die Prioritäten nach den CIP-Regeln zunächst in den insgesamt vier *ortho*-Positionen der vier Ringe ermittelt. Sollte damit noch keine eindeutige Prioritätenfolge von 1 – 4 erreicht sein, fährt man – gemäß den üblichen CIP-Regeln – mit den *meta*- und gegebenenfalls *para*-Positionen fort (Die Reihenfolge der vorkommenden Substituenten ist: Chlor > Schwefel (Methylsulfonylgruppe) > Wasserstoff).^[129]

Nach der Festlegung der Prioritätenfolge erfolgt die räumliche Anordnung der Substituenten im Grunde genommen analog der eines asymmetrisch substituierten Kohlenstoffatoms mit tetraedisch angeordneten Substituenten. Hierzu blickt man frontal auf die Längsachse des MeSO₂-PCB-Moleküls, so daß sich der vordere Phenylring z.B. in einer vertikalen und der dahinter liegende in einer horizontalen Position aus der Sicht des Betrachters befindet. Hilfreich und für die sichere Bestimmung der *R*- und *S*-Konfiguration unbedingt ratsam ist es, ein Molekülmodell eines asymmetrisch substituierten Kohlenstoffatoms zur Hand zu nehmen und die Prioritätenfolge in der Weise darauf zu übertragen, daß die vorderen beiden auf den Betrachter zeigenden Substituenten eine vertikale und die beiden weiter vom Betrachter entfernten Substituenten eine horizontale Position einnehmen. Die Biphenylachse des PCB-Metaboliten entspricht dabei dem asymmetrischen Kohlenstoffatom des Molekülmodells. Sind alle Substituenten in der Prioritätenfolge auf das Modell übertragen, erfolgt die Bestimmung der *R*- bzw. *S*-Konfiguration sehr einfach nach den CIP-Regeln für asymmetrisch substituierte Kohlenstoffatome.^[130] Die **Tabelle 12** zeigt eine Übersicht über die *R*- und *S*-Konfigurationen der MeSO₂-PCB bezüglich der Elutionsreihenfolgen der mittels HPLC und GC getrennten Enantiomere.

Tabelle 12: Übersicht und Zuordnung der R- und S-Konfigurationen der MeSO₂-PCB zu den Elutionsreihenfolgen der Enantiomere für die unvollständig und die permethylierte **b**-CD-HPLC-Säulen und die 2,3-Me-6-TBDMS-**b**-CD-GC-Säule (20% in SE 52)

MeSO ₂ -PCB	HPLC		GC	
	Elutionsreihenfolge		Elutionsreihenfolge	
	1	2	1	2
3-149	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>
3-174	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>
3-132	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>
4-132	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>

4.5. Zusammenfassung

Möglicherweise ist die VCD-Spektroskopie in Verbindung mit quantenchemischen *ab initio* Berechnungen die einzige Methode, die diese Art von Informationen für die MeSO₂-PCB liefern kann, da es fast unmöglich scheint, von diesen Verbindungen brauchbare Einkristalle für die Röntgenstrukturanalyse zu erhalten. Zum ersten Mal konnte für relativ komplexe und flexible Moleküle, wie die PCB-Metaboliten, gezeigt werden, daß unsere experimentelle Herangehensweise eine wirkungsvolle Methode für die Bestimmung der absoluten Konfiguration derartiger chiraler Substanzen eröffnet hat.

5. Untersuchung verschiedener toxikologischer Effekte der MeSO₂-PCB und ihrer Mutterverbindungen

5.1. *Disruptive Einflüsse ausgewählter MeSO₂-PCB Enantiomere auf den Glucocorticoid-abhängigen Signalübertragungspfad*

Bisher werden die PCB-Metaboliten in Toxizitätsabschätzungen für PCB-belastete Umweltkompartimente regelmäßig ignoriert. Dieses Vorgehen ist nicht mehr länger nachvollziehbar, wenn man die unter 1.4.3 genannten toxischen Effekte berücksichtigt. Unterstrichen wird die Forderung der Einbeziehung der PCB-Metaboliten in Toxizitätsabschätzungen auch dadurch, daß weitere Erkenntnisse aus Untersuchungen von Johansson *et al.* vorliegen, die belegen, daß verschiedene MeSO₂-PCB in der Lage sind, z.B. die in den Nebennierenrinden beherbergte Glucocorticoidsynthese zu inhibieren. Da dieser Effekt bei den Mutterverbindungen nicht festgestellt wurde, kann davon ausgegangen werden, daß nur die Metaboliten dafür verantwortlich sind.^[131] Einige MeSO₂-PCB störten die glucocorticoide Homöostase durch Bindung an den Glucocorticoid-Rezeptor (GR). Vier der optisch aktiven MeSO₂-PCB waren in der Lage, beide Funktionen zu beeinträchtigen.^[132] Glucocorticoide sind energiemobilisierende katabole Hormone, die die Gluconeogenese ankurbeln, sowie den Fett- und Proteinabbau fördern. Die Glucocorticoide werden aus Cholesterin hauptsächlich mittels der Cytochrome P450-Familie synthetisiert. Der finale Biosyntheseschritt besteht in der Umwandlung von 11-Deoxycortisol zu Cortisol mittels der CYP11B1. In der Medizin werden chemisch leicht veränderte Cortisone vor allem als antiallergene, schmerzlindernde und immunsuppressive Medikamente eingesetzt.

5.1.1. *Experiment*

Zwar ist bekannt, daß pharmakologische oder toxische Effekte von chiralen Pharmaka oft nur auf ein Enantiomer zurückzuführen sind, aber über chirale Umweltschadstoffe ist in dieser Hinsicht nur wenig bekannt, noch weniger über ihre Metaboliten. Deshalb ist es erforderlich, das Wissen über die Wirkweise und das toxische Potential der MeSO₂-PCB auszudehnen, um die riesigen „weißen Flächen“ auf der „Landkarte“ dieser *terra incognita* auszufüllen. Lange Zeit konnten diese Experimente aufgrund des Mangels an enantiomerenreinen Verbindungen nicht vorgenommen werden. Da diese MeSO₂-PCB jetzt enantiomerenrein vorliegen, konnten entsprechende toxikologische Untersuchungen in Kooperation mit M. Johansson und C. Larsson durchgeführt werden.^[133] Konkret sollte der Einfluß der reinen MeSO₂-PCB-

Enantiomere auf die Transkriptionsrate des Glucocorticoid-Rezeptor-abhängigen Enzyms Tyrosinaminotransferase (TAT) untersucht werden.

Die Funktionsweise des Glucocorticoid-Rezeptors läßt sich wie folgt skizzieren: Allgemein gehört der GR zu der „Kern-Rezeptor-Familie“. Der erste Schritt besteht in der Bindung eines Liganden an den GR. Durch dessen Bindung wird der GR-„heat-shock“-Protein(hsp)-Komplex gespalten, hsp löst sich ab. Bei den Liganden handelt es sich im Normalfall um Steroidhormone wie Dexamethason, die an ihren Rezeptor sehr selektiv binden können. Sie bewirken eine Verstärkung der Transkription. Detaillierter beschrieben, ist der aktivierte Liganden-Rezeptor-Komplex nun in der Lage, an das Glucocorticoid-Response-Element (GRE) der DNA zu binden. Ähnlich wie beim Ah-Rezeptor wird dadurch eine Verstärkung der DNA-Transkription ausgelöst. Die Bindung eines Steroidhormons an den Rezeptor wandelt diesen in einen Transkriptionsverstärker um; spezifische Gene werden nun exprimiert. TAT ist ein Enzym, dessen Transkription vom Glucocorticoid-Rezeptor abhängt. Binden MeSO₂-PCB kompetitiv stärker an den GR als Dexamethason, blockieren sie diesen und erniedrigen in der Folge die Transkriptionsrate des TAT-Enzyms. Die weitere experimentelle Vorgehensweise und Details sind im **Experimentellen Teil** unter **10.2** zu finden.

5.1.2. Ergebnisse

Die maximale TAT-spezifische Aktivität wurde erreicht, indem die Zellen 18 Stunden einer 1µM Dexamethason-Lösung ausgesetzt wurden. Bei dieser Dexamethason-Konzentration war die spezifische TAT-Aktivität sechsfach gegenüber dem Basisniveau erhöht (27 ± 4 nmol/mg/min, Durchschnittswert \pm SD mit n=3). In den Effektstudien wurde eine Konzentration von 1nM Dexamethason verwendet, um eine spezifische TAT-Aktivität von 50% der maximalen Aktivität zu induzieren.

Die Effekte der Dexamethason-induzierten spezifischen TAT-Aktivität wurden 18 Stunden nach Gabe der reinen 3-149- und 4-149-Enantiomere registriert (**Abb. 31**). Beide Enantiomere des 4-149 inhibierten die spezifische TAT-Aktivität dosisabhängig. Bei einer Konzentration von annähernd 1 µM, inhibierten sie 50 % der TAT-Aktivität (IC₅₀). Das zweiteluierende Enantiomer inhibierte die durch Dexamethason angeregte Induktion bei einer Konzentration von 2 µM vollständig, während das andere auch bei einer Konzentration von 4 µM den Basiswert nicht erreichte. Im Gegensatz dazu, zeigte keines der Enantiomere des 3-149 Effekte auf die spezifische TAT-Aktivität.

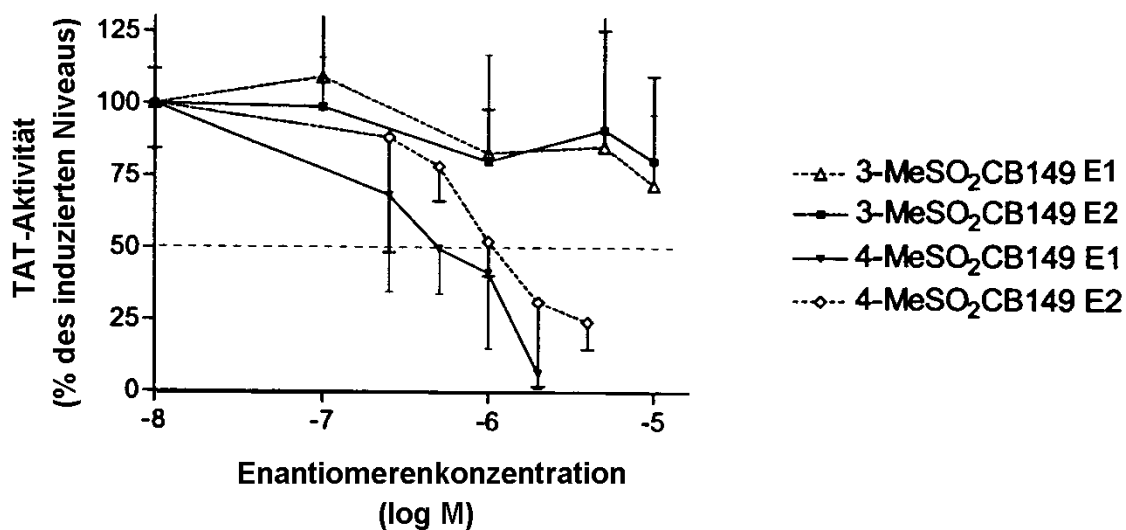


Abb. 31: Effekte der enantiomeren MeSO₂-CB149 auf Dexamethason-induzierte TAT-Aktivität in der hepatozytischen Reuber-Ratten Zelllinie. Die Zellen wurden Dexamethason (1nM) exponiert und die einzelnen Enantiomere (0,1-5 µM) 18 Stunden in dem Medium belassen. Die Konzentration von 10⁻⁸ M in dem Graph repräsentiert die Abwesenheit der Enantiomere, so daß dort die TAT-Aktivität gleich 100% gesetzt wurde. Bei dieser Konzentration konnten keine Anzeichen der Toxizität festgestellt werden. Jeder Meßpunkt repräsentiert den Durchschnittswert ± SD aus drei Messungen

5.1.3. Diskussion

Die Dexamethason-induzierte TAT-Aktivität wurde als eine *in-vitro*-Test-Variable verwendet, um die Unterschiede zwischen den Enantiomeren des 3- und 4-149 bezüglich des Glucocorticoid-abhängigen Signalübertragungspfades zu studieren. In einer Studie von 1998 zeigten Johansson *et al.*, daß die racemischen 3- und 4-MeSO₂-PCB 149 dosisabhängig mit ³H-Dexamethason um die Bindung an den Mäuse-GR (extrahiert aus dem Leberzytosol) konkurrierten.^[131] Interessanterweise waren alle getesteten MeSO₂-PCB, die an den Mäuse-GR banden, Atropisomere. Unsere Ergebnisse zeigen, daß beide Enantiomere des 4-149 Auswirkungen auf den Glucocorticoid-abhängigen Signalübertragungspfad hatten, während dies bei beiden Enantiomere des 3-149 nicht der Fall war. Diese Beobachtung befindet sich in Einklang mit einer Studie des gleichen Zelltyps, in der das racemische 3-149 ebenfalls keine Effekte zeigte (Johansson *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Die Konzentrationen, die für inhibitorische Effekte (IC₅₀) benötigt wurden, waren fast dieselben für die Enantiomere und das Racemat des 4-149, obwohl es eine deutliche Abweichung bezüglich des IC₁₀₀-Wertes gab. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß der GR nicht enantiopräferiert von den MeSO₂-

PCB inhibiert wird, der GR somit über keine enantioselektive Erkennung bezüglich der MeSO₂-PCB verfügt. Allerdings unterschieden sich sehr wohl die Stellungsisomere 3-149 und 4-149 in ihren inhibitorischen Effekten. Die *para*-Position des 4-149 bewirkte eine stärkere Inhibierung des GR, vermutlich deshalb, weil dieses Molekül aufgrund seiner Linearität weniger sterische Hinderungen verursachte.

5.2. *Abbauverhalten von chiralen PCB-Verbindungen in Hepatozyten*

Eines der zentralen und wichtigsten Organe für den Stoffwechsel ist zweifellos die Leber. So wird z.B. beim Menschen wird ein Leberblutfluß von 1,5 L Blut/min erreicht. Deshalb hat dieses hochaktive Organ mit großer metabolisierender Aktivität unter Toxikologen vorrangige Beachtung gefunden und in zahllosen Publikationen über hepatische Prozesse einen entsprechenden Niederschlag gefunden. So ist es nicht verwunderlich, daß gerade die Hepatozyten auch im Zentrum der PCB-Forschung stehen. Nicht zu unrecht erhofft man sich davon entscheidende Erkenntnisse über den Abbaumechanismus der ubiquitären PCB sowie der Wirkungsweise vor allem der PCB-Metaboliten.

Ein Schritt in diese Richtung wurde von Larsson *et al.* dadurch getätigt, daß Ratten eine einmalige Gabe von 25 mg/kg Körpergewicht Chlophen A 50 verabreicht wurde. Die Ratten wurden im Abstand von je zwei Wochen getötet und anschließend ihre Lebern auf PCB und MeSO₂-PCB untersucht.^[134] Die Konzentrationen der Muttersubstanzen nahm linear ab, während die Konzentrationen der MeSO₂-PCB in der zweiten Woche ein Maximum erreichten, und danach kontinuierlich abnahmen (**Abb. 32**). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Langzeituntersuchung von Brown *et al.*, die PCB-Konzentrationen im Blutserum von Arbeitern einer Kondensatorenfabrik vor und nach PCB-Exposition über einen Zeitraum von 16 Jahren untersuchten.^[49]

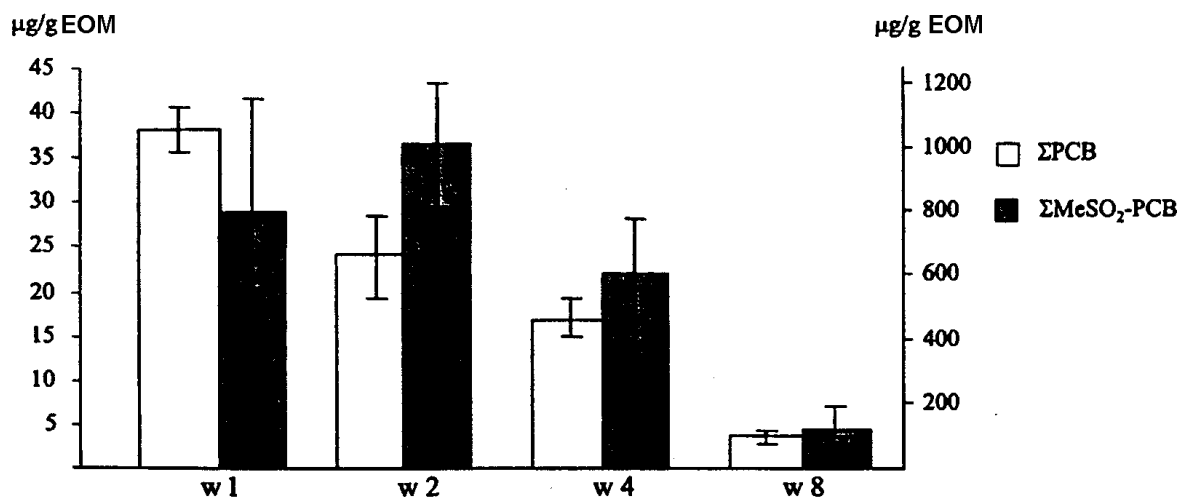


Abb. 32: Σ PCB und Σ MeSO₂-PCB Konzentrationen in Rattenlebern, 1,2,4,8 Wochen (= W1-W8) nach Behandlung mit Chlophen A50. Die schmalen Balken repräsentieren die Standardabweichung mit n = 4 ^[134]

Ein genauerer Blick auf die untersuchten chiralen MeSO₂-PCB zeigte, daß in 4-Position substituierte Metaboliten gegenüber den in 3-Position substituierten in der Rattenleber in der Überzahl entstanden waren. ^[135] In einer weiteren Untersuchung wurden Ratten die reinen radioaktiv markierten Enantiomere des 3-149 und das radioaktiv markierte 4-149 als Racemat *intra venös* injiziert. Das racemische 4-149 zeigte eine geringe Exkretion in die Galle bzw. Intestinaltrakt und bestätigt somit die in der vorhergehenden Untersuchung gefundene höhere Akkumulation der an 4-Position substituierten MeSO₂-PCB in der Leber. Ähnlich geringe Exkretionsraten zeigt auch das (*R*)-3-149 Enantiomer. Die in Galle und Intestinaltrakt gefundene Radioaktivität stammte nahezu vollständig von dem ersteluirenden Enantiomer. ^[133]

Die Untersuchungen konnten allerdings nicht abschließend klären, ob entweder eine enantioselektive Bildung der MeSO₂-PCB aus den PCB erfolgt oder ob das ersteluirende Enantiomer verstärkt abgebaut wird. Die Vermutung lag nahe, daß letzteres zutreffen könnte.

Um diese These zu beweisen, wurde von mir folgendes Experiment vorgenommen: Mit einer Nährlösung präparierte Rattenhepatozyten sollten mit racemischen PCB 149 und in einer zweiten Petrischale mit racemischen 3-149 Metaboliten versetzt und zwölf Stunden inkubiert werden. Nach der Aufarbeitung erfolgte die Untersuchung mittels GC und GC/MS auf enantioselektives Metabolisierungsverhalten (Experimentelle Details und Durchführung s.10.3)

5.2.1. Resultate

Die Muttersubstanz, das PCB 149, wurde nach zwölfstündiger Inkubationszeit auf etwa die Hälfte abgebaut. Da es in diesem Experiment auf qualitative Aussagen ankam, wurde auf die aufwendige Verifizierung der Methode verzichtet. Insofern muß die Abbaurrate von 50 % als halbquantitative Schätzung betrachtet werden, die sich als Mittelwert nach dreimaliger Durchführung des Experiments ergab. Wie in **Abb. 33** zu sehen ist, erfolgte ein etwa 50 %iger, aber nicht enantioselektiver, Abbau des PCB 149 nach besagter Inkubationszeit.

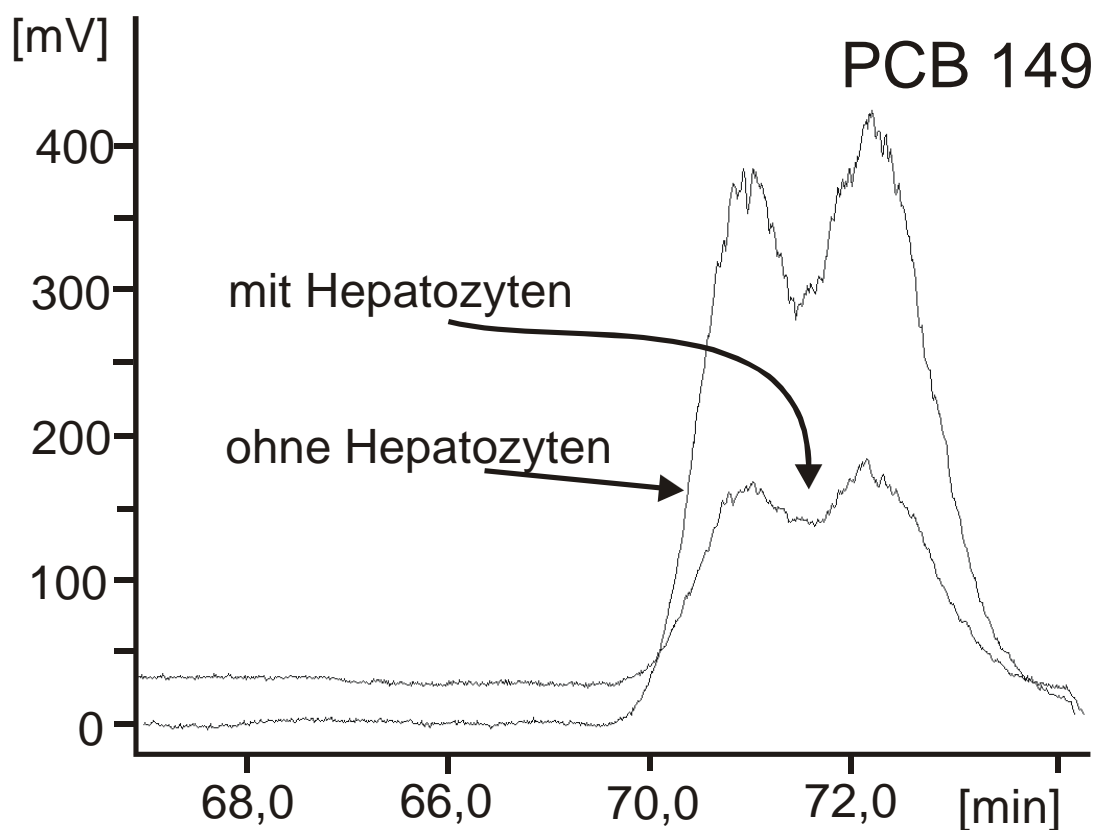


Abb. 33 : Auf der 25 m langen chiralen 2,3-Me-6-TBDMS-*b*-CD-Säule (50 % in OV 1701) Säule angetrennte PCB149-Enantiomere mit und ohne Zugabe von Hepatozyten nach jeweils zwölfstündiger Inkubationszeit

Vergleicht man jedoch das Abbauverhalten des PCB-Metaboliten 3-149 bei Inkubation mit 10 Mio. Hepatozyten und einer ebenfalls zwölfstündigen Inkubationszeit mit dem des PCB 149, stellt man einen enantioselektiven Abbau des ersteluirenden Enantiomers fest (**Abb. 34**). Dieses Ergebnis bezüglich des 3-149 wurde in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen von einigen weiteren Untersuchungen erzielt.^[105,133,135,136] Allerdings wurde bisher noch kein Vergleich zwischen dem enantioselektiven Abbauverhalten der Muttersubstanz und des Methylsulfonylmetaboliten angestellt.

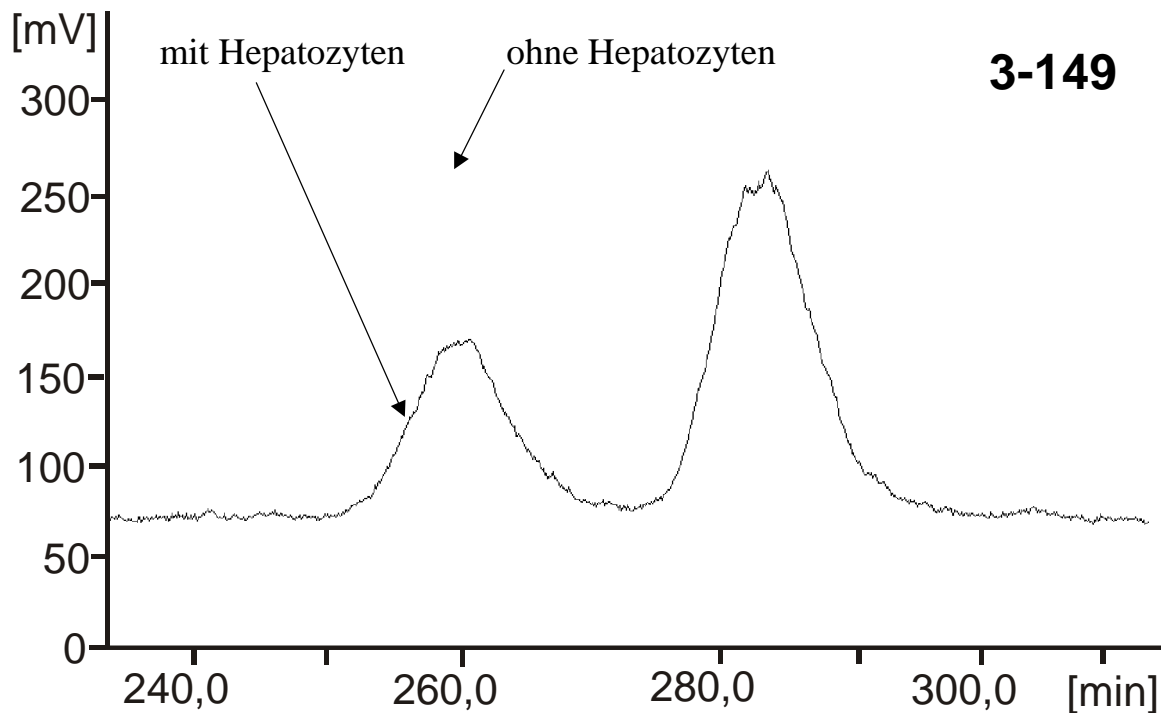


Abb. 34: Auf der 15 m langen chiralen 2,3-Me-6-TBDMS-*b*-CD-Säule (20% in SE 52) gaschromatographisch vollständig getrennte Enantiomere des PCB-Metaboliten 3-149 mit und ohne Zugabe von Hepatozyten nach jeweils zwölfstündiger Inkubationszeit

5.2.2. Diskussion

Das Abbauverhalten des PCB 149 ist im Vergleich zu seinem Metaboliten 3-149 nicht enantioselektiv. Wird davon ausgegangen, daß hauptsächlich MeSO₂-PCB aus den abgebauten Muttersubstanzen gebildet wurden, muß folglich geschlossen werden, daß die für den Metabolismus zum Methylsulfonyl-Abbauprodukt verantwortlichen Cytochrome und weiteren Enzyme keinen chiralen Diskriminierungsschritt enthalten. Anzumerken ist, daß keine MeSO₂-PCB als Abbauprodukte gefunden werden konnten. Das heißt allerdings nicht, daß keine MeSO₂-PCB entstanden sind. Möglicherweise wurden sie so fest an Proteine gebunden, daß sie trotz eingehender Aufarbeitungsschritte chromatographisch nicht nachzuweisen waren.

Sofern die racemischen 3-149 Metaboliten entstanden sind, werden sie entweder enantioselektiv weiter metabolisiert oder enantioselektiv transportiert. Experimente mit Hepatozyten sind diesbezüglich sehr sinnvoll, weil sie eine vom restlichen Organismus

getrennte Betrachtung der Leber und somit Rückschlüsse auf die ihre spezifische Arbeitsweise erlauben.

Weitere Experimente mit radioaktiv markierten Verbindungen müssen Klarheit darüber liefern, um welchen Prozeß es sich handelt. Interessant ist jedoch die Feststellung, daß im Falle der weiteren Metabolisierung spezifischere, d.h. enantioselektiv arbeitende Enzyme in den Prozeß einzugreifen scheinen. Vor allem aber müßte es sich um andere Enzymsysteme handeln, die die weitere Metabolisierung der etwas polareren MeSO₂-PCB übernehmen. Fraglich ist, ob es sich, analog zu den Mutterverbindungen, ebenfalls um einen autoinduktiven Mechanismus der Cytochromaktivierung handelt. Das müßte sich in Gegenwart der MeSO₂-PCB in einer erhöhten Aktivität bestimmter Cytochrome äußern.

Auf der anderen Seite ist nicht auszuschließen, daß der enantioselektive Schritt auf einem enantioselektiven Transport zu den Ausscheidungsorganen beruht, auch in Anbetracht der Ergebnisse von Johansson *et al.*^[133] Fraglich bliebe aber, warum der Organismus gerade in einem die Ausscheidung betreffenden Vorgang ein Enantiomer retardieren sollte, während das andere ausgeschieden wird.

6. Biotaprobieren

6.1. Einleitung

Umfassende Analysen von Biota der verschiedenen trophischen Stufen auf PCB und MeSO₂-PCB wurden bereits im Bereich des marinen Ökosystems durchgeführt.^[28,136] Sehr lückenhaft sind bisher hingegen die Untersuchungen an terrestrischer Biota der verschiedenen trophischen Stufen. Deshalb führten wir umfassende Studien über PCB und MeSO₂-PCB in Zusammenarbeit mit L. Karasek (Veterinärinstitut, Prag) von Reh- (*Capreolus capreolus*) und Wildschweinproben (*Sus scrofa*) aus Dessau, Füchsen aus Schleswig-Holstein (*Canis vulpes*), einem Pelikan (*Pelecanus occidentalis*) aus dem Prager Zoo und Humanproben, ebenfalls aus Prag, durch, um ein möglichst breites Spektrum verschiedener terrestrischer Lebewesen abzudecken. Nicht zuletzt ist der Mensch als Endglied des Nahrungsnetzes von besonderem Interesse bei derartigen Untersuchungen.

Die Reh- und Wildschweinproben stammen aus der Region um Dessau, unweit der ehemaligen Chemiekombinate Bitterfeld. Diese Region wurde aufgrund der erheblichen Umweltverschmutzung zu DDR-Zeiten ausgewählt. Fraglich war, wie sich die Situation nach mehr als einem Jahrzehnt nach Stilllegung der Betriebe darstellen würde, zumal, je nach Produktionsaktivität, orangefarbene Flüsse, bisweilen gelbe Luft, der „Silbersee“ und viele andere heute unvorstellbare Umweltverschmutzungen aus dieser Region zu trauriger Berühmtheit gelangt sind. Die Füchse stammen aus der industriell relativ wenig belasteten Region Schleswig-Holstein. Der Pelikan ist als ein illustratives und comparatives Beispiel zu sehen, der sich im Gegensatz zu allen anderen hier untersuchten Lebewesen hauptsächlich von Fisch ernährt. Der Großraum um Prag gilt, ebenso wie die Bitterfeld-Region, als relativ stark mit chlororganischen Substanzen belastet.

Speziell für die Dessauer Proben und die Füchse sollte zudem ein umfassendes Bild zur PCB-Belastung, erstellt mit folgenden 19 PCB-Kongeneren, erarbeitet werden: Die DIN-PCB 28, 52, 101, 138, 153 und 180, also Vertreter der niedrig-, mittel- und hochhalogenierten PCB, die in praktisch allen technischen Gemischen in höheren Konzentrationen vorkommen, die Atropisomere 91, 95, 132, 149 und 174, die Coplanaren „Dioxin-ähnlichen“ PCB 77, 81, 126 und 169, die mono-*ortho* PCB 105 und 118, die zu den *mixed-type-inducern* zählen, das di-*ortho* PCB 170 sowie das PCB 187 als ein weiterer Vertreter der hochhalogenierten PCB-Kongeneren. Außerdem sollten die atropisomeren MeSO₂-PCB 3-91, 4-91, 4-95, 3-132, 4-132, 3-149, 4-149, 3-174 und 4-174 nachgewiesen werden. Die Zusammenstellung der PCB der in Prag untersuchten Proben folgte einer etwas anderen Schwerpunktsetzung. Zum Teil wurde der Schwerpunkt auf andere PCB gelegt, insbesondere viele der höherhalogenierten Kongeneren waren in den dortigen Untersuchungen vertreten. Die Human- und Pelikanproben wurden auf folgende 45 PCB hin untersucht: 8, 18, 28, 31, 44, 47, 49, 52, 56, 66, 70, 74, 84,

87, 91, 95, 97, 99, 101, 105, 110, 129, 132, 137, 138, 141, 146, 149, 151, 153, 156, 157, 163, 167, 170, 180, 183, 187, 189, 194, 195, 199, 202, 203, 206, 209.

Als Vertreter für Wildtiere wurden zunächst Rehe als relativ standorttreues Wild ausgesucht. Sie eignen sich zudem sehr gut als Bioindikator, weil sie als Herbivore den Schadstoffbelastungen der Pflanzen ihrer unmittelbaren Umgebung direkt ausgesetzt sind. Weiterhin wurden Wildschweine, ebenfalls aus dem größeren Gebiet um Dessau, welches nördlich von Bitterfeld liegt, in die Studie einbezogen, weil sie Allesfresser sind und ein höheres Bioakkumulationspotential als Rehe aufweisen sollten. Nicht zuletzt stand der Mensch im besonderen Focus dieser Untersuchung, weil er am oberen Ende des Nahrungsnetzes steht und deshalb aufgrund des sehr hohen Bioakkumulationspotentials auf eine möglichst unbelastete Nahrung, zu der eben auch Rehe und Wildschweine gehören, achten sollte, sofern er nicht das Erbe früherer Umweltsünden *via* Muttermilch an die nachfolgenden Generationen weitergeben will. Außerdem wurden drei Füchse (*Canis vulpes*) aus Schleswig-Holstein untersucht. Die Füchse sind Carnivore und sollten demzufolge das höchste Bioakkumulationspotential aufweisen. Allerdings stammen sie aus dem wenig industrialisierten Schleswig-Holstein, so daß eher eine geringe PCB-Belastung zu erwarten war, zumal die Füchse nicht älter als fünf Monate waren.

Neben der Zusammenstellung der zu untersuchenden Analyten, war die Wahl der untersuchten Organe bzw. Gewebe sehr wichtig. Bereits *Bachour et al.* untersuchten in ihrer Studie Gehirne, Lebern und Muskelgewebe u.a. von hessischen Füchsen und Rehen.^[137] Nur bei den von ihnen untersuchten Humanproben ermittelten sie auch die PCB-Gehalte in der Lunge und fanden hohe Werte. Sie führten die hohe Akkumulation der PCB-Kongenere auf ein PCB-bindendes Protein zurück. Die Arbeiten von *Lund et al.* mit dem Methylsulfonyl-Metaboliten des 2,2',5,5'-tetrachlorbiphenyls, sowie die vorhergehende Arbeit von *Brandt et al.*, die sich mit den Muttersubstanzen beschäftigte, lieferten den Grund für die Annahme der Existenz eines PCB-bindenden Proteins in der Lunge.^[117,138-140] So wurden neben der Leber und dem Fettgewebe als wichtige Zielorgane für die lipophilen Kontaminanten auch die bisher als Zielorgan für PCB bisher wenig beachtete Lunge in die Untersuchung von Reh-, Wildschwein- und Fuchsproben mit einbezogen, um auch bezüglich der Verteilung der PCB auf die Zielorgane ein möglichst umfassendes Bild zu erhalten. Von den Human- und Pelikanproben wurde nur das Fettgewebe untersucht.

Besonders auffällige Chlorkohlenwasserstoffe, z.B. 1,1,1-Trichlor-2,2-bis[4-chlorphenyl]ethan (DDT), bzw. dessen Metabolit 1,1-Dichlor-2,2-bis[4-chlorphenyl]ethen (DDE) und vor allem die verschiedenen Hexachlorocyclohexan-Kongenere (HCH), sollten ebenfalls nicht ignoriert werden, allerdings muß klar gesagt werden, daß nicht das Hauptaugenmerk dieser Untersuchung auf diesen Verbindungen lag, so daß diese nur am Rande behandelt werden konnten.

Zur Aufarbeitung der aus Deutschland stammenden Biota-Proben wurden eine bereits in meiner Diplomarbeit erfolgreich getestete schonende *clean-up*-Methode, die ohne die Schwefelsäure und ohne Natronlauge auskommt, eingesetzt.^[141] Diese Methode wurde zur Analyse von kurzkettigen Chlorparaffinen entwickelt und mußte für die PCB und die MeSO₂-PCB-Analyse erneut umfassend validiert werden. Eines der Ziele dieser Untersuchung war es auch, eine möglichst universelle Methode für möglichst viele Substanzklassen zu entwickeln, um das *cleanup* der Umweltproben zu vereinheitlichen und vor allem zu vereinfachen. Die Analyse der Prager Biota-Proben erfolgte mit einer ähnlichen Aufarbeitungsmethode. Unterschiede zu der von mir verwendeten Methode werden angegeben. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse im Rahmen der Qualitätssicherung zu gewährleisten, wurde ein Laborleistungstest vorgenommen.

6.2. Methode/ Experimentelles

Da die Methode im Laufe der Zeit in geringfügigen, aber manchmal wichtigen Details an die Erfordernisse der PCB-Analytik angepaßt wurde, erschien es ratsam, die Methode hier im ganzen noch einmal vorzustellen. Hervorzuheben ist, daß es sich lediglich um geringfügige Modifikationen handelt, die den Charakter der Methode im ganzen nicht verändern, aber durchaus häufig praktische Verbesserungen und Vereinfachungen gegenüber der Diplomarbeit ergeben haben (weitere Details zur Probenaufarbeitung finden sich unter 10.6).

6.2.1. Probenahme

Die Probenahmen erfolgten in mehreren Etappen im Juli 2001. Die Proben aus Dessau wurden in einem Kühlraum bei etwa 270 K zwischengelagert, bevor sie in einer Kühlbox unverzüglich nach Hamburg transportiert wurden. Die Organentnahme selbst erfolgte von Jägern vor Ort. Die Füchse wurden im ganzen bei 255 K gelagert und gefroren in das Labor nach Hamburg transportiert. Dort erfolgte die Organentnahme nach dem Auftauen der Füchse durch Öffnen des Corpus und anschließender Homogenisierung der Proben. Da es sich um sehr junge Füchse handelte, konnte kein Fettgewebe entnommen werden. Die Humanfettproben stammen aus einem Prager Krankenhaus, der Pelikan aus dem Prager Zoo.

6.2.2. Homogenisieren

Für die Homogenisierung wurde Natriumsulfat 3 Stunden bei 523 K ausgeheizt, um es von evtl. vorhandenen Verunreinigungen zu befreien. Von Leber und Lunge wurden je 10 g

und vom Fettgewebe je 5 g Probenmaterial verwendet. Es wurde soviel Natriumsulfat hinzugegeben, bis eine homogene trockene Masse entstand.

6.2.3. Extraktion

Die Soxhlet-Apparatur wurde vorher gründlich mit *n*-Hexan und Aceton gespült. Vor Beginn der Aufarbeitung wurde eine dreistündige Vorextraktion mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch durchgeführt. Die kleinen Soxhlet-Einsätze wurden zugunsten der großen leichter handhabbaren Soxhlet-Einsätze substituiert und wurden mit dem Homogenat befüllt. Als Lösungsmittel wurde *n*-Hexan/Aceton 2:1 verwendet. Nach achtstündiger Extraktion wurde das verbleibende Lösungsmittel aus der Soxhlet-Apparatur entfernt und mit dem restlichen Lösungsmittel im Kolben vereint.

Das gleiche Lösungsmittelgemisch wurde für die in Prag analysierten Proben verwendet, allerdings wurde statt mit einer Soxhletextraktion mit einer kaltextraktiven Methode gearbeitet.

6.2.4. EOM-Bestimmung

Der Kolbeninhalt wurde in zwei gleiche Hälften aufgeteilt, wobei die eine Hälfte zur weiteren Aufarbeitung vorgesehen war. Mit der anderen Hälfte wurde der Gehalt an extrahierbarer organischer Matrix (EOM) bestimmt. Dazu wurde die Probe nach der Extraktion unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer eingeeengt und in einen Meßkolben gefüllt. Die Hälfte wurde entnommen und in einem offenen vorher gewogenen 8 mL-Gläschen durch mehrtägiges Verdunsten des Lösungsmittels zur Trockne eingeeengt. Bei Fettgewebe-Proben wurde zusätzlich ein Stickstoffstrom durch die Probe geleitet und die Probe anschließend bei 393° K im Ofen für mehrere Stunden belassen. Anschließend wurden die Gläschen erneut ausgewogen und aus der Differenz der EOM-Gehalt bestimmt.

6.2.5. Clean-up

Da das Aceton bei der Gelpermeationschromatographie (GPC) stören würde, mußte es am Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck und einer Wassertemperatur von 318 K entfernt werden. Bei dem Lösungsmittelwechsel wurden die Proben auf unter 2 mL eingeeengt. Die Proben wurden durch einen auf der Injektionsspritze sitzenden Einmal-Vorfilter des Typs *Minisart SRP 25* der *Fa. Sartorius* aufgezogen. Mit Dichlormethan: Cyclohexan 1:1 wurde das 8 mL-Probegläschen dreimal nachgespült und ebenfalls durch den Vorfilter aufgezogen, um grobe störende Matrix zu entfernen. Wichtig ist, auf das Totvolumen des Vorfilters zu

achten, damit beim Verschieben des Stempels die Luft in der Injektionsspritze nicht die Flüssigkeit aus dem Vorfilter herausdrängt. Der Vorfilter läßt sich durch mehrmaliges Zurückziehen des Stempels entleeren.

Die GPC diente im wesentlichen zur Abtrennung aller hochmolekularen Stoffe, namentlich v.a. des Fetts. Die Apparatur wurde auf eine Flußrate von 2,7 mL/min eingestellt und mit Cyclohexan/ Dichlormethan 1:1 als Lösungsmittel betrieben. Ein Volumen von 4 mL wurde in die GPC-Apparatur injiziert. Aufgefangen wurde die GPC-Fraktion in der Zeit von 25min 50s-55 min. Um die Robustheit der Methode zu erhöhen, ist in der Schnittzeit der GPC eine Sicherheitsmarge von 1,5 min enthalten. Die erhaltene Fraktion wurde unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von etwa 0,5 mL eingengt, danach wurde durch zweimaliges Auffüllen mit *n*-Hexan und erneutem Einengen ein Lösungsmittelwechsel vollzogen.

Etwas anders wurde die GPC (8 x 500 mm) unseres Kooperationspartners betrieben. Die Flußrate betrug 0,5 mL/min. Aufgefangen wurden die PCB sowie die MeSO₂-PCB in einer Fraktion in der Zeit von 29 - 48 min. Als Lösungsmittel wurde frisch destilliertes Chloroform verwendet. Nach der GPC erfolgte direkt die GC-Quantifizierung ohne Mini-Silica-Fraktionierung, so daß die PCB und die MeSO₂-PCB in einer Fraktion eluiert werden. Vorteilhaft an der „Prager Methode“ ist die noch kürzere Aufarbeitungszeit, nachteilig die möglicherweise etwas höhere Matrixbelastung. Details zur abschließenden GC-Quantifizierung finden sich unter **10.6.2**.

Anschließend erfolgte die weitere Aufarbeitung der „Hamburger Proben“ durch eine Fraktionierung der Probe unter Verwendung einer Mini-Silica-Säule. Eluiert wurde in der Reihenfolge:

- 1) *n*-Hexan,
- 2) *n*-Hexan:Dichlormethan 9:1,
- 3) *n*-Hexan:Dichlormethan 4:6,
- 4) Dichlormethan.
- 5) Dichlormethan:Ethylethanoat
- 6) Ethylethanoat

Die aus der Mini-Silica-Fraktionierung erhaltenen Lösungsmittel wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren durch *n*-Hexan ersetzt. Nach Zugabe von 0,05 mL des internen Standards PCB 54 wurden die Proben am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von unter 0,1 mL aufkonzentriert. Das Volumen der Probe wurde durch Auswaage der 2 mL *Vials* vor und nach dem Befüllen mit der Probe anhand der Dichte von *n*-Hexan (0,66 g/mL) bestimmt.

6.2.6. GC/MS-Auswertung

Zunächst wurde ein PCB-Standard injiziert, dann wurden mehrere Proben nacheinander jeweils zweifach mittels GC/MS-EI vermessen. Die Auswertung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{(Gleichung 6)} \quad C_P = \frac{F_P \cdot V_P \cdot C_S}{F_S \cdot EOM \cdot (F_{ISP} / (((V_{ISS} \cdot C_{ISS}) / V_P) / C_{ISP})) \cdot F_{ISS}}$$

mit

C_P Konzentration der Analysenprobe [ng/g EOM]

F_P Fläche (*Area*) der Probe

V_P Volumen der Probe [mL]

C_S Konzentration des Standards [ng/mL]

F_S Fläche des Standards

EOM Extrahierbare organische Matrix [g]

Korrekturfaktor Interner Standard (IS):

F_{ISP} Fläche des IS

V_{ISS} Volumen des IS im Standard [mL]

C_{ISS} Konzentration des IS im Standard [ng/mL]

V_P Volumen der Probe [mL]

C_{ISP} Konzentration des IS in der Probe [ng/mL]

F_{ISS} Fläche des IS im Standard

Zur Quantifizierung wurden die in **Tabelle 13** angeführten Ionen verwendet, wobei das erstgenannte zur Quantifizierung und das zweite zur qualitativen Kontrolle diente. In einigen Fällen war die Quantifizierung über das erste Ion nicht möglich, weil es durch Koelutionen (v.a. Phthalate, Silicone) überlagert wurde. In diesen Fällen konnte häufig über das schwerere, aber weniger intensive zweite Ion quantifiziert werden. Im Gegensatz zur gaschromatographischen Analyse lassen sich viele Koelutionen dank der unterschiedlichen

Ionenspuren auf dem MS auflösen und vermeiden. So konnten die fast koeluiierenden PCB 132 und 105 dank unterschiedlicher Massenspektren problemlos quantifiziert werden.

Die Kalibrierung unter Verwendung eines Korrekturfaktors erwies sich als unerlässlich, weil die *Performance* des GC/MS-EI von Messung zu Messung extrem stark schwankte und verlässliche Meßresultate nur die gleichzeitige Verwendung eines externen und eines internen Standards erzielt werden konnten. Nicht in jeden Fall und bei allen Messungen ist ein IS notwendig. So kann bei GC-ECD-Messungen wegen der stabilen Empfindlichkeit des EC-Detektors auf die Kalibrierung mittels IS im allgemeinen verzichtet werden.

Um noch empfindlichere Konzentrationsbestimmungen der MeSO₂-PCB durchführen zu können, wurden zusätzlich zu dem GC-MS EI noch ein GC-MS NCI mit ebenfalls einer DB5-MS-Säule, sowie ein GC mit einer CP-Sil 5/C 18CB-Säule und einer DB608-Säule zur Verifizierung eingesetzt.

6.2.7. Wiederfindungsraten

Da diese schonende *cleanup*-Methode bisher noch nicht für die Aufarbeitung von PCB und MeSO₂-PCB eingesetzt worden ist, mußten zunächst Wiederfindungsraten (WFR) für die Einzelschritte der Methode, insbesondere die GPC und Mini-Silica-Fraktionierung, bestimmt werden, um evtl. auftretende Substanzverluste bestimmten Teilschritten zuordnen zu können. Dazu wurden zunächst WFR für die GPC bestimmt, um den Zeitraum festzulegen, in dem das Eluat aufgefangen werden sollte. Für den gewählten Zeitraum von 25 min 50s - 55 min wurden hohe WFR gefunden, die darauf schließen ließen, daß die PCB und MeSO₂-PCB vollständig erfaßt werden konnten. Die Einzelbestimmung der WFR für die Mini-Silica-Fraktionierung ist vorteilhaft, weil es zum einen gerade in diesem Schritt durch Anhaften der Analyten an der Säule zu signifikanten Substanzverlusten kommen kann und zum anderen die Verteilung der Analyten auf die Fraktionen bestimmt werden kann. Die PCB befanden sich in der ersten und zweiten, die MeSO₂-PCB ausschließlich in der fünften Fraktion.

Anschließend wurde eine WFR-Bestimmung für die gesamte Methode mit drei Wiederholungen und eine Blindwert-Bestimmung vorgenommen (**Tabelle 13**), um gegebenenfalls Kontaminationen aus dem Labor erkennen zu können. Die von dem Kooperationspartner in Prag ermittelten WFR für deren Methode lagen zwischen 88 % und 107 %.

Tabelle 13: Wiederfindungsraten (WFR) der PCB-Kongenere und MeSO₂-PCB (n= 3) für die Gesamtmethode, Bestimmungs (BG)- und Nachweisgrenzen (NG), sowie Retentionszeiten und für GC-MS/EI-Quantifizierung verwendete Ionen

	WFR	BG	NG	Ret.	Quant.	
PCB Nr.	(MW± SD [%])	[ng/g EOM]	[ng/g EOM]	[min]	Ion 1	Ion2
28	99± 2	0,2	0,1	28,46	186	256
52	104± 6	0,3	0,1	30,13	220	292
81	77± 6	0,4	0,1	34,43	220	292
77	119± 10	0,3	0,1	35,07	220	292
95	121± 9	0,5	0,2	32,36	254	326
91	115± 22	0,9	0,3	32,51	254	326
101	95± 8	1,1	0,4	33,37	254	326
118	107± 4	1,0	0,4	35,59	254	326
105	100± 8	1,2	0,4	36,58	254	326
126	111± 4	1,9	0,6	38,18	254	326
187	98± 6	4,8	1,6	38,23	254	326
174	102± 2	5,7	1,9	39,13	254	326
180	76± 4	4,8	1,6	40,17	254	326
170	91± 5	1,9	0,6	41,18	254	326
149	101± 10	1,1	0,4	35,48	290	360
153	97± 14	1,9	0,6	36,49	290	360
132	119± 9	0,9	0,3	36,55	290	360
138	86± 6	2,3	0,8	37,47	290	360
169	111± 9	5,6	1,9	41,08	290	360
IS54	97± 6	-	-	28,04	220	292
3-91	88± 17	1,8	0,7	46,15	290	404
4-95	94± 13	2,8	1,0	46,55	290	404
4-91	95± 14	2,2	0,8	46,32	290	404
3-149	84± 18	2,4	0,8	50,17	324	438
4-149	86± 8	4,4	1,6	51,45	324	438
3-132	100± 10	3,5	1,2	52,52	324	438
4-132	96± 15	4,3	1,5	53,58	324	438
3-174	97± 15	3,1	1,0	55,19	324	438
4-174	93± 19	4,3	1,4	55,53	324	438

6.2.8. Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenze gibt die minimale Konzentration eines Analyten an, bei der sich der vom Analyten verursachte *peak* mit ausreichender statistischer Sicherheit vom Untergrund unterscheidet. Sie ist dadurch festgelegt, daß die *peak*-Höhe einer Substanz dreimal so hoch sein muß wie das Grundlinienrauschen. Für eine sichere Quantifizierung reicht dieses jedoch

nicht. Eine Bestimmungsgrenze ist dadurch gekennzeichnet, daß der zu bestimmende *Peak* ein neunfaches des Grundlinienrauschens, d.h. der statistischen Schwankungen der Grundlinie, erreichen muß, damit eine Substanz sicher quantifizierbar ist.

Die Bestimmungs- bzw. Nachweisgrenzen hängen nur von der absoluten PCB-Menge in den Proben ab. Da sie aber auf unterschiedliche EOM-Mengen für Leber-, Lungen- und Fettproben bezogen werden, ergeben sich unterschiedliche Nachweisgrenzen bei gleichem Frischgewicht. Für die Aufarbeitung der Fettproben wurde nur das halbe Frischgewicht eingesetzt, so daß eine gewisse Nivellierung erfolgt. Die angegebenen Bestimmungs- bzw. Nachweisgrenzen sind konservativ berechnet, d.h., daß im Einzelfall niedrigere, nicht aber höhere Bestimmungs- bzw. Nachweisgrenzen erreicht wurden. Zwischen 0,5 und 9 ng/g EOM (S/N = 9), bezogen auf Fettproben (Human- und Pelikanfett), lagen die Bestimmungsgrenzen bei dem Prager Kooperationspartner bei der PCB-Bestimmung.

Tabelle 14 gibt einen Überblick über alle Bestimmungs- und Nachweisgrenzen für die MeSO₂-PCB. Alle Werte werden in ng/g EOM angegeben und beziehen sich auf die Matrix der ausgewählten Proben. Nachdem kein PCB 174 in den Biota-Proben gefunden wurde, wurden auch die atropisomeren Metaboliten 3-174 und 4-174 von weiteren Untersuchungen exkludiert.

Tabelle 14: *Alle Bestimmungs (BG)- und Nachweisgrenzen (NG) der GC-ECD, GC-MS NCI und GC-MS EI-Messungen zur Bestimmung der MeSO₂-PCB im Überblick*

[ng/g EOM]	GC-MS EI		GC-MS-NCI		GC CP-Sil5/C 18 CB		GC DB608	
Metaboliten	NG	BG	NG	BG	NG	BG	NG	BG
3-91	0,7	1,8	0,4	1,2	0,5	1,4	0,5	1,5
4-95	1,0	2,8	0,8	2,5	0,8	2,4	0,9	2,6
4-91	0,8	2,2	0,5	1,5	0,5	1,4	0,6	1,5
3-149	0,8	2,4	0,3	0,7	0,2	0,7	0,3	0,9
4-149	1,6	4,4	0,4	1,2	0,4	1,2	0,5	1,5
3-132	1,2	3,5	0,5	1,5	0,2	0,7	0,3	0,9
4-132	1,5	4,3	0,6	1,8	0,2	0,7	0,4	1,0

6.2.9. Blindwerte

Generell ist es für eine Methode vorteilhaft, wenn mit ihr möglichst wenige Aufarbeitungsschritte verbunden sind, weil die Kontaminationsgefahr abnimmt. Zu unterscheiden ist zwischen den Kontaminanten, die mit der gesuchten Substanz koeluiieren und damit stören, und den nichtkoeluiierenden Kontaminanten, die für diese Aufarbeitung nicht betrachtet werden müssen. Auf die Analyse wirkten sich einige Phthalate störend aus, die bereits nach dem Kontakt mit Kunststoffen, wie z.B. Deckeldichtungen, unvermeidbar in

die Probe gelangten und zum Teil zu *peak*-Überlagerungen mit den Analyten führten. Aufgrund der hohen Eintragsquantitäten dieser Matrix erwies sich die Quantifizierung über ausgewählte einzelne Ionen in einigen Fällen für einige Analyten als nicht durchführbar.

6.2.10. Fehlerbetrachtung

Beim Ansetzen des Standards können Volumenfehler entstehen, die etwa bei 5 % liegen. Die methodisch bedingten Fehler können durch Bestimmung der Wiederfindungsraten ermittelt werden. Die Abweichung vom Mittelwert der einzelnen Werte reichte von 2-22%. Die mittlere Abweichung betrug 6 %. Partiiell könnte der bei der Aufarbeitung entstehende Fehler durch Reduzierung der Blindwerte minimiert werden. Vorausgesetzt wird natürlich, daß ein geeigneter Ersatz für den auszutauschenden Einzelschritt zur Verfügung stünde, der keine neuen Blindwert-Probleme verursacht. Ansonsten wäre eine Minimierung des Fehlers der gesamten Methode nur durch Weglassen von Einzelschritten denkbar.

Eine wichtige Fehlerquelle ist die Quantifizierung mit dem GC/MS. Die extremen Schwankungen des Detektors sind nur schwerlich selbst bei gleichzeitiger Verwendung eines internen und externen Standards vollständig zu eliminieren. Eine weitere bedeutende Fehlerquelle stellt die recht grobgestrickte *Peak*-Integration mit der *Magnum-Software* dar, die die manuelle Festlegung der Integrationsgrenzen nur in sehr eingeschränktem Maße zuläßt. Insbesondere bei Koelutionen mit störenden Substanzen lassen sich die *Peaks* nur schwerlich mittels manueller Integration separieren. Es ist festzuhalten, daß der letzte Schritt der Analyse, die GC/MS-Auswertung, der fehlerträchtigste ist.

Die Auswertung erfolgte ausschließlich durch manuelle Integration, d.h. daß die Integrationsgrenzen für jedes Kongener einzeln festgelegt wurden. Allgemein läßt sich festhalten, daß der Fehler umso größer wird, je kleiner die zu integrierenden *peaks* sind. Dieses ist verständlich, wenn man bedenkt, daß das Rauschen der Grundlinie im Verhältnis zum zu integrierenden *peak* mit abnehmender *peak*-Größe zunimmt. Deshalb wird der Fehler um so größer, je kleiner die Konzentrationen sind. Er kann im Einzelfall bei ca. 40 % im Bereich von 5 ng/g EOM liegen, während der Fehler bei Konzentrationen um die 50 ng/g EOM mit 20 % veranschlagt werden kann.

6.2.11. Laborleistungstest

Die Nagelprobe einer jeden analytischen Methode und ihrer Anwender ist der Laborleistungstest. Normalerweise haben universitäre Einrichtungen aufgrund ihrer begrenzten finanziellen Mittel nicht die Möglichkeit, an Ringversuchen mit zertifizierten Referenzmaterialien teilzunehmen. Um trotzdem die Vorteile solcher Vergleiche nutzen zu

können, wurde eine Parallel-Untersuchung unter Beteiligung des akkreditierten Veterinärinstituts in Prag, des ebenfalls akkreditierten NILU (*Norwegian institute for air research*) in Tromsø (Norwegen) und unseres Hamburger Labors einer Wildschweinleber- (Dessau-Serie) und einer Leber-Probe eines arktischen Dorsches (*Boregadus saida* LEP) aus Norwegen angestellt. Zwar sind die wahren Werte nicht bekannt, weil kein zertifizierter Standard verwendet wurde und somit auch die Richtigkeit der Analysen nicht mit letzter Sicherheit erhalten werden kann, dennoch ist dieser Vergleich von großer Aussagekraft, weil die genannten renommierten Labors an diesem Test beteiligt waren. Jeweils ein Homogenat dieser Proben wurde an die beteiligten Labors abgeben und nach der jeweils üblichen Methode parallel aufgearbeitet. Die Ergebnisse werden in **Tabelle 15** vorgestellt.

Tabelle 15: *Ergebnisse einer vergleichenden Untersuchung zweier Biotaproben mit dem Veterinärinstitut in Prag und dem NILU in Tromsø*

[ng/g EOM] PCB-Nr.	Hamburg Prag NILU			rel. SA [%]	Hamburg Prag NILU			rel. SA [%]
	Wildschweinleber				Dorschleber			
28	27,4	24,6	2,6	61	24,0	19,3	19,3	11
52	16,6	30,3	18,1	28	27,6	20	8,5	42
81	0,0				0,0			
77	0,0				0,0			
95	28,8				17,1			
91	0,0				0,0			
101	51,0	62,4	2,7	67	34,0	28	17,9	25
118	n.q.		2,6		18,6		43,1	40
105	0,0		0,0		0,0		18,8	100
126	0,0		0,0		0,0		1,2	100
187	n.q.		2,7		0,0		2,8	100
174	n.q.				0,0			
180	10,0	9,9	4,0	35	n.q.	9,4	8,4	5
170	n.q.		2,6		n.q.		5,6	
149	12,1		1,9	73	8,7		4,0	56
153	44,7	38,5	13,8	41	46,7	40,2	35,6	11
132	0,0				0,0			
138	46,0	39,6	14,6	41	48,7	31,9	35,3	19
169	0,0				0,0			

Vor mehr als 20 Jahren veröffentlichten Horwitz, Kamps und Boyer die Ergebnisse von mehr als 50 Ringversuchen und kamen zu dem Schluß, daß die relative Standardabweichung mit abnehmender Konzentration der zu messenden Substanz stark zunimmt.^[142] Die relative Standardabweichung (rel. SA) bezieht sich dabei auf die jeweils beteiligten Laboratorien und ist somit ein Maß für die Labor-zu-Labor-Übertragbarkeit einer Methode und natürlich auch ein Maß für die Reproduzierbarkeit der erzeugten Daten. Im unteren einstelligen Nanogramm-Bereich sind im Sinne des Horwitz-Kriteriums relative Standardabweichungen von bis zu

$\pm 45\%$ akzeptabel, im Bereich von 100 ng sind es $\pm 30\%$.^[143] Im Falle der Wildschweinleber fallen die im NILU vermessenen PCB 28, 101, 153 und 149 deutlich und das PCB 180 knapp aus dem Rahmen des Horwitz-Kriteriums, während alle DIN-PCB, die in Hamburg und Prag gemessen wurden zum Teil deutlich unterhalb dieser Grenze liegen. Zu bemerken ist, daß aus Zeitgründen in Prag nur die sechs DIN-PCB untersucht werden konnten. Außerdem wurden uns Probleme bei der Auswertung seitens der Norweger mitgeteilt, so daß aufgrund der Datenlage davon ausgegangen werden kann, daß die Konzentrationen der genannten PCB deutlich zu niedrig von norwegischer Seite ermittelt wurden. Für das PCB 149 kann diese Feststellung so nicht getroffen werden, da nur zwei Vergleichswerte vorliegen.

Ein Blick auf die DIN-PCB der Dorschleber-Untersuchungen zeigt Konzentrationen, die in allen Fällen das Horwitz-Kriterium erfüllen, einzig das PCB 52 überschreitet diese Grenze geringfügig. Die PCB 187 und 126 konnten nicht nachgewiesen werden, sie liegen offenbar knapp über der Nachweisgrenze der Hamburger Methode. Die Werte des PCB 118 liegen zwischen unserem und dem Norwegischen Labor relativ weit auseinander. Eine genauere Diskussion ist aufgrund der begrenzten Datenlage nicht möglich. Während das PCB 149 unter Berücksichtigung der niedrigen Konzentration knapp außerhalb der Grenze liegt, konnte für das Kongener 105 keine Übereinstimmung erzielt werden, weil es in unserer Untersuchung nicht nachgewiesen werden konnte.

Insgesamt lagen alle in Prag und Hamburg ermittelten Konzentrationen der DIN-PCB innerhalb des von Horwitz vorgegebenen Bereichs, so daß die Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse gegeben ist. Mit Einschränkungen sind hingegen die Resultate aus Norwegen zu betrachten. Bei diesem Vergleich hat sich gezeigt, daß die Teilnahme an Ringversuchen auch für akkreditierte Labors von nicht zu unterschätzender Wichtigkeit ist, zumal die Qualität der Arbeit so in Abständen immer wieder überprüft werden kann. Betrachtet man nur die Dorschleber-Proben, so lagen alle drei Labors innerhalb des zulässigen Bereichs, was für die Qualität dieser Analysen spricht. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß unsere Resultate systematisch etwas höher als die anderen Analysenergebnisse liegen. Dieses gilt nur für die Dorsch-, aber nicht für die Wildschweinleberproben, bei denen diese Korrelation nicht festgestellt werden konnte.

6.2.12. Wiederholbarkeit der Methode

Möchte man die Präzision einer Methode bestimmen, unterscheidet man zwischen der Wiederholbarkeit (gleiches Labor) und der Reproduzierbarkeit (Laborleistungstest verschiedener Laboratorien). Die Wiederholbarkeit (**Tabelle 16**) wurde durch eine vierfach aufgearbeitete Probe (Wildschweinleber aus der Dessau-Serie) festgestellt.

Tabelle 16: Wiederholbarkeit der Methode ($n=4$) anhand der Ermittlung des Mittelwertes (MW), der Standardabweichung (STABWN) und der prozentualen Abweichung (Abw.)

PCB Nr.	MW \pm STABWN	Abw.[%]
28	24 \pm 4	19
52	20 \pm 2	13
81	0 \pm 0	
77	0 \pm 0	
95	25 \pm 3	13
91	0 \pm 0	
101	46 \pm 4	10
118	15 \pm 5	34
105	0 \pm 0	
126	0 \pm 0	
187	0 \pm 0	
174	0 \pm 0	
180	10 \pm 0	8
170	13 \pm 0	3
149	10 \pm 1	15
153	35 \pm 5	16
132	0 \pm 0	
138	37 \pm 5	15
169	0 \pm 0	

Die Probe wurde jeweils zweifach mit dem GC-MS vermessen. Prozentuale Abweichungen wurden in der Bandbreite von 3-34 % festgestellt, im Mittel bei ca. 15 %. Das zeigt, daß diese Methode eine Bestimmung der Substanzen mit relativ geringem statistischen Fehler zuläßt. Ebenso verhält es sich für die Aufarbeitungsmethode des Prager Kooperationspartners, bei dem die Standardabweichungen für alle Analyten zwischen 5 % und 11 % ($n = 3$) lagen.

6.3. Ergebnisse

Zwar waren weitere Umweltkontaminanten neben den PCB nicht Gegenstand dieser Untersuchung, dennoch waren einige Chlororganika derart augenfällig, daß sie hier nicht ignoriert, sondern Anhand einer Wildschweinleberprobe aus dem Revier Dessau-Nord exemplarisch dargestellt werden sollen. Die Quantifizierung dieser Probe wurde gaschromatographisch mit einer „DB5-“ und einer „DB17“-Säule im Veterinärinstitut in Prag vorgenommen (**Abb. 35**). Diese Probe stellt durchaus kein Beispiel einer für die Region unüblichen Belastung dar, vielmehr soll die charakteristische Verteilung der Chlororganika dieser ehemaligen Industrieregion illustriert werden. Die Quantifizierung dieser Probe ergab für die Hexachlorcyclohexan (HCH)-Isomere **a**-HCH und **g**-HCH Werte von 8,0 bzw. 5,4 ng/g EOM. In eine andere Region stößt die Konzentration von **b**-HCH mit 1136,86 ng/g EOM

vor. Aus Untersuchungen des Veterinärlabors Stendal sind auch 100-fach höhere Spitzenwerte, also Konzentrationen um 100 µg/g EOM (!) bekannt geworden. Dieses zeigt sehr deutlich, daß es sich bei dieser Probe keinesfalls um eine Spitzenbelastung handelt und auch, daß die Verseuchung dieser Region mit Rückständen aus der Lindan-Produktion immer noch alarmierend ist. Mit 71,9 bzw. 71,0 ng/g EOM lagen die Hexachlorbenzen (HCB)- und die 1,1-Dichlor-2,2-bis[4-chlorphenyl]ethan (*p,p'*-DDD)-Belastung etwas höher als die Belastung mit den DIN-PCB. Der 1,1,1-Trichlor-2,2-bis[4-chlorphenyl]ethan (DDT)-Metabolit 1,1-Dichlor-2,2-bis[4-chlorphenyl]ethen (*p,p'*-DDE) wurde nach dem *b*-HCH in der zweithöchsten Konzentration mit 215,1 ng/g EOM gefunden. Dieses charakteristische Belastungsmuster ist auch durch die Befunde von anderen Proben bestätigt worden.

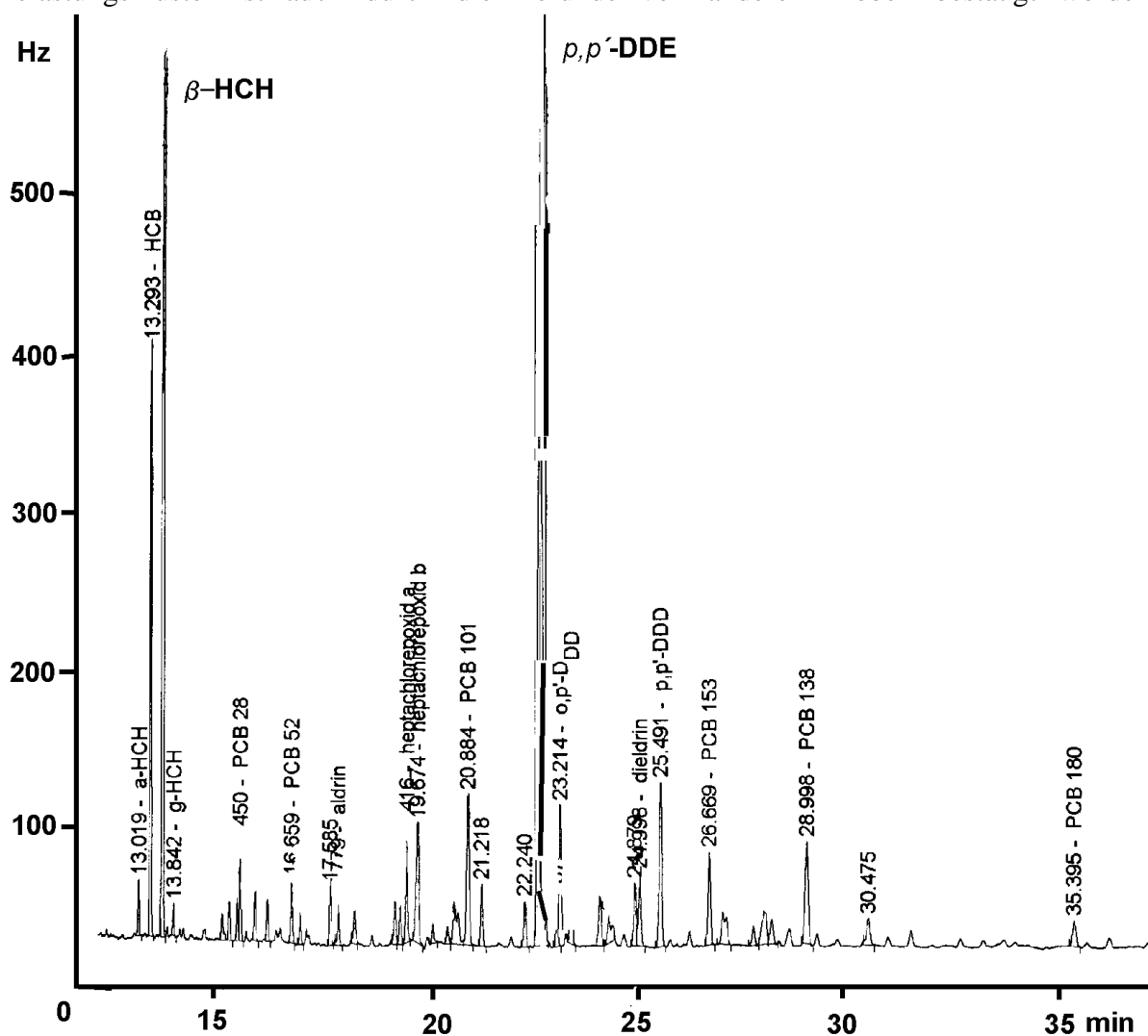


Abb. 35: Mit Chlororganika kontaminierte Leber eines Wildschweins aus dem Revier Dessau-Nord

Im Vergleich zu den höherkonzentrierten Chlororganika lagen die summarischen und gemittelten PCB-Gehalte der Dessau-Proben mit Werten zwischen 78 und 337 ng/g EOM sehr viel niedriger. Starke Konzentrationsschwankungen der HCH- und DDT-Derivate lassen auf eine lokale Kontaminationsquelle schließen, während bei den PCB-Belastungen keine extremen Ausreißer vorlagen und somit eher auf eine „Hintergrund“-Belastung geschlossen werden kann. **Tabelle 17** gibt einen Überblick über die Mittelwerte der PCB-Belastungen in den Wildproben. Alle Einzelwerte sowie weitere Probandaten sind im **Anhang** in den **Tabellen A1-A3** und **A5** zu finden.

Tabelle 17: *PCB-Konzentrationen in Leber, Lunge und Fettgewebe in Rehen (n=6), Wildschweinen (n=5) und Füchsen (n=3; nur Leber und Lunge)*

[ng/g EOM] PCB	Reh			Wildschwein			Fuchs	
	Leber	Lunge	Fett	Leber	Lunge	Fett	Leber	Lunge
28	26± 20	63± 39	14± 11	26± 9	39± 13	2± 0	20± 1	42± 11
52	21± 12	38± 27	8± 4	19± 8	23± 10	3± 2	9± 0	29± 9
81	6± 3	13± 7	2± 1	2± 1	2± 3	n.q.	1± 0	6± 2
77	2± 1	2± 0	n.d.	1*	n.d.	n.d.	0,9*	0,6*
95	13± 7	27± 7	6± 3	18± 9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
91	n.d.	3± 2	2,4*	n.d.	1± 1	n.d.	n.d.	n.d.
101	23± 15	76± 51	13± 9	25± 15	35± 11	9± 8	10± 1	50± 24
118	12± 6	33± 12	12± 7	7± 3	10± 3	3± 3	8± 3	23± 12
105	2± 1	2± 0	2± 2	3± 0	2± 3	n.d.	2± 0	n.d.
126	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
187	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
174	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
180	12± 5	22± 14	22± 14	11± 3	12± 4	6± 1	430± 422	60± 32
170	n.d.	n.d.	5± 4	14*	n.d.	6± 4	255± 130	33± 11
149	22± 13	32± 16	10± 6	8± 3	5± 1	4± 3	7± 8	4,8*
153	26± 14	37± 21	41± 19	21± 9	14± 2	19± 9	704± 672	137
132	22± 10	10± 6	2± 0	n.d.	0± 1	1± 2	27*	6*
138	18± 6	44± 27	16± 7	25± 14	15± 2	13± 5	162± 51	17± 10
169	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Summe	167± 83	338± 116	144± 49	148± 60	146± 43	78± 19	1566± 1173	400± 88

*Nur in einer Probe quantifizierbar; n.d. = nicht detektierbar, n.q. = nicht quantifizierbar

Theoretisch sollten die Herbivore, wie die Rehe, ein geringeres Akkumulationspotential als die allesfressenden Wildschweine aufweisen. Betrachtet man jedoch die Werte, finden sich eher bei den Rehen (Lunge und Fett) etwas höhere PCB-Belastungen als bei den Wildschweinen. Die carnivoren Füchse weisen hingegen deutlich höhere PCB-Belastungen auf. Zu beachten ist zudem, daß es sich um sehr junge Füchse handelt. Einschränkend ist zu erwähnen, daß die Füchse aus Schleswig-Holstein und nicht aus Dessau stammen, was die direkte Vergleichbarkeit natürlich beeinträchtigt. Wird aber berücksichtigt, daß Schleswig-Holstein als relativ unbelastete Region gilt und die Füchse trotzdem erhöhte PCB-Werte

aufweisen, so spricht das für die theoretische Einordnung der Carnivore über den Herbivoren. Als am höchsten belastet haben sich die Fuchslebern mit 1566 ng/g EOM an Gesamt-PCB herausgestellt. Dieses entsprach einer etwa vierfach höheren Belastung gegenüber der Lunge. Bei den Rehen stellt sich dieser Sachverhalt umgekehrt dar: Die Lunge weist etwa eine doppelt so hohe Belastung auf wie die Leber. Allerdings sind auch gerade bei den Fuchslebern hohe Schwankungen zwischen den einzelnen Proben festzustellen, so daß sich diese Umkehrung wieder relativiert.

Die Rehfettproben bewegen sich auf dem gleichen Niveau wie die PCB-Belastungen in der Leber. Bei den Wildschweinfettproben wurden etwa halb so hohe Belastungen wie in der Leber festgestellt. Generell ist bei Fettproben zu berücksichtigen, daß die EOM um ein vielfaches höher liegt als in Leber und Lunge. Auf das Frischgewicht bezogen, würden sich für die Fettproben die höchsten Werte ergeben. Allerdings ist es in der Literatur allgemein üblich, EOM-Werte anzugeben, um möglichst leicht vergleichbare Werte zu erhalten.

Erwartungsgemäß lagen die Konzentrationen der DIN-PCB generell über denen der anderen Kongenere. Auffällig waren die hohen Konzentrationen der DIN-PCB 138, 153 und 180 in einzelnen Fuchslebern, wobei allein das Kongener 153 fast 50 % der gesamten PCB-Konzentration ausmacht und alle drei Kongenere zusammengenommen für 90 % der PCB-Belastung in der Fuchsleber verantwortlich sind.

Eine Ausnahme bildete das atropisomere PCB 149, das in den Organen und dem Fettgewebe der Rehe ähnliche Konzentrationen wie das PCB 153 erreichte. In den Wildschweinproben ist dieses Verhältnis mit 1:3 sehr viel niedriger. Mit etwa 1 % erreicht es in Fuchsleber und Fuchslunge ein Minimum. Das PCB 132 ist in vergleichsweise niedrigen Konzentrationen nachzuweisen, ebenso das PCB 91. Das PCB 174 konnte in keinem Kompartiment nachgewiesen werden. Allerdings lag die Nachweisgrenze dieses Atropisomers mit 1,9 ng/g EOM relativ hoch. Bleibt als letztes chirales Kongener das PCB 95, welches in Rehleber, -lunge und -fett in etwas niedrigeren Konzentrationen als das PCB 149 gefunden wurde, in den Wildschweinproben nur in der Leber und überhaupt nicht in den Fuchsproben.

Die koplanaren PCB spielen bei der Zusammensetzung des TEQ-Wertes zur Beurteilung der Toxizität eine wichtige Rolle. Bis auf das PCB 81, welches in Konzentrationen von 2-13 ng/g EOM (bezogen auf die Durchschnittswerte) gefunden wurde, ist nur noch das PCB 77 in sehr niedrigen Konzentrationen nachgewiesen worden. Für die wurden mit 1,9 bzw. 1,6 ng/g EOM relativ hohe Nachweisgrenzen bestimmt. In den Umweltproben konnten die koplanaren PCB 126 und 169 nicht nachgewiesen werden. Würde man die geringen TEQ-Werte der koplanaren PCB zum alleinigen Bestimmungskriterium für die Beurteilung der Toxizität erheben, würde man fälschlicherweise Entwarnung geben, ohne daß dieses aufgrund der Belastung mit z.B. atropisomeren PCB gerechtfertigt wäre.

Die mono-*ortho*-PCB 105 und 118, die zu den sogenannten *mixed-type-inducern* gehören, wurden in sehr niedrigen (PCB 105) bzw. in Konzentrationen von 3-33 ng/g EOM gefunden (PCB118). Im Rahmen einer Toxizitätsbewertung sollten die *mixed-type-inducer*, in diesem Fall vor allem das PCB 118, nicht vernachlässigt werden, wenn eine möglichst umfassende Bewertung erfolgen soll.

Neben den PCB 138 und 180 konnte ein weiteres di-*ortho*-PCB, das PCB 170, vor allem in Fuchslebern in beträchtlichen Konzentrationen nachgewiesen werden. In den Rehen und Wildschweinen waren kaum Belastungen mit diesem Kongener festzustellen. Auch in der Fuchslunge wurden deutlich niedrigere Konzentrationen von 33 ng/g EOM gefunden.

Das hochhalogenierte PCB 187 konnte in dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist die Nachweisgrenze mit 1,6 ng/g EOM relativ hoch, so daß niedrige Konzentrationen nicht erfaßt werden können.

Umfangreiche Bemühungen wurden unternommen, um die MeSO₂-PCB in den Reh-, Wildschwein- und Fuchsproben nachzuweisen. Zunächst wurden GC-MS EI Messungen angestellt, die in keinem Fall nachweisbare Belastungen mit atropisomeren MeSO₂-PCB ergaben. Danach wurden besonders vielversprechende Proben ausgewählt, um die Messungen mit dem empfindlicheren GC-MS NCI in dem Prager Labor und parallel mit dem GC auf zwei Säulen unterschiedlicher Polarität zu wiederholen. Doch auch bei den Wiederholungsmessungen konnten keine MeSO₂-PCB nachgewiesen werden.

Hingegen in Human- und Pelikanfettproben wurden beträchtliche Konzentrationen festgestellt (**Tabelle 18**). Alle Einzelwerte der Humanfettproben sowie weitere Probandaten können im **Anhang** in den Tabellen **A4 und A5** nachgesehen werden. In den Humanfettproben wurden, ebenfalls wie bei den Füchsen, zu über 90 % des Gesamt-PCB-Gehaltes die DIN-PCB gefunden. Herausragend ist die PCB-Belastung des Pelikans des Prager Zoos mit 137037 ng/g EOM (bzw. 137,0 µg/g EOM). Es ist zu vermuten, daß die außergewöhnlich hohe PCB-Kontamination des 28 Jahre alten Tieres durch den täglichen Konsum von Fischen aus naheliegenden Gewässern verursacht wurde.

Tabelle 18: PCB-Konzentrationen im Fettgewebe von Humanproben (n =11) und einer Pelikanprobe

[ng/g EOM] PCB	Human- fett	Pelikan- fett
8	n.d.	55
18	n.d.	117
28	3±1	1208
31	n.d.	153
44	n.d.	807
47	n.d.	376
52	1±0	1711
66	n.d.	1269
70	n.d.	337
74	5±2	752
91	n.d.	157
95	n.d.	1279
101	5±1	4187
105	4±1	594
118	65±34	n.a.
128	n.d.	n.a.
132	n.d.	611
136	n.d.	n.a.
138	361±199	16570
149	7±5	7390
151	n.d.	4424
153	612±302	32292
156	n.d.	1825
163	n.d.	4924
170	11±3	7991
174	n.d.	n.a.
180	424±221	34303
187	n.a.	8471
194	6±1	3152
195	4±1	1132
206	0±0	618
209	1±0	332
Summe	1514±462	137037

*Nur in einer Probe quantifizierbar; n.d. = nicht detektierbar, n.q. = nicht quantifizierbar

Natürlich ist bei der Pelikanprobe zu berücksichtigen, daß es sich um eine Einzeluntersuchung handelt. Die extrem hohe PCB-Belastung dieser Probe ließ vermuten, daß auch die MeSO₂-PCB in nachweisbarer Menge entstanden sind. Von besonderem wissenschaftlichen Interesse ist deshalb die Frage, auf welche Weise ein Organismus auf extrem hohe PCB-Belastungen reagiert. Wie in **Tabelle 19** zu sehen ist, sind einige atropisomere MeSO₂-PCB in Konzentrationen deutlich überhalb der Bestimmungsgrenze in der Pelikanprobe vorhanden, die Belastungen der Humanfettproben sind vergleichsweise sehr gering. Bemerkenswert ist, daß die Methylsulfonylmetaboliten 3-132 und 4-132 in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden konnten, obwohl die Muttersubstanz nicht

mehr detektiert werden konnte. Auffällig ist an der Pelikanfettprobe, daß bevorzugt in *para*-Stellung substituierte Metaboliten entstanden sind.

Tabelle 19: Konzentrationen atropisomerer MeSO₂-PCB im Fettgewebe von Humanproben (n = 11) und einer Pelikanprobe

[ng/g EOM] Metabolit	Human- fett	Pelikan- fett
3-91	0,9*	4,1
4-91	n.d.	3,4
4-95	n.d.	3,5
3-132	0,5*	n.d.
4-132	0,6 ± 0,3	3,4
3-149	0,5 ± 0,2	6,3
4-149	0,6 ± 0,3	19,1
Summe	1,5 ± 1,1	39,8

*Nur in einer Probe quantifizierbar; n.d. = nicht detektierbar

Abschließend sollten die in den Humanfettproben und der Pelikanfettprobe gefundenen atropisomeren MeSO₂-PCB einer enantioselektiven Untersuchung mit einer auf 8 m gekürzten chiralen 6 Tx-2,3-Me-**b**-CD (20 % in SE 52)-Trennphase. unterzogen werden. Bereits bei den achiralen Untersuchungen lagen die Konzentrationen der MeSO₂-PCB in den Humanfettproben nahe der Bestimmungsgrenze, so daß diese Metaboliten in der enantioselektiven Analyse nicht mehr nachweisbar waren. Die Enantiomerenverhältnisse (*enantiomeric ratio* = ER) der Pelikanfettprobe werden in **Tabelle 20** wiedergegeben.

Tabelle 20: Enantiomerenverhältnisse (ER= erstelulierendes Enantiomer/zweitelulierendes Enantiomer = a/b) von MeSO₂-PCB in der Pelikanprobe

Metabolit	a [ng/g EOM]	b [ng/g EOM]	ER [a/b]
3-132	n.d.	n.d.	-
4-132	2,3	1,1	2,1
3-149	2,7	3,6	0,75
4-149	11,8	7,3	1,6

Leider konnte die enantioselektive Analyse die Metaboliten 3-91, 4-91 und 4-94 nicht erfassen. Glücklicherweise konnten aber die in Umweltproben relevantesten Enantiomere der MeSO₂-PCB 3-132, 4-132, 3-149 und 4-149 enantioselektiv analysiert werden. Beide in *para*-Stellung substituierten Metaboliten weisen ER von deutlich >1 auf, während sich für den in *meta*-Stellung substituierten Metaboliten 3-149 genau umgekehrte Verhältnisse, nämlich ER von <1 ergeben. Diese Ergebnisse befinden sich im Einklang mit Untersuchungen von Wiberg *et al.* und Ellerichmann *et al.*, die vor allem Fettgewebe, aber z.T. auch Leber und Lunge von verschiedenen Spezies wie Polarbären, Robben sowie Ratten und Menschen bezüglich der Enantiomerenverhältnisse dieser Metaboliten analysierten. ^[105,136]

6.4. Diskussion

Die schonende Aufarbeitungsmethode, die ohne oxidierende Säuren auskommt, konnte erfolgreich für PCB sowie MeSO₂-PCB validiert werden, indem Bestimmungs- und Nachweisgrenzen, Wiederholbarkeit, Reproduzierbarkeit, Wiederfindungsraten, Blindwerte bestimmt und außerdem auf die Robustheit der Methode geachtet wurde. Besonders wichtig war die Feststellung der guten Reproduzierbarkeit der leicht unterschiedlichen Methoden, bezogen auf unser und das Labor unserer Kooperationspartner in Prag, weil die erhaltenen Ergebnisse vergleichbar sein mußten. Vorteilhaft war, daß die von mir angewandte Methode mit den in diesem Arbeitskreis üblichen Modulen auskommt und somit leichter auch für andere Mitglieder des Arbeitskreises zu Verfügung steht.

Betrachtet man die Analysenergebnisse bezüglich der Muttersubstanzen und geht man davon aus, daß die DIN-PCB den allergrößten Anteil an der Gesamtbelastung mit PCB ausmachen, so kann man trotz etwas unterschiedlicher Kongenerenzusammensetzung, die den Untersuchungen zugrunde lagen, extreme Unterschiede in der PCB-Kontamination feststellen. Die Gesamtbelastung mit PCB reichte von 78 ng/g EOM im Wildschweinfett bis 137000 ng/g EOM im Pelikanfett. Aus dieser sehr unterschiedlichen Gesamtbelastung mit PCB wird schon deutlich, daß unterschiedliche Konzentrationen an MeSO₂-PCB gefunden werden müssen. Je nach trophischer Stufe und Spezies ist die Fähigkeit, PCB-Mutterverbindungen zu metabolisieren, stark unterschiedlich ausgeprägt. So lagen die Konzentrationen der MeSO₂-PCB bei den Reh-, Fuchs- und Wildschweinproben unter den Bestimmungsgrenzen, während die Humanproben diesbezüglich aus Sicht eines Umweltanalytikers vielversprechender waren, ebenso natürlich auch die Pelikanprobe. Vergleicht man die Konzentrationen der Mutterverbindungen mit denen der MeSO₂-PCB, werden klare Unterschiede in den Metabolisierungsgraden erkennbar, wie in den **Abb. 36** und **37** gezeigt wird.

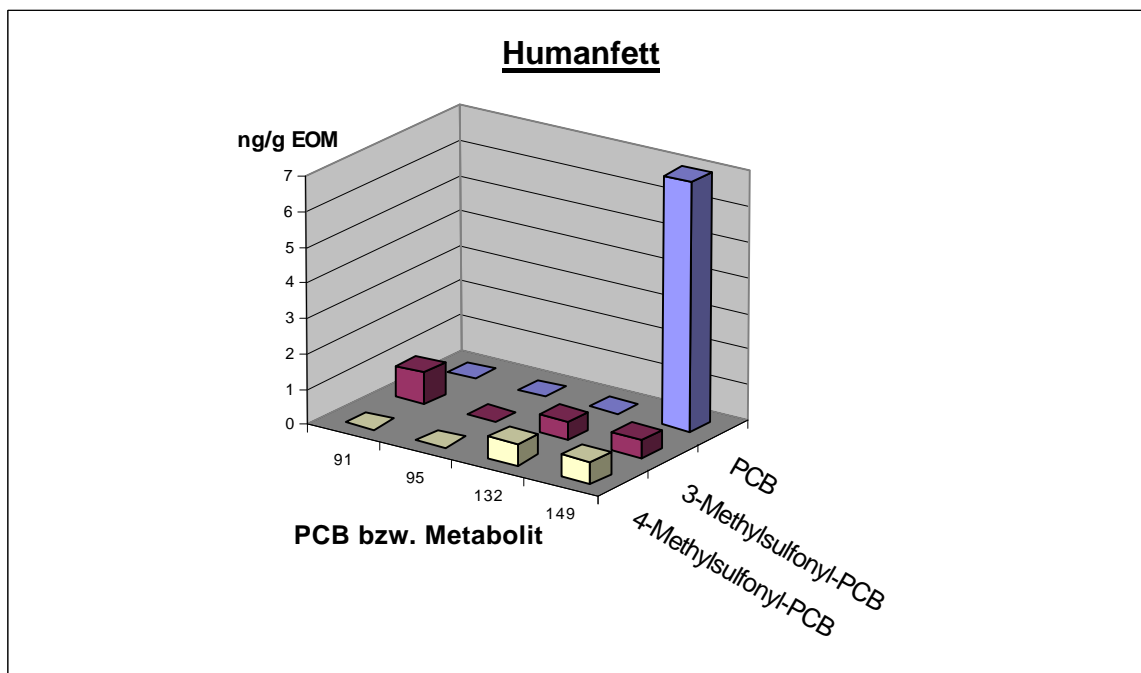


Abb. 36: Konzentrationen der atropisomeren 3- und 4-MeSO₂-PCB [ng/g EOM] im Vergleich zu den Muttersubstanzen in Humanfettproben

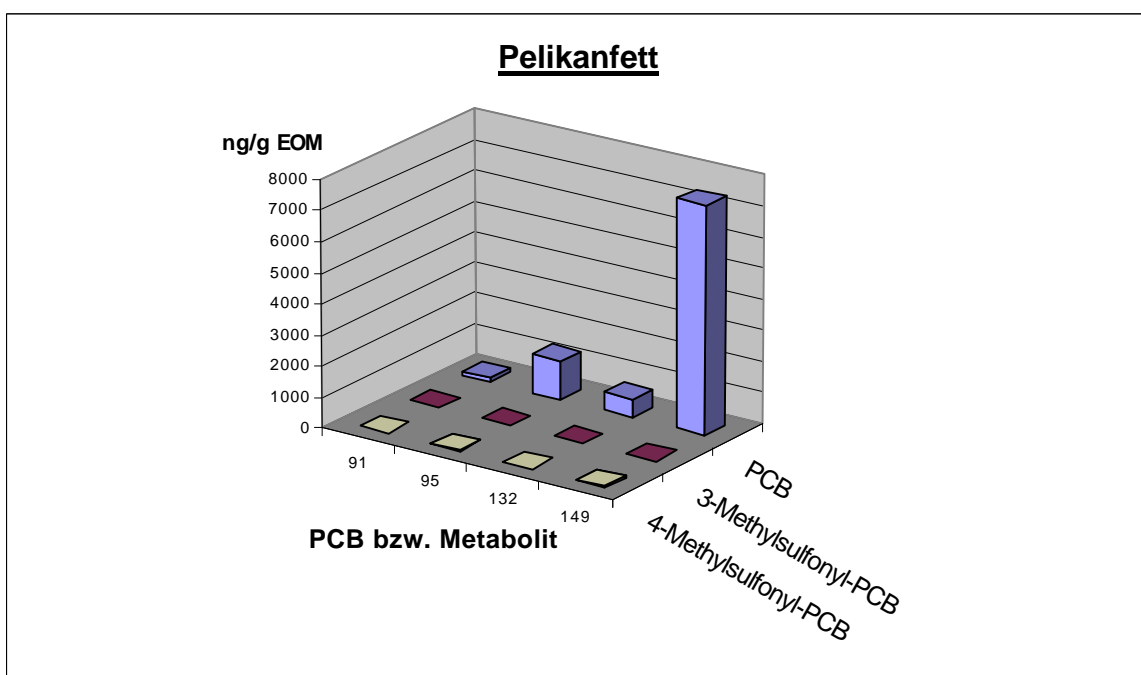


Abb. 37: Konzentrationen der atropisomeren 3- und 4-MeSO₂-PCB [ng/g EOM] im Vergleich zu den Muttersubstanzen in Pelikanfettproben

In den Humanfettproben wurden die MeSO₂-PCB 3-91, 3- und 4-132 in Konzentrationen nahe den Bestimmungsgrenzen gefunden. Deren Mutterverbindungen konnten allerdings

überhaupt nicht mehr bestimmt werden. Dieses zeigt einmal mehr die Dringlichkeit der Einbeziehung auch und vor allem der Metaboliten in die Analyse von Biota-Proben. Der Anteil an 3- und 4-149-Metaboliten im Vergleich zu ihrer Muttersubstanz betrug 16 %. Für die Pelikanfettprobe ergibt sich ein völlig anderes Bild: Die MeSO₂-PCB-Metaboliten der Kongenere 95, 132 und 149 wurden nur in Konzentrationen von 0,3 % bis 0,6 % im Vergleich zu den Mutterverbindungen gefunden, lediglich die Methylsulfonylmetaboliten des Kongeners 91 machten einen höheren Anteil im Vergleich zur Mutterverbindung aus.

Dieses zeigt einmal mehr deutlich die Abhängigkeit des Metolisierungsgrades von der jeweiligen Spezies. Der Mensch zählt zu der obersten Stufe des Nahrungsnetzes und verfügt über das effektivste Enzymsystem zum Abbau der Metaboliten. Obwohl in den Wildschwein-Reh- und Fuchsproben zum Teil höhere Konzentrationen der Muttersubstanzen gefunden wurden, konnten keine Metaboliten nachgewiesen werden. Es liegt nahe, daß das Abbauvermögen dieser Wildtiere für atropisomere PCB nicht so ausgeprägt ist, wie das des Menschen. In das Bild fügt sich die Pelikanfettprobe nahtlos ein. Lediglich, weil eine 1000-fach höhere Belastung z.B. des Atropisomers 149 gefunden wurde, konnten überhaupt MeSO₂-PCB im Pelikanfett nachgewiesen werden.

Seit der Aufklärung der absoluten Struktur der MeSO₂-PCB 3-149 und 4-132 war es endlich möglich, die *R*- und *S*-Konfiguration zuzuordnen. Auffällig ist, daß beide bevorzugt im Pelikanfett angereicherten Enantiomere des 4-132 und 3-149 die *R*-Konfiguration besitzen. Da es sich nur um zwei Metaboliten handelt, kann die Übereinstimmung zufällig sein. Dennoch ist ein weiteres Nachspüren dieses Sachverhaltes in weiteren Experimenten wünschenswert, weil das Verständnis um die strukturabhängige Retardierung der MeSO₂-PCB-Enantiomere sicherlich ausgeweitet werden kann, um natürlich auch letztlich Struktur-Wirkungszusammenhänge zwischen den atropisomeren Metaboliten und den degradierenden Enzymen zu erkennen und zu verstehen.

7. Zusammenfassung

Heutzutage liegt das Hauptproblem der PCB-Belastung nicht mehr in spektakulären Chemieunfällen wie die der 60er und 70er Jahre, namentlich den Yu Sheng- oder Yusho-Unfällen mit tausenden Opfern, sondern in der „Hintergrund-Belastung“ dieser Chlororganika. Diese führt zu einer permanenten Aufnahme geringer Mengen an Schadstoffen, die aufgrund ihrer Lipophilie ein hohes Bioakkumulationspotential aufweisen. Zwar hat sich der Gesetzgeber 1989 dazu durchgerungen, die Verwendung und das Inverkehrbringen der PCB in Deutschland zu verbieten, trotzdem nehmen die PCB-Belastungen nur sehr langsam ab. Diese persistenten Umweltkontaminanten sind über die Jahre hinweg in unterschiedlichen Konzentrationen in jedem von uns über die Aufnahmewege der Muttermilch oder über die Nahrung, und zwar nahezu weltweit, angekommen. Ob wir diese unsichtbaren und geruchlosen Substanzen aus unserem Bewußtsein verdrängen oder nicht, wir sind die Erben vergangener oder aktueller Umweltsünden und sie betreffen uns täglich. Die PCB werden im Körper eingelagert oder metabolisiert. Auf ihrem Weg durch den Körper entfalten sie ihre vielfältigen Einflüsse auf den Organismus. Die toxischen Auswirkungen der in hohen Konzentrationen aufgenommenen PCB sind zahlreich und seit den Yu Sheng- und Yusho-Unfällen Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen. Das heißt aber keinesfalls, daß daraus die Schlußfolgerung gezogen werden darf, daß PCB in geringeren Konzentrationen, wie sie heutzutage als „Hintergrund-Belastung“ in der Umwelt auftreten, unschädlich sind. Gerade hier besteht noch ein großer Bedarf an weiteren Untersuchungen, und deshalb ist es so wichtig, näheres über die toxikologische Wirkung der PCB und vor allem auch seiner unzureichend beachteten Metaboliten zu erfahren.

Atropisomere PCB bzw. MeSO₂-PCB eignen sich besonders gut als chirale Umwelt-Indikatoren, weil viele Enzymsysteme derartige aktivierenden Substrate enantioselektiv erkennen können. Bei der Vielzahl möglicher Substrate ist es notwendig, daß sie über hochselektive Erkennungsmechanismen verfügen, damit nur das „richtige“ Substrat an das Enzym binden kann. Da atropisomere MeSO₂-PCB biomimetisch z.B. auf den Glucocorticoid-Rezeptor wirken können, sind sie prädestiniert für die Studien über ihren Metabolisierungs- und Wirkmechanismus im Körper, über den immer noch viel zu wenig bekannt ist.

Bereits von Kato *et al.* wurde aufgeklärt, daß einige 3-MeSO₂-PCB verschiedene Cytochrome signifikant induzieren können.^[63,144] Als Konsequenz ist es naheliegend, anzunehmen, daß ein Teil der toxischen Effekte, die von PCB induziert werden, von den MeSO₂-PCB stammen. Sowohl enantioselektive Transformation als auch differenzierte toxische Effekte der Enantiomere sind postuliert worden. Eine Verifizierung dieser Annahmen erforderte die enantioselektive HPLC-Trennung der MeSO₂-PCB-Enantiomere,

die Bestimmung der absoluten Strukturen und eine systematische Untersuchung der enantioselektiv bedingten toxischen Effekte der MeSO₂-PCB-Enantiomere. Das Wissen über die absoluten Strukturen wird einen tieferen Einblick in die Enzym-Substrat-Wechselwirkungen bezüglich der PCB-Transformationsprozesse erlauben und nähere Erkenntnisse bezüglich des Mechanismus der chiralen Substrat-Selektion einiger Enzyme liefern können.

Zunächst mußten die racemischen MeSO₂-PCB quantitativ in ihre Enantiomere getrennt werden. Auf dieser Enantiomerentrennung aufbauend, sollte zunächst die absolute Struktur dieser Metaboliten aufgeklärt werden. Anschließend sollten die Enantiomere für toxikologische Untersuchungen verwendet werden. Deshalb befaßt sich der erste Teil dieser Arbeit mit der quantitativen Enantiomerentrennung von MeSO₂-PCB mittels chiraler Trennphasen. Die HPLC ist für derartige Enantiomerentrennungen die chromatographische Methode der Wahl, weil bei optimierter Vorgehensweise in relativ kurzer Zeit die für weitergehende Experimente notwendigen Quantitäten enantioselektiv getrennt werden können. Zunächst mußten adäquate Trennsäulen gefunden werden. Die Wahl fiel auf eine permethylierte und eine unvollständig methylierte **b**-Cyclodextrinsäule. Generell haben sich bislang nur Cyclodextrinderivate für die Enantiomerentrennung der atropisomeren PCB als geeignet erwiesen. Mit kovalent gebundenen makrozyklischen Antibiotika als stationäre Phase gelang hingegen keine Enantiomerentrennung. Bemerkenswert ist, daß selbst geringe Unterschiede im Methylierungsgrad des Säulenmaterials zu völlig unterschiedlich guten Enantiomerentrennungen derselben MeSO₂-PCB führen können. Das zeigt einmal mehr, wie empfindlich enantioselektive Trennungen selbst auf kleinste Änderungen der Zusammensetzung des Säulenmaterials oder der Trennparameter reagieren.

Der erste Schritt in der Enantiomerentrennung bestand in der Optimierung der HPLC-Trennparameter. Im zweiten konnte durch Optimierung des Trennverfahrens und durch Einführung eines *peak*-Höhen-gesteuerten *autosamplers* der Zeit-, Kosten- und Lösungsmittelaufwand drastisch verringert werden. Das optimierte Verfahren erlaubt jetzt selbst dann eine quantitative Enantiomerentrennung, bei gleichzeitig hohen Ansprüchen an die Reinheit (> 99,x %), wenn die Enantiomere nur angetrennt sind (T >50 %). Quantitativ konnten die Enantiomere der MeSO₂-PCB 3-91, 3-132, 4-132, 3-149, 4-149 und 3-174 in Mengen zwischen 0,3 und 3,1 mg erfolgreich getrennt werden.

Nach der polarimetrischen Bestimmung der Drehrichtung einiger MeSO₂-PCB sollte im zweiten Teil dieser Arbeit die Aufklärung der absoluten Strukturen dieser Metaboliten erfolgen. Bisher wurde die absolute Struktur meistens mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Da einige Substanzen nur schlecht oder gar nicht kristallisieren oder unter Standardbedingungen nicht in kristalliner Form vorliegen, mußte nach neuen Möglichkeiten

der Aufklärung der absoluten Konfiguration gesucht werden. Weil im vorliegenden Fall keine MeSO₂-PCB-Einkristalle zu erhalten waren, fiel die Entscheidung für die VCD (*vibrational circular dichroism*), in Verbindung mit quantenchemischen *ab initio* Berechnungen.

Die VCD ist eine IR-spektroskopische Polarisationsmethode. Verwendet wird zirkular polarisiertes Infrarotlicht, welches auf die chirale Probe trifft und zu einem Differenzspektrum führt, das erhalten wird, wenn die Absorption von rechts zirkular polarisiertem Licht von der Absorption des links zirkular polarisierten Lichts subtrahiert wird. Für achirale Substanzen oder racemische Mischungen ist diese Differenz gleich null, während bei chiralen Verbindungen für die reinen Enantiomere komplementäre Spektren erhalten werden. VCD-Spektren sind schwierig zu bekommen, weil die Differenz zwischen den Wechselwirkungen mit links und rechts zirkular polarisiertem Licht im Bereich von 10⁻⁴ bis 10⁻⁵ Absorptionseinheiten liegen, so daß nur sehr hochwertige und empfindliche Spektrometer in Frage kommen, wie sie vor allem in jüngster Zeit entwickelt worden sind.

Für jedes Enantiomer wurden spezifische VCD-Spektren erhalten, aber ein Rückschluß des Spektrums auf das respektive Enantiomer nur auf empirischer Basis war unmöglich, weil es schwierig ist, die Interaktionen von einer bestimmten Vibrationsschwingung mit zirkular polarisiertem Licht vorherzusagen. Somit mußten computersimulierte Spektren erzeugt werden, um die absolute Konfiguration der Enantiomere aus den experimentellen Daten zu folgern, z.B. mußten quantenchemische *ab initio*-Berechnungen angestellt werden, welche die Vibrationsschwingungen eines Moleküls und dessen Interaktion mit zirkular polarisiertem Licht im Computer simulieren konnten.^[145] Normalerweise kann eine Zuweisung der Banden in dem experimentellen Vibrationsspektrum zu den Normalschwingungen des Moleküls ausgeführt werden. In dem Fall der PCB-Derivate würde dies extrem schwierig sein, weil die Anzahl der Normalschwingungen für diese Moleküle sehr hoch ist. Deshalb ist in der vorliegenden Arbeit die Zuordnung der VCD-Spektren der Enantiomere durch Vergleich der experimentellen mit den berechneten Spektren erfolgt.

Die Vorgehensweise war dabei wie folgt: Zuerst wurde eine rechnerische Geometrieoptimierung der MeSO₂-PCB durchgeführt. Diese ergab ein relativ flaches Energieminimum bei einem Winkel der beiden Phenylringe von 88° bis 90° zueinander. Daraufhin wurde das VCD-Spektrum für die optimierte Geometrie der MeSO₂-PCB berechnet, aber der Vergleich zu den experimentellen Spektren der beiden Enantiomere lieferte zunächst unbefriedigende Resultate. Erst die Einbeziehung der außerdem energieminimierten Energiehyperflächen der Methylsulfonylgruppe erbrachte eine gute Vergleichbarkeit der experimentellen und der berechneten Spektren in der Region zwischen 1400 cm⁻¹ und 1100 cm⁻¹. Dazu wurden die Energieminima für die Methylsulfonylgruppe, bei gleichzeitig fixierter Geometrie des restlichen Moleküls im Energieoptimum, berechnet. Insgesamt wies diese drei unterscheidbare Energieminima auf. Zwei der drei Strukturen waren bezüglich der Energieminima gleich, die dritte wies eine vergleichsweise hohe Energie

auf. Deshalb wurden die Spektren im Verhältnis 2:2:1 gewichtet und zu einem Spektrum verschmolzen. Aus dem Vergleich der kalkulierten und experimentellen Spektren konnte die absoluten Strukturen der MeSO₂-PCB 3-149, 3-132, 4-132 und 3-174 aufgeklärt werden. Zum ersten Mal konnte für relativ komplexe und flexible Moleküle, wie die PCB-Metaboliten, gezeigt werden, daß unsere experimentelle Herangehensweise eine wirkungsvolle Methode für die Bestimmung der absoluten Konfiguration chiraler Substanzen eröffnet hat.

Der dritte Teil dieser Arbeit befaßt sich mit der toxikologischen Wirkweise der MeSO₂-PCB im Körper. In vielen Fällen sind es gerade diese Metaboliten, die z.B. in die Hormonsynthese eingreifen. Erkenntnisse aus Untersuchungen von Johansson *et al.* belegen, daß verschiedene MeSO₂-PCB in der Lage sind, z.B. die in den Nebennierenrinden beherbergte Glucocorticoidsynthese zu inhibieren. Da dieser Effekt bei den Mutterverbindungen nicht festgestellt wurde, kann davon ausgegangen werden, daß nur die Metaboliten dafür verantwortlich sind. Trotzdem werden die PCB-Metaboliten in Toxizitätsabschätzungen bislang nicht berücksichtigt.

Zwar ist bekannt, daß pharmakologische oder toxische Effekte von chiralen Pharmaka oft nur auf ein Enantiomer zurückzuführen sind, aber über chirale Umweltschadstoffe ist in dieser Hinsicht nur wenig bekannt, noch weniger über ihre Metaboliten. Deshalb ist es erforderlich, das Wissen über die Wirkweise und das toxikologische Potential der chiralen MeSO₂-PCB auszudehnen. In Zusammenarbeit mit C. Larsson und M. Johansson sollte der Einfluß der reinen MeSO₂-PCB-Enantiomere auf die Transkriptionsrate des Glucocorticoid-Rezeptor (GR)-abhängigen Enzyms Tyrosinaminotransferase (TAT) untersucht werden. Binden MeSO₂-PCB kompetitiv stärker an den GR als Dexamethason, blockieren sie diesen und erniedrigen in der Folge die Transkriptionsrate des TAT-Enzyms.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß beide Enantiomere des 4-149 Auswirkungen auf den Glucocorticoid-abhängigen Signalübertragungspfad hatten, während dies bei beiden Enantiomeren des 3-149 nicht der Fall war. Diese Beobachtung befindet sich in Einklang mit einer Studie der gleichen Zelle, in der das racemische 3-149 ebenfalls keine Effekte zeigte (Johansson *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß der GR nicht enantiopräferiert von den MeSO₂-PCB inhibiert wird, der GR somit über keine enantioselektive Erkennung bezüglich der MeSO₂-PCB verfügt. Allerdings unterschieden sich sehr wohl die Stellungsisomere 3-149 und 4-149 in ihren inhibitorischen Effekten. Die *para*-Position des 4-149 bewirkte eine stärkere Inhibierung des GR, vermutlich deshalb, weil dieses Molekül aufgrund seiner Linearität weniger sterische Hinderungen verursachte.

Neben der Studie über inhibitorische Einflüsse der MeSO₂-PCB auf das Hormonsystem war es von Interesse, weitere Erkenntnisse über das Abbauverhalten der PCB in der Leber zu erhalten. Da die Leber zu den aktivsten Organen im Stoffwechsel zählt, stehen die Hepatozyten im Zentrum der PCB-Forschung, wenn es darum geht, weitere Erkenntnisse über

den Abbaumechanismus der PCB zu erhalten. Bisher konnten schon einige Ergebnisse bezüglich des Abbauverhaltens der PCB festgestellt werden, z.B. daß in *para*-Position substituierte Metaboliten gegenüber den in *meta*-Position substituierten in Überzahl entstanden waren. In einer weiteren Untersuchung wurden Ratten die reinen radioaktiv markierten Enantiomere des 3-149 und das radioaktiv markierte 4-149 als Racemat i.V. injiziert. Das racemische 4-149 zeigte nur eine geringe Exkretion in die Galle bzw. Intestinaltrakt und bestätigte somit die in der vorhergehenden Untersuchung gefundene höhere Akkumulation der an 4-Position substituierten MeSO₂-PCB in der Leber. Ähnlich geringe Exkretionsraten zeigte auch das zweiteluierende 3-149 Enantiomer. Die in Galle und Intestinaltrakt gefundene Radioaktivität stammte nahezu vollständig von dem ersteluirenden Enantiomer. ^[133]

Die früheren Untersuchungen konnten allerdings nicht abschließend klären, ob entweder eine enantioselektive Bildung der MeSO₂-PCB aus den PCB erfolgt oder ob das ersteluirende Enantiomer verstärkt abgebaut wird. Die Vermutung lag nahe, daß letzteres zutreffen könnte. Um diese These zu beweisen, wurde von mir folgendes Experiment vorgenommen: Mit einer Nährlösung präparierte Rattenhepatozyten sollten mit dem PCB 149 und in einer zweiten Petrischale mit dem 3-149 Metaboliten versetzt werden und nach der Aufarbeitung mittels GC und GC/MS auf enantioselektives Metabolisierungsverhalten untersucht werden.

Die Untersuchung ergab, daß die Muttersubstanz, das PCB 149, nicht enantioselektiv abgebaut wurde, das Transformationsprodukt 3-149 aber sehr wohl. Wird davon ausgegangen, daß hauptsächlich MeSO₂-PCB aus den Muttersubstanzen gebildet wurden, muß daraus folglich geschlossen werden, daß die für den Metabolismus zum Methylsulfonyl-Abbauprodukt verantwortlichen Cytochrome und weiteren Enzyme keinen chiralen Diskriminierungsschritt enthalten. Sofern die racemischen 3-149 Metaboliten entstanden sind, werden sie entweder enantioselektiv weiter metabolisiert oder enantioselektiv transportiert. Experimente mit Hepatozyten sind diesbezüglich sehr sinnvoll, weil sie eine vom restlichen Organismus getrennte Betrachtung der Leber und somit Rückschlüsse auf die ihre spezifische Arbeitsweise erlauben. Im Falle der weiteren Metabolisierung der 3-149 Metaboliten würden spezifischere, d.h. enantioselektiv arbeitende Enzyme in den Prozeß eingreifen. In Anbetracht der Ergebnisse von Johansson *et al.* ist es auch denkbar, daß der enantioselektive Schritt in einem selektiven Transport zu den Ausscheidungsorganen liegen könnte. ^[133] Weitere Experimente werden diesen Sachverhalt aufklären müssen.

Das abschließende Kapitel dieser Arbeit befaßt sich mit der Analyse verschiedener terrestrischer Biotaprogen auf PCB und MeSO₂-PCB. Untersucht wurden Füchse aus Schleswig-Holstein, Rehe und Wildschweine aus der Region um Dessau und Humanproben aus Prag sowie ein Pelikan aus dem Prager Zoo. Neben dem Fettgewebe bei allen Biotaprogen wurde bei den Wildschweinen und Rehen auch Leber- und Lungengewebe

analysiert. Verglichen mit anderen Chlororganika wurden PCB in den Fuchs- Wildschwein- und Rehproben in relativ geringer Konzentrationen gefunden (78 - 1566 ng/g EOM). Im Gegensatz dazu wurden im Humanfett hohe PCB-Konzentrationen festgestellt, übertroffen nur noch von der Pelikanfettprobe (137 µg/g EOM). Bei den Fuchs-, Wildschwein- und Rehproben lagen die Konzentrationen der MeSO₂-PCB unter und in den Humanproben leicht über der Bestimmungsgrenze. Tendenziell wurden die in *para*-Stellung substituierten Metaboliten in höheren Konzentrationen als die in *meta*-Stellung substituierten gefunden. Die Pelikanfettprobe war aufgrund der höheren Konzentration an MeSO₂-PCB-Metaboliten auch der enantioselektiven gaschromatographischen Analyse zugänglich. Die Enantiomerenverhältnisse ergaben eine Bevorzugung des ersteluiden Enantiomers der 4-MeSO₂-PCB und umgekehrte Verhältnisse der 3-MeSO₂-PCB und damit eine generelle Präferenz der *R*-Konfigurationen.

8. Summary

Nowadays, the main problem of PCB-contamination is not related to spectacular accidents as encountered in the 60ties and 70ties, in particular Yu Sheng or Yusho with thousands of victims, but it is connected to the “background-contamination” of these chlorinated compounds. This leads to a permanent uptake from little amounts of contaminants which exhibit a high bioaccumulation potential according to their lipophilic properties. Though the legislator restricted the usage of PCB in 1989, the PCB-burden is decreasing very slowly. These persistent environmental contaminants have arrived in everyone of us, world wide in different concentrations, via the uptake from mother milk or from food. Insofar, we are the heirs of past or present environmental sins and we have to cope with it daily. On their way through the body these substances show influences on various life processes. The toxicological effects of PCBs are manifold and since the Yu Sheng and Yusho accidents matter of countless investigations. Decreasing and relatively low concentrations as encountered nowadays, do not allow the conclusion that the PCB problem has been solved. On the contrary, special emphasis is now being placed on the toxicological effects of PCB and their metabolites. Possibly, PCB-metabolites exert an additional influence on the sensitised immune system of many people.

Atropisomeric PCB and MeSO₂-PCB, respectively, are assumed to represent good chiral indicators, because many enzyme systems can recognise these activating substrates enantioselectively. According to the numerous possible substrates it is necessary that they possess highly selective recognizing mechanisms, in order to allow the “right” substrate only to bind to the receptor of the enzyme. As atropisomeric MeSO₂-PCB can exert biomimetic effects on the glucocorticoid-receptor, they are predestined for studies about their metabolism- and effect-mechanisms in the body.

Kato *et al.* already reported that some 3-MeSO₂-PCBs can induce different cytochromes significantly.^[63,144] Consequently, it was assumed that part of the toxicological effects induced by PCBs actually are related to MeSO₂-PCB. Furthermore, differential toxic effects of the MeSO₂-PCB enantiomers have been postulated. A verification of these assumptions required the enantioselective separation of the MeSO₂-PCB-enantiomers by HPLC, the determination of the absolute structures and a systematic investigation of the different toxic effects of the MeSO₂-PCB-enantiomers. The knowledge about absolute structures will allow a deepened insight into the enzyme-substrate-interactions according to the PCB-transformation processes and a closer view related to the mechanism of the enantioselective substrate-selection of some enzymes.

First the racemic MeSO₂-PCB had to be separated into their enantiomers quantitatively, followed by the determination of the absolute structure as well as different toxic effects of

these enantiomers. Therefore, the first part of this work deals with the quantitative enantioselective separation of the MeSO₂-PCB with chiral stationary phases using HPLC which allowed to obtain sufficiently high amounts of pure enantiomers for further experiments in a short time. In the present case optimum separation was achieved by a permethylated and an incompletely methylated **b**-cyclodextrine-column, respectively. In general only cyclodextrine-derivates have been shown to be useful in the enantiomeric separation of the atropisomeric PCB. Covalently bound macrocyclic antibiotics did not allow any enantiomeric HPLC-separation. It is worth noting that even slight differences in the degree of methylation can give rise to totally different results in enantiomeric separation of the same MeSO₂-PCB. This emphasises how sensitively enantioselective separations are responding to very small variations in the composition of the column-material or the system parameters.

The first step of the study on the enantioselective separation consisted of the optimisation of the HPLC-parameters. In a second step the system was further optimised by introducing a peak-high-controlled autosampler, thus reducing the time-, cost and solvent-expense drastically. The optimised process allowed a quantitative enantiomeric separation with high purity (> 99,x %), even when the enantiomers are not baseline separated (T > 50 %). The enantiomers of the MeSO₂-PCB 3-91, 3-132, 4-132, 3-149, 4-149 and 3-174 were separated successfully in amounts between 0,3 and 3,1 mg.

After polarimetric determination of the sense of rotation for MeSO₂-PCB 3-132 and 4-132 the second part of this work aimed at the determination of the absolute structures of 3-132, 4-132, 3-149 and 3-174. As these congeners did not crystallise sufficiently well-shaped for x-ray investigations, new possibilities to determine the absolute molecular structure had to be found. It turned out that VCD (vibrational circular dichroism) in combination with *ab initio* calculations in the present case was an appropriate approach.

VCD is an IR spectroscopic polarisation method, where circular polarised infrared light in presence of a chiral sample leads to a difference spectrum, which is obtained when the absorption of the right circularly polarised light is subtracted from the absorption of the left polarised light. For achiral substances this difference is zero, while pure enantiomers lead to complementary spectra. VCD-spectra are difficult to obtain because the difference between the interactions of left and right circularly polarised light are in a range from 10⁻⁴ to 10⁻⁶ absorption units, so only very few valuable and sensitive spectrometers which were developed in the last years are able to cope with these strict requirements.

For every enantiomer specific VCD spectra were obtained, but an assignment of the spectrum to the respective enantiomer on empirical basis only was impossible, because it is difficult to predict the interactions of a certain vibration mode with circularly polarised light. So it was necessary to produce computer simulated spectra to infer the absolute configuration

of the enantiomers from the experimental data. Therefore, quantum chemical *ab initio* computer calculations had to be performed which were able to simulate the vibration modes of a molecule and its interactions with circularly polarised light. Usually, an assignment of the bands in the experimental vibration spectrum to the normal mode of the molecule can be achieved. However, in the case of the PCB derivatives this would be extremely difficult, because the number of normal modes for these molecules is very high. As a consequence, the assignment of the VCD-spectra in this work was accessible only by comparison of the experimental with the calculated spectra.

The approach was as follows: First a calculated geometric optimisation of the MeSO₂-PCB was performed. The result was a relatively flat energy minimum of the phenyl rings at an angle of 88° to 90°. Thereafter, the VCD-spectrum was calculated for the optimised geometry of the MeSO₂-PCB, but the comparison with the experimental spectra of both enantiomers was still unsatisfactory. Then, the energy minimised potential energy surface scans of the methylsulfonyl group were also included into the calculation. This was leading to a good comparability of the experimental and calculated spectra in the region between 1400 cm⁻¹ and 1100 cm⁻¹. Therefore, the energy minima for the methylsulfonyl group with fixed geometry in the rest of the molecule were calculated. In total three distinguishable energy minima were obtained. Two of the three structures were the same regarding the energy minima while the third structure showed a relatively high energy. Therefore, the spectra were weighed in the relationship 2:2:1 and fused to one spectrum. Comparison of the calculated with the experimental spectra allowed the determination of the absolute structures of the MeSO₂-PCB 3-149, 3-132, 4-132 and 3-174. Thus it was shown that our experimental approach represents a powerful method for the determination of the absolute configuration of relatively complex and flexible chiral substances such as the MeSO₂-PCBs.

The third part of this work deals with the toxicological effects of the MeSO₂-PCB on living beings. Results from joint investigations of Johannsson *et al.* and the present author prove that different MeSO₂-PCB are able to inhibit the glucocorticoid synthesis in the cortex of suprarenal gland. As this effect was not observed for the respective parent compounds, it can be safely assumed that inhibition effects of this kind that may be found in extracts of environmental samples have to be rather attributed to the action of the metabolite than to the parent PCB. Furthermore, these results stress the necessity of including the transformation products in toxicological studies of environmental contaminants.

Differential pharmaceutical as well as toxic effects are well documented for chiral pharmaceuticals, but the knowledge on enantioselective toxic effects of chiral environmental contaminants is scarce. Therefore, it was another aim of the present work to extend the knowledge about receptor interaction mechanisms and the toxicological potential of the chiral MeSO₂-PCB. In co-operation with C. Larsson and M. Johansson the influence of the pure MeSO₂-PCB enantiomers on the transcription rate of the glucocorticoid receptor (GR)

dependent enzyme tyrosinaminotransferase (TAT) was investigated. If the MeSO₂-PCBs bind competitively stronger to the GR than dexamethasone they block it and lower, as a consequence, the transcription rate of the TAT-enzyme.

Our results have shown that both enantiomers of the 4-149 exert an impact on the glucocorticoid dependent signalling pathway, while this was not the case for both enantiomers of the 3-149. This observation was in agreement with a study of the same type of cells, where the racemic 3-149 was not exerting any effects (Johansson *et al.* in preparation). The results have shown that the GR is not inhibited enantioselectively by the MeSO₂-PCB, and that the GR has no enantioselective recognition with regard to these MeSO₂-PCBs. But the isomers 3-149 and 4-149 possess significantly different effects regarding the inhibitory effects. The *para*-position of the 4-149 caused a stronger inhibition of the GR, possibly because this linear molecule causes less steric hindrance.

In addition to the study about the inhibitory influences of the MeSO₂-PCB on the hormone system the transformation of PCBs in the liver was of particular interest, because the liver is one of the most active metabolising organs. Laboratory investigations with hepatocytes showed that in *para*-position substituted metabolites were preferentially formed as compared with the respective *meta*-derivative. In a further study the pure radioactive labelled enantiomers of the 3-149 as well as the radioactive labelled 4-149 racemate were injected into the veins of rats. The racemic 4-149 showed a lower excretion rate into the bile and the intestinal tract, respectively. This is in line with higher accumulation rates of 4-MeSO₂-PCB in the liver reported in the literature. Similar low excretion rates also showed the second eluting enantiomer. The radioactivity found in bile and intestinal tract stemmed nearly completely from the first eluting enantiomer.^[133]

These observations can be based on an enantioselective formation of the second-eluting 4-MeSO₂-PCB, or, alternatively on a preferential transformation of the first-eluting enantiomer. Clarification of this problem was expected by the following experimental approach: Rat hepatocytes, treated with a liquid fertilizer, were mixed with PCB 149 and in a second petri dish with the 3-149 metabolite. After cleanup of the samples enantioselective transformation was analysed using GC-ECD and GC-MS.

The investigation showed that the parent PCB 149 was not transformed enantioselectively in contrast to its metabolite 3-149. If it is assumed that mainly the 3-149 is formed by transformation of the parent compound, it can be concluded that the cytochromes and enzymes which are responsible for the transformation process do not include a chiral discrimination information. It should be noted that in addition to enantioselective formation and transformation processes also enantioselective transport processes may play a role. This can only be settled by further experiments.

The last chapter of this work is dealing with the organ-specific analysis of PCB and MeSO₂-PCB in terrestrial biota-samples. Foxes from Schleswig-Holstein, boars and deer from the Dessau-region close to the former chemistry plant Bitterfeld and human samples from Prague, as well as a pelican from the zoo Prague were selected for these analyses. In all biota-samples fat tissue was investigated, while lung- and liver-tissues were analysed in boars and deers only. Compared to other chlorinated compounds PCB have been detected in fox-, boar- and deer-samples in relatively low concentrations (78 – 1566 ng/g EOM). However, in human samples high amounts of PCB were detected, exceeded by the pelican fat sample only (137 µg/g EOM). For the fox-, boar- and deer samples the MeSO₂-PCB concentrations ranged below and the human samples slightly above the limit of quantitation. In general the *para*-substituted metabolites were found in higher concentrations than the *meta*-substituted ones. The pelican fat sample was accessible to enantioselective gas chromatographic analysis due to higher MeSO₂-PCB concentrations. The enantiomeric ratios showed a preference of the first-eluting enantiomer for the 4-MeSO₂-PCB and of the second-eluting enantiomer for the 3-MeSO₂-PCB, which in both cases is consistent with a preference of the *R*-configuration.

9. Ausblick

Die Enantiomerentrennung chiraler Substanzen wird neben der enantiospezifischen Synthese eine Herausforderung für die Zukunft bleiben. Aufgrund von energetisch sehr kleinen Differenzen sind chirale Selektoren in der Lage, die Enantiomere zu trennen. In dieser Arbeit ist es gelungen, die MeSO₂-PCB in einem optimierten Verfahren mittels chiraler permethylierter **b**-Cyclodextrin-HPLC-Trennphasen in kurzer Zeit in Milligrammengen in ihre Enantiomere zu trennen. Die Vereinfachung der Enantiomerentrennung ist Voraussetzung für die leichte Zugänglichkeit dieser enantiomerenreinen Substanzen für weitere Experimente.

In der Natur spielen chirale Diskriminierungen eine wichtige Rolle, insbesondere auch bei Enzym-Substrat-Wechselwirkungen. Durch die in dieser Arbeit gelungene Aufklärung der absoluten Struktur kann ein neues und herausforderndes Kapitel im Verständnis der enantiospezifischen Substraterkennung aufgeschlagen werden. Die Anwendbarkeit der Erkenntnisse wird nicht nur auf PCB und deren Metaboliten beschränkt bleiben. Der Mechanismus, der zur chiralen Selektion der Substrate durch die Enzyme führt, ist auch auf dem sehr wichtigen Gebiet der pharmazeutischen Anwendungen zur Bekämpfung von Krankheiten von großer Bedeutung. Praktisch alle neu zugelassenen chiralen Medikamente müssen entweder enantiomerenrein sein oder aber hinsichtlich der Wirkung für alle vorhandenen Enantiomere getestet werden. Diese kritische Inaugenscheinnahme kommt nicht von ungefähr. Immer wieder kam es in der Geschichte der Medizin zu extrem schädlichen Nebenwirkungen weiterer in dem Medikament enthaltener, aber auf ihre Schädlichkeit hin nicht untersuchter Enantiomere. Auf dem Weg, die chirale Diskriminierung der Enzyme zu verstehen, ist es ausgenommen nützlich, die exakte dreidimensionale Struktur der Substrate zu kennen, um sie mit der räumlichen Struktur der Enzyme korrelieren zu können. Sind also die Enzyme oder Proteine erst genau bekannt, die für die chirale Diskriminierung der MeSO₂-PCB verantwortlich sind, können Bindungsstudien veranlaßt werden. Aus toxikologischen Experimenten ist bereits bekannt, daß z.B. das ersteluerende Enantiomer des 3-149 verstärkt abgebaut oder abtransportiert wird. Ist das dafür verantwortliche Enzym oder Protein erst lokalisiert und ausfindig gemacht worden, so könnte endlich mit Hilfe von Computersimulationen herausgefunden werden, welche Bindungsassoziationen zwischen Substrat und Enzym zur chiralen Diskriminierung führen. Schon lange wartet die Frage nach dem Mechanismus der chiralen Diskriminierung auf eine Antwort. In dieser Arbeit konnte mit der Aufklärung der absoluten Struktur chiraler MeSO₂-PCB ein wichtiger Beitrag zur Lösung dieser Frage geleistet werden. Aber noch immer warten anspruchsvolle herausfordernde Aufgaben dieser Fragestellung auf ihre Lösung. Gelänge die endgültige Aufklärung der chiralen Diskriminierung, könnten diese Erkenntnisse direkt der Pharmaforschung zu gute kommen.

Neben dieser sehr umfangreichen weiteren Fragestellung wären auch weitere toxikologische Untersuchungen wünschenswert, weil im Rahmen dieser Arbeit zwar geklärt werden konnte, daß kein enantioselektiver Schritt im Abbau der Muttersubstanzen des PCB 149 zu den konjugierten MeSO₂-PCB stattfindet, aber nicht, ob in dem weiteren Abbau dieser Metaboliten oder dem Abtransport des ersteluirenden Enantiomers die enantioselektive Bevorzugung stattfindet. Der Abbaumechanismus ist zwar schon intensiv von vielen Forschern untersucht und weitgehend aufgeklärt worden, aber noch immer gibt es Lücken, den Weg eines PCB durch den Körper zu verfolgen und seine Metabolisierung zu verstehen. Nach wie vor gilt es, diese verbleibenden Lücken zu schließen, um letztendlich auch toxikologischen Phänomenen, wie z.B. der Entstehung der Chlorakne, auf die Spur zu kommen.

Schließlich wurden in einer Untersuchung verschiedener Biota-Proben unterschiedliche PCB- und MeSO₂-PCB Kontaminationen in unterschiedlichen Organen gefunden. Da insbesondere auch in Humanfettproben höhere MeSO₂-PCB- und PCB-Gehalte gefunden worden sind, wären Untersuchungen von Humanlunge oder Humanleber interessant, um die Ergebnislage zu komplementieren. Enantioselektive Untersuchungen der Metaboliten, die auch andere Abbauprodukte neben den MeSO₂-PCB einschließen könnten, sowie der Muttersubstanzen würden ein umfassendes Bild der Enantiomerenverteilung im menschlichen Organismus liefern.

Außerdem konnten zum Teil erhebliche Umweltbelastungen z.B. mit *b*-HCH und *p,p'*-DDE sowie weiteren Chlororganika in den Proben aus Dessau festgestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur illustrativ auf diese Belastungen eingegangen werden. Deshalb wäre eine systematische großangelegte Analyse von Biota-Proben dieser Region sehr wünschenswert, um einmal deutlich zu zeigen, daß die dortige Umweltverseuchung ein langwieriges unerwünschtes Erbe sein wird, die nicht unter dem Mantel der Verschwiegenheit vergessen wird.

10. Experimenteller Teil

10.1. Experimentelle Daten zu: Chromatographische Methoden

10.1.1. HPLC

Das HPLC-System bestand aus einem Probengeber *Gina 50*, einer Gradientenpumpe *Modell 480*, einem Kolonnenthermostat *STH 585*, einem UV-Detektor *340s* (hauptsächlich 254 nm), der Datenaufnahmesoftware *Gynkotech 5.5* (alle Geräte und Software von *Gynkotech*, Germering, Deutschland) und einem Fraktionssammler *SF-2120 (Advantec/MFS, CA, USA)*. Bei den HPLC-Säulen handelte es sich um eine 250 x 8 mm unvollständig methylierte β -Cyclodextrin-Säule und um eine 250 x 8 mm PerMe-Cyclodextrin-Säule (*Macherey-Nagel*, Düren, Deutschland).

10.1.1.1 GC

a) Gaschromatograph: GC 8180 (*Fa. Carlo Erba*)

- Säule 1: CB-Säule belegt mit: CP-Sil 5/C 18CB, *Fa. Chrompack*, Middelburg, Niederlande, Filmdicke 0,1 μm , \varnothing 0,32 mm; Länge: 100 m
- Säule 2: SPB 608 *Supelco*, Bellefonte, USA; Filmdicke 0,25 μm , Säule \varnothing 0,25 mm; Länge: 30 m

Injektion: *on column*

Detektor: ^{63}Ni - ECD (*Fa. Carlo Erba*), Basistemperatur 558 K

make-up-Gas: Stickstoff (150 kPa), Trägergas: Helium (150 kPa)

ChromStar (*Bruker-Franzen-Analytik*) Vers.3.26

b) Gaschromatograph: GC 6000 Vega (*Fa. Carlo Erba*)

Säule: 2,3-Me-6-TBDMS-**b**-CD (50:50 in OV1701), Filmdicke 0,1 μm , \varnothing 0,25 mm, Länge 25 m

Trägergas: Helium (60 kPa)

weitere Geräteparameter siehe a)

c) Gaschromatograph: GC 6000 Vega (*Fa. Carlo Erba*)

Säule: 2,3-Me-6-TBDMS-**b**-CD (20 % in SE 52), Filmdicke 0,1 µm, Ø 0,25 mm, Länge 15 m

weitere Geräteparameter siehe a)

10.1.2. Temperaturprogramme GC

- Für PCB-Kongenerentrennung verwendete achirale CB-Säule belegt mit: CP-Sil 5/C 18CB, Temperaturprogramm: 343 K/2 min-20 K/min-473 K-/190 min
- Für MeSO₂-Kongenerentrennung verwendete achirale CB-Säule belegt mit: CP-Sil 5/C 18CB, Temperaturprogramm: 343 K/2min-20 K/min- 433 K-10 K/min- 518 K/100 min
- Für MeSO₂-Kongenerentrennung verwendete achirale SPB 608-Säule, Temperaturprogramm: 343 K/2min- 30 K/min-433 K- 10 K/min- 553 K/60 min
- Für chirale PCB-Muttersubstanzen verwendete chirale 2,3-Me-6-TBDMS-**b**-CD (50:50 in OV1701)-Säule, Temperaturprogramm: 343 K/2 min-40 K/min- 443 K/70 min
- Für MeSO₂-PCB verwendete chirale 2,3-Me-6-TBDMS-**b**-CD (20 % in SE 52) Säule, Temperaturprogramm: 343 K/2 min-20 K/min-433 K/25 min-1,2 K/min- 507 K-1,0 K/min-518 K/30 min

10.2. Experimentelle Daten zu: Disruptive Einflüsse ausgewählter MeSO₂-PCB Enantiomere auf den Glucocorticoid-abhängigen Signalübertragungspfad

10.2.1. Zellkulturen

Die Enantiomere des 3-149 und 4-149 wurden für diese Effektstudie mit den hepatischen Rattenzellen der Reuber-Zelllinie (H4-II-E-C3) ausgewählt. Die Zelllinie wurde vom ECACC (European Collection of Cell Cultures) erhalten und in 75 cm² großen Zellkultur-Kolben in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM), ausgestattet mit 10% Serum Supreme, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA), 50 Einheiten/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin (Bio Whitaker, Göteborgs termometerfabrik, Göteborg, Schweden), gehalten. Die Zellkultur-Kolben wurden in einem humiden Inkubator bei 300 K und 5% CO₂ aufbewahrt. Vor jedem Experiment wurden die Zellen in einer Menge von 0,8 x 10⁶ Zellen/Loch in 6-Loch-Platten gesät und dort für 24 Stunden belassen. Am zweiten Tag wurde den Zellen 1 mL eines frischen Mediums mit 2,5 % Serum Supreme, 1 % NEAA mit Dexamethason (1nM) und das Enantiomer (0,1-10 µM) zugeführt. Alle Testsubstanzen wurden in DMSO gelöst und aus einer 1000fach konzentrierteren Mutterlösung hinzugefügt. Die Kontrollen wurden nur mit DMSO behandelt. Die DMSO-Konzentration überstieg nie die Marke von 0,1 %. Jedes Experiment wurde dreimal bei jeder Konzentration der Testsubstanzen ausgeführt. In allen Experimenten wurden die Zellen den Testsubstanzen 18 Stunden ausgesetzt, bevor sie abgeerntet und der spezifischen TAT-Aktivitäts-Untersuchung zugeführt wurden.

10.2.2. TAT-Assay

Anschließend wurden die Platten mit der Reaktionslösung auf Eis gelegt. Das Medium wurde verworfen und die Zellen dreimal mit einer kalten phosphat-gepufferten Salzlösung (PGS) gespült. Die Zellen wurden mit einem speziellen Zellwischer abgeerntet, in kaltem PGS aufgelöst und bei 100 g (5 min bei 277 K) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in 0,6 mL kaltem PGS gelöst und mit Schallwellen homogenisiert. Ein 0,2 mL Aliquot des Zellhomogenats wurde für das TAT-Assay verwendet. Das Zellhomogenat wurde zu einem Phosphatpuffer (pH 7,3) gegeben, der 6,85 mM Tyrosin und 1,33 mM Pyridoxal-5'-phosphat enthielt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,3 M α-Ketoglutarat gestartet. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 M NaOH. Die spektroskopische Untersuchung erfolgte bei 331 nm, durch Messung des Zellhomogenats gegen einen Blindwert, der aus der NaOH-Lösung vor Zugabe des Zellhomogenats erhalten wurde.^[146,147] Die spezifische TAT-Aktivität wurde in nmol gebildetem *p*-

Hydroxybenzaldehyd /mg Protein/ min ausgedrückt. Der Proteininhalt des Zellhomogenats wurde durch bovines Serumalbumin als Standard gemessen. [148]

10.3. Experimentelle Daten zu: Hepatozyten-Test:

10.3.1. Gewinnung der Hepatozyten

Für die Herstellung der primären Hepatozytenkultur wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 140-200 g verwendet. Die Tiere wurden durch *intra peritoneale* Injektion von 60 mg/kg KGW Nembutal-Na betäubt. Nach Verschwinden der Reflexe (Ausüben von Druck auf eine Hinterpfote) wurde die Ratte auf Fließpapier gelegt, welches sich in einer Kunststoff-Photoschale (30 x36 cm) befand. Bauch und Brust wurden mit 70 %igem Ethanol getränkt und das Fell wurde abgetrennt. Der Bauchraum wurde geöffnet, so daß Darm und Leber frei lagen. Man räumte den Darm zur Seite, bis die Pfortader frei lag und stach eine Flügelkanüle (21 G) ein. Über diese wurde mittels einer Peristaltikpumpe steriler Ca, Mg-freier Hank's Puffer gepumpt (20 mL/min), bis die Leber deutlich erblaßte. Dann klemmte man die *Vena cava* unterhalb der Leber ab und öffnete sie oberhalb der Leber, damit Blut und Perfusat abfließen konnten. Nach ca. 5 Minuten wurde über dasselbe Schlauchsystem eine auf 310 K (37° C) temperierte Lösung von ca. 70 mg Collagenase (*Sigma, München*) in 200 mL Williams Medium E (WME) zugeführt. Man perfundierte mit einer Geschwindigkeit von 20 mL/min für eine Gesamtzeit von 12 min. Danach überführte man die nun sehr weiche Leber in eine sterile Petrischale (75 cm²) und übergieß sie mit der restlichen Perfusionslösung.

Zur Dissoziation der Leberzellen wurde die Kapsel vorsichtig eingeritzt und mit einer Pipette entfernt. Mit Hilfe eines groben sterilen Metallkammes (z.B. Hundekamm aus Edelstahl) wurden die Zellen vorsichtig abgekämmt. Die groben Teile wurden durch Filtrieren der Zellen durch eine sterile Gaze entfernt. Die Zellen wurden in ein steriles 50 mL Plastik-Zentrifugengefäß überführt und bei 50 x g 5 Minuten lang abzentrifugiert. Das überstehende Medium wurde mit einer Pasteurpipette über eine Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Nach Resuspension in frischem WME ohne Collagenase wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und darauf in 40 mL WME resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl sowie der *viability* wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt. Man entnahm dazu 100 µL der frisch aufgewirbelten Zellsuspension und fügte 700 µL WME (ohne FCS) sowie 200 µL einer 5 %igen Trypanblau-Lösung (in 0,9 % NaCl) zu. Mit Hilfe einer Pasteurpipette entnahm man nun ein wenig Zellsuspension und beschickte damit eine Neubauer-Hämatozytenkammer. Ausgezählt wurden vier Quadrate, wobei die Gesamtzahl und die Anzahl der blau angefärbten

(toten) Zellen bestimmt wurden. Die Anzahl der lebensfähigen Hepatozyten berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{lebende Zellen} / \text{mL} = \frac{\text{Gesamtzahl} - \text{tote Zellen}}{4} \times 10^4$$

Die *viability* (Überlebensrate) der Zellen ergab sich aus:

$$\text{Viability (\%)} = \frac{\text{Gesamtzellenzahl} - \text{tote Zellen}}{\text{Gesamtzellenzahl}}$$

Ist die *viability* < 70 %, dann wurden die Zellen nicht für einen Test verwendet.

10.3.2. Aussaat der Zellen

Je 10^7 lebende Hepatozyten ($5 \cdot 10^5/\text{mL}$) wurden in Mehrfachpetrischalen aus Plastik (Durchmesser 3 cm, eine Einheit = 6 Schälchen) mit 2 mL WME + 10 % fötales Kälberserum (FCS) ausgesät. In die Testschalen gab man vorher sterile, runde Plastikscheibchen (Thermanox coverslips, 2,5 cm). Für jede Testkonzentration wurden zwei Schälchen benötigt. Eine wurde mit den PCB-Verbindungen und den Hepatozyten, eine zweite wurde als Vergleich nur mit dem Medium und PCB-Verbindungen versetzt. Zusätzlich benötigte man je ein Schälchen für die Negativkontrolle (Lösungsmittelkontrolle) sowie eine Positivkontrolle (2-Acetylaminofluoren und UV 245 nm). Die Zellen wurden zwei Stunden lang bei 310 K (37°C) und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit hefteten sich die lebenden Zellen an die Plastikscheibchen an. Dieses wurde nach Ablauf der zwei Stunden am Stereomikroskop stichprobenartig überprüft (1-2 Schälchen). Die Zellen sollten sich bei leichter Bewegung der Schale nicht relativ zum Untergrund bewegen.

10.3.3. Exposition der Zellen

Nach zweistündiger Inkubation wurde das Medium zusammen mit den nicht angewachsenen Zellen abgesaugt und durch 2 mL frisches WME + 10 % FCS ersetzt. Die zu testenden PCB bzw. PCB-Metaboliten löste man in DMSO und setzte 1 mL in einer Konzentration von 2×10^{-3} mol/L den Zellkulturen bzw. den Vergleichsschälchen (nur mit Medium (der Nährlösung) gefüllt) zu. Die Lösungsmittelkonzentration sollte dabei nicht mehr als 0,5 % betragen. Die Lösungen wurden nach der zwölfstündigen Inkubationsphase mit einem Zellwischer in ein Polypropylengefäß überführt.

10.3.4. Aufarbeitung und Auswertung des Hepatozyten-Tests

Die 10 mL Lösung im Polypropylengefäß wurde sofort bei 263 K (-10°C) bis zur Aufarbeitung eingefroren. Zur Aufarbeitung wurde solange Na₂SO₄ in die Polypropylengefäße gegeben, bis eine relativ feste rosafarbene Masse entstand. Diese Masse wurde in Soxhlethülsen überführt und in einer achtstündigen Soxhlet-Extraktion mit 150 mL *n*-Hexan/ Aceton im Verhältnis 2:1 extrahiert. Der Kolbeninhalt wurde auf 20 mL eingengt und in einen 25 mL Spitzkolben überführt. Dann wurde ein Lösungsmittelwechsel auf *n*-Hexan vorgenommen, in dem der Inhalt dreifach auf <1 mL eingengt und wieder in *n*-Hexan aufgenommen wurde. Anschließend wurde der auf < 1 mL reduzierte Inhalt in ein vorher ausgewogenes 2 mL-Gläschen überführt und durch erneute Auswaage das Gewicht und Anhand der Dichte von *n*-Hexan auch das Volumen bestimmt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem GC unter den 10.1 beschriebenen Bedingungen sowie zur Überprüfung mit dem GC-MS im EI Modus (s.10.6.3).

10.4. Experimentelle Daten zu: Biotaprobe

10.4.1. Reinigung der Glasgeräte

Es wurden ausschließlich für analytische Zwecke bestimmte Glasgeräte benutzt. Die Reinigung erfolgte durch mehrmaliges Spülen mit Wasser. Anschließend wurden die Glasgeräte im Trockenschrank bei 373 K getrocknet. Des Weiteren wurden die Glasgeräte mit Aceton p.a. und *n*-Hexan „Suprasolv“ jeweils dreimal gespült. Abweichend hiervon wurde die Soxhlet-Apparatur mit Aceton „Suprasolv“ statt mit Aceton p.a. gespült. Die Soxhlet-Einsätze wurden vor dem Spülen mit Lösungsmittel für zwei Stunden bei 773 K ausgeheizt, um schwer zu entfernende organische Matrix abzutrennen.

10.5. Verwendete Chemikalien

10.5.1. Lösungsmittel

Tabelle 21: Verwendete Chemikalien

Lösungsmittel	Hersteller	Gefahrensymbol	R- und S- Sätze
Aceton Suprasolv	Merck, Darmstadt	F	R: 11 S:9,16,23,33
Aceton p.a.	Merck, Darmstadt	F	R: 11 S:9,16,23,33
Essigsäureethylester z. R.	Merck, Darmstadt	F	R: 11 S:16-23.2- 24/25-36/37
Dichlormethan	Merck, Darmstadt	Xn	R: 40 S:23.3-24/25- 36/37
<i>n</i> -Hexan Suprasolv	Merck, Darmstadt	Xn, F	R: 11,16 S:16,23,29,33

10.5.2. Feststoffe

Natriumsulfat (wasserfrei, gepulvert, *Merck*, Darmstadt) wurde vor Gebrauch sechs Stunden bei 823 K im Ofen ausgeglüht.

Silicagel (Flashgel; Größe 30-60 µm; durchschnittliche Korngröße 40 µm; *J.T. Baker*, Deventer, Holland) wurde bei 393 K über Nacht im Ofen belassen. Eine Stunde vor Gebrauch wurde das Silicagel zum Abkühlen aus dem Ofen geholt.

10.5.3. Standard

Der Standard der *Fa. Dr. Ehrenstorfer* enthielt die PCB-Kongenere in Konzentrationen von jeweils 10 mg/L. Durch Verdünnen im Verhältnis 1:100 wurde die hauptsächlich verwendete Standardkonzentration von 100 ng/mL erreicht.

10.5.4. Entsorgung der Chemikalien

Die zum Spülen verwendeten Lösungsmittel Aceton und *n*-Hexan wurden getrennt gesammelt und präparativ arbeitenden Arbeitskreisen zur Verfügung gestellt. Andere und verunreinigte Lösungsmittel sowie Lösungsmittelgemische wurden der Entsorgung zugeführt.

10.6. Details zur Probenaufarbeitung

Für die großen Soxhlets wurden 150 mL Lösungsmittel benötigt. Nach achtstündiger Soxhlet-Extraktion wurde der Extrakt aus den 250 mL-Kolben mit dem Extrakt aus dem Soxhletaufsatz vereinigt. Der Extrakt wurde geteilt, um mit der einen Hälfte die EOM-Bestimmung, wie bereits beschrieben, vorzunehmen. Die andere Hälfte wurde am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 323 K und einem Druck von anfänglich 60 kPa und letztlich 36 kPa eingeeengt. Der in einem 25 mL-Kolben eingeeengte Extrakt wurde zweimal mit jeweils etwa 15 mL *n*-Hexan aufgefüllt und zwecks Lösungsmittelwechsel abermals eingeeengt.

Der auf 1 mL eingeeengte Extrakt wurde in ein 8 mL-Gläschen überführt, weil die auf den Vorfilter aufgesteckte Nadel nicht in den 25 mL-Spitzkolben hineinreichte, und dann über den Vorfilter aufgezogen. 3 mL des Lösungsmittelgemisches der Gelpermeationschromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1) wurden zum zweimaligen Nachspülen des 8 mL-Gläschens verwendet und ebenfalls über den Vorfilter aufgezogen. Der Vorfilter wurde nach dem Aufziehen der Probe verworfen. Eine zweite Injektionsnadel wurde auf die 5 mL-Spritze aufgesteckt. In die GPC wurde ein Volumen von 4 mL injiziert. Anschließendes Einengen am Rotationsverdampfer erfolgte bei 318 K und einem Druck von 31 kPa. Zwei weitere Male wurden je 15 mL *n*-Hexan zugegeben und bei 36 kPa eingeeengt, um einen Lösungsmittelwechsel durchzuführen. Lösungsmittelwechsel sind erforderlich, um bei nachfolgenden Aufarbeitungsschritten keine Polaritätsverschiebungen zu erhalten.

Die Mini-Silica-Säule wurde vor dem Auffangen der ersten *n*-Hexan-Fraktion mit 8 mL *n*-Hexan gespült, welches verworfen wurde. Auf die Mini-Silica-Säule wurde ein Probenvolumen von 0,5 mL aufgetragen. Zu beachten ist, daß kein Lösungsmittel von außen an die Mini-Silica-Säule gelangt, über die Halterung der Mini-Silica-Säule läuft und von dort in das 8 mL-Gläschen tropft. Sehr leicht ist dieses der Fall, wenn die Pipetten Lösungsmittel verlieren. Die Kontaminationsgefahr durch solche Vorgänge ist sehr hoch.

Durch erneutes Einengen der Lösung und zweimaliger Zugabe von je 15 mL *n*-Hexan wurde die Lösung jeweils bei 36 kPa auf ein Endvolumen von unter 0,5 mL eingengt.

Unter einem leichten Stickstoffstrom wurden die Extrakte weiter aufkonzentriert, um das nötige Signal-Rausch-Verhältnis für die GC/MS-EI-Messungen erreichen zu können.

10.6.1. HP-GPC

Pumpe: HPLC (*Merck* L 6200)

Detektor: UV (*Merck* L 4006)

Glassäule: Innendurchmesser 20 mm; Länge 48 cm; (Firma *Latex*: M2-48)

Füllung: 90 cm³ (Füllhöhe 30 cm), *Biobead* SX 3 (*BioRad*, *Deutschland*)

flow: 2,7 mL/min

10.6.2. GC HP 5890 Serie II

Lösungsmittel: Isooctan

Injektion: *fast splitless* (120 s) Injektion, zwei automatische Injektoren

Injektortemperatur: 313 K

Detektor: zwei ⁶³Ni Elektroneneinfangdetektoren (ECD)

Detektortemperatur: 573 K

Temperaturprogramm: 353 K/2 min, 20 K/min to 493 K, 0.7 K/min to 553 K

Kapillarsäulen: DB 5 MS (*J+W Scientific, Folsom, CA, USA*), Ø 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke, Länge 60 m, stationäre Phase: 5% Phenylmethylpolysiloxan

DB 17 (*J+W Scientific, Folsom, CA, USA*), Ø 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke, Länge 60 m, stationäre Phase: 50% Phenylmethylpolysiloxan

Carrier gas, flow: Helium, 1,2 mL/min, *constant flow*

Make-up gas, flow: Stickstoff, 60 mL/min für beide ECD

10.6.3. GC/MS-EI: Varian 3400

split/splitless in splitless mode

Trägergas: Helium (70 kPa)

Kapillarsäule: DB 5-MS-ITD (*J+W Scientific, Folsom, CA, USA*), Filmdicke 0,25 µm, Ø 0,25 mm, Länge 30 m, stationäre Phase: 5 % Phenylmethylpolysiloxan

Temperaturprogramm: 333 K/2 min-5 K/min-533 K-13 min

transfer line: 523 K

MS: Magnum ITD, *Finnegan MAT*

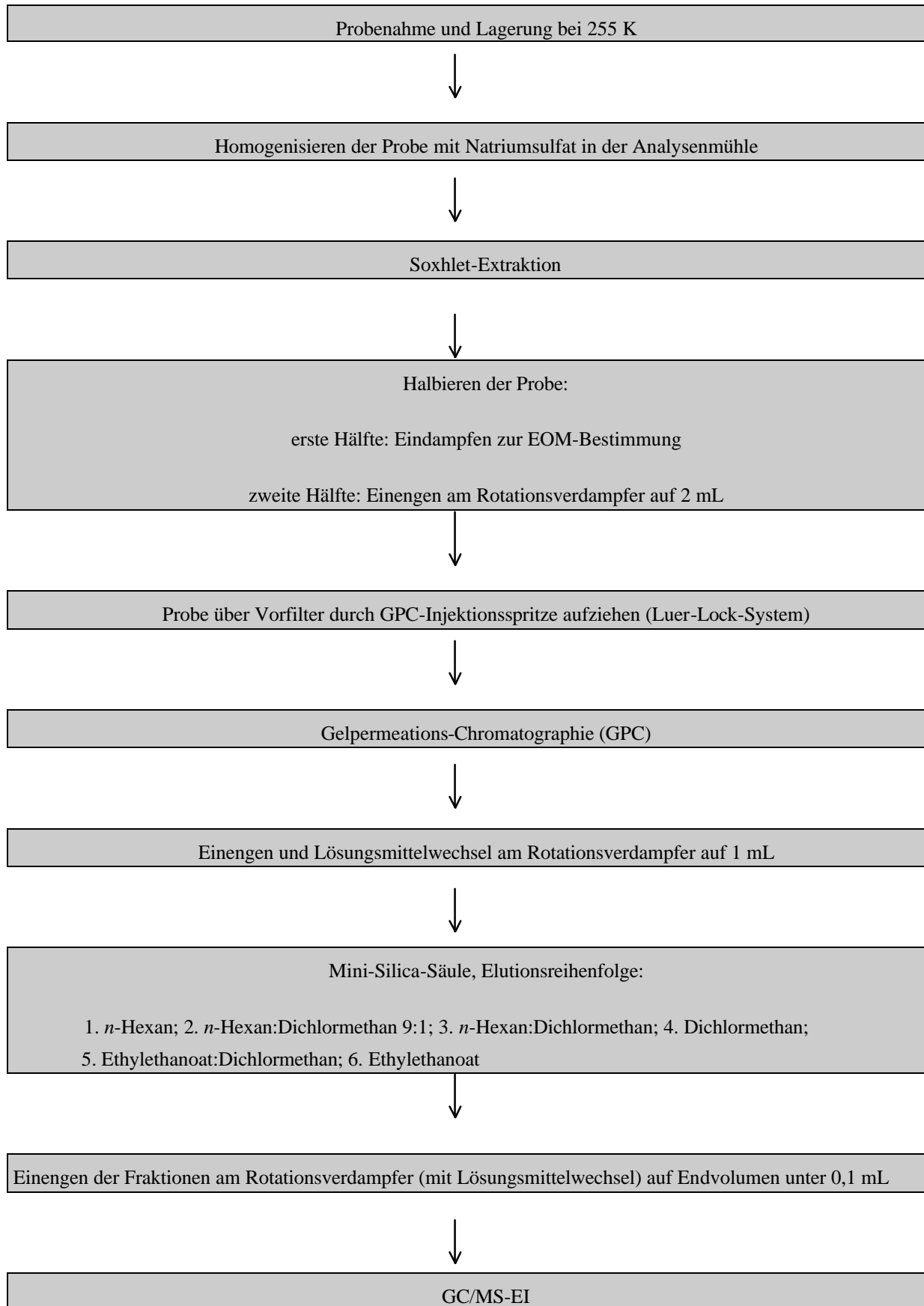
EI 70 eV, Scan 100-500 amu, *scan rate:* 0,6 s, Emissionsstrom 10 µA, *manifold-*

Temperatur 453 K, A/M Amplitude: 2,7 V, AGC: 40 000

Software: Magnum

10.6.4. Schema des Analyseverfahrens

Aus Gründen der Übersichtlichkeit soll das Analyseverfahren in folgenden noch einmal schematisch dargestellt werden:



11. Literaturverzeichnis

- [1] E.W. Messerschmid: „Das gefährliche Loch“ Gastbeitrag in Baedeker-Reiseführer: Australien, 3. Aufl., **1997**, 18
- [2] H. Schmidt, G. Schulz: Ueber Benzidin (α -Diamidodiphenyl), *Liebigs Ann. Chem.*, **1881**, 207, 320
- [3] Vit Lang : Review: Polychlorinated biphenyls in the environment, *J. Chromatogr.*, **1992**, 595
- [4] B. Kohmanns: Fachinformation „Umwelt und Gesundheit“ polychlorierte Biphenyle, **1995** <http://www.umweltministerium.bayern.de/service/umwberat/ubbpcb.htm>
- [5] H. Fiedler: Polychlorinated Biphenyls (PCB): Uses and Environmental releases, **1998**, http://www.chem.unep.ch/pops/POPs_Inc/proceedings/abu-dhabi/FIEDLER1.htm
- [6] K. Ballschmiter, M. Zell: Analysis of Polychlorinated Biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1980**, 302, 20-31
- [7] K. Ballschmiter, A. Mennel, J. Buyten: Long chain alkyl-polysiloxanes as non-polar stationary phases in capillary gas chromatography, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1993**, 346, 396-402
- [8] K.C. Jones, V. Burnett, R. Duarte-Davidson, K.S. Waterhouse: PCBs in the environment, *Chemistry in Britain*, **May 1991**, 435
- [9] W. Gerhartz, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5.Aufl., Vol A6, Verlag Chemie, Weinheim, **1986**
- [10] H. Marquardt, S.G. Schäfer: Lehrbuch der Toxikologie, *BI Wissenschaftsverlag*, **1994**, 417-434
- [11] P.H. Chen, S.-T. Hsu: PCB poisoning from toxic rice-bran oil in Taiwan in *PCBs and the Environment*, Vol. 3 (Hrsg.: J.S. Waid), *CRC Press*, **1986**, 27-38
- [12] Y.L. Guo: Human health effects from PCBs and dioxin-like chemicals in the rice oil poisonings as compared with other exposure episodes, *Organohal. Compounds*, **1999**, 42, 241-243

- [13] S. Jensen: Report of a new chemical hazard, *New Sci.*, **1966**, 32,312
- [14] S. Tanabe, R. Tatsukawa: Distribution, behavior, and load of PCBs in the oceans in *PCBs and the Environment, Vol. 1* (Hrsg.: J.S. Waid), *CRC Press*, **1986**, 143-161
- [15] V. Ivanov and E. Sandell: Characterization of polychlorinated biphenyl isomers in sovol and trichlordiphenyl formulations by high resolution gas chromatography with electron capture detection and high-resolution gas chromatography - Mass spectrometry techniques, *Environ. Sci. Technol.*, **1992**, 26, 2012-2017
- [16] J. Rantanen: Industrial and environmental emergencies; lessons learned, *Organohal. Compounds*, **1992**, 10, 291-294
- [17] S. Tanabe: PCB Problems in the future - Foresight from current knowledge, *Environ. Poll.*, **1988**, 50, 5
- [18] T. Kräge, S. Otte: Die Hormonfalle-Unfruchtbarkeit durch Chemiekalien, *Greenpeace-Magazin*, **1997**, 1
- [19] R.A. Rapaport, S.J. Eisenreich: Chromatographic determination of octanol-water-partition coefficients (K_{ow} 's) for 58 polychlorinated biphenyl congeners, *Environ. Sci. Technol.*, **1984**, 18(3), 163-170
- [20] P.W. Atkins, *Physikalische Chemie*, 2.Aufl., VCH Weinheim, **1996**, 203-207
- [21] K. Ballschmiter, J. Schreitmüller: Global Occurrence of non-dioxin organochlorines in the marine atmosphere: PCBs, *Organohal. Compounds*, **1995**, 24, 405-408
- [22] E. Atlas, T. Bidleman, C.S. Giam: Atmospheric transport of PCBs to the oceans *PCBs and the Environment, Vol. 1* (Hrsg.:J.S.Waid), *CRC Press*, **1986**, 79-100
- [23] B. Ottar: The transfer of airborne pollutants to the Arctic region., *Atmos. Environ.*, **1981**, 15, 1439-1445
- [24] D. Mackay, F. Wania: Transport of contaminants to the Arctic: partitioning, processes and models, *Sci. Total Environ.*, **1995**, 160/161, 25-38
- [25] M.K. Hamdy and J.A. Gooch: Uptake, retention, biodegradation, and depuration of PCBs by organisms in oceans in *PCBs and the Environment, Vol. 2* (Hrsg.:J.S.Waid), *CRC Press*, **1986**, 63-88

- [26] K. Furukawa: Modification of PCBs by bacteria and other microorganisms, in *PCBs and the Environment, Vol. 2* (Hrsg.:J.S.Waid), *CRC Press*, **1986**, 89-100
- [27] S.F.J. Chou und R.A. Griffin: Solubility and soil mobility of polychlorinated biphenyls, in *PCBs and the Environment, Vol. 2* (Hrsg.:J.S.Waid), *CRC Press*, **1986**, 101-120
- [28] R.J. Letcher: The ecological and analytical chemistry of chlorinated hydrocarbon contaminants and methylsulfonyl-containing metabolites in the polar bear (*Ursus maritimus*) food chain, Dissertation, *Charleton University (Ottawa, Ontario)*, **1996**
- [29] Römpp, *Umweltlexikon*: Stichwort: „PCB“, *Thieme Verlag*, **1993**, 536-538
- [30] NRW: Jahresbericht , Chemische Landesuntersuchungsanstalt Münster, **1996**
- [31] W. Mücke: Polychlorierte Biphenyle- Toxikologische Aspekte eines Umweltchemikals, *Handbuch des Umweltschutzes*, **1986**, 26. Erg. Lfg., 12
- [32] J. She, P. Visita, M. McKinney, F. Sy, K. Hooper, M. Petreas: Congener-specific analysis of PCBs in human milk, *Organohal. Compounds*, **1995**, 26, 397-400
- [33] E. Dewailly, J.C. Hansen, H.S. Pedersen, G. Mulvad, P. Ayotte, J.P. Weber, G. Lebel: Concentration of PCBs in various tissues from autopsies in Greenland, *Organohal. Compounds*, **1995**, 26, 175-180
- [34] L. Turrio-Baldassarri, V. Abate, A. di Domenico, N. Iacovella, C. La Rocca, E. Menichini: PCBB, PCDF, PCB and PAH in outdoor air in Rome: Comparison with a remote area and indoor levels, *Organohal. Compounds*, **2001**, 51, 18-25
- [35] M. Frignani, L.G. Bellucci, C. Carraro, A. Russo: Distribution of polychlorinated biphenyls in dated sediment cores from the venice lagoon and the industrial area of Porto Marghera, *Organohal. Compounds*, **2001**, 51, 65-68
- [36] S.-C. Lung, C.-F. Chen, S.-C. Hu, Y.-P. Bau: Levels of 18 polychlorinated biphenyl congeners in five fish species in Taiwan, *Organohal. Compounds*, **2001**, 51, 235-238
- [37] B. Hennig, R. Slim, M. Toborek, A. Daugherty, L. Robertson: PCB-mediated endothelial cell dysfunction: Implications in atherosclerosis, *Organohal. Compounds*, **1999**, 42, 505-508

- [38] S. Silbernagel, A. Despopoulos: Taschenatlas der Physiologie, 4.Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart, **1991**, 218-229
- [39] C.-Y. Juan, G.O. Thomas, K.T. Semple, K.C. Jones: A PCB input-output balance on a human, *Organohal. Compounds*, **1999**, *44*, 153-156
- [40] W. Gamble: PCBs and the environment: Perturbations of biochemical systems, in *PCBs and the Environment, Vol. 2* (Hrsg.: J.S. Waid), *CRC Press*, **1986**, 49-61
- [41] J.T. Borlakoglu, R.R. Dils: PCBs in human tissues, *Chemistry in Britain*, **September 1991**, 815-818
- [42] J. Racky, H.-J. Schmitz, H.-M. Kauffmann, D. Schrenk: Isolation of the human Ah-receptor promoter and identification of genetic variations, *Organohal. Compounds*, **2000**, *49*, 25-28
- [43] K. Yamamoto, M. Shirota, K. Inoue, A. Doyama, M. Mukai, A. Haishama, C. Katoh, S. Soda, A. Kawabata, K. Shirakura, Y. Sakurada, F. Akahori, K. Shirota: *In utero* exposure to 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 126) induces hyphospadias in female rats, *Organohal. Compounds*, **2001**, *53*, 303-305
- [44] H.P. Wolff, J.R. Weihrauch: Internistische Therapie, **1980**, VCH Weinheim Verlagsgesellschaft mbH, *3.Aufl.*, *22*, 89
- [45] I.N. Pessah, P.W. Wong: Etiology of PCB neurotoxicity: From molecular to cellular dysfunction, *Organohal. Compounds*, **2000**, *49*, 17-20
- [46] J.R. Inglefield, W.R. Mundy, T.J. Shafer: Temporal disturbances of intracellular Ca²⁺ homeostasis induced by Aroclor 1254, *Organohal. Compounds*, **2000**, *49*, 9-12
- [47] G.C.M. Grinwis, E.J. van den Brandhof, M.Y. Engelsma, R.V. Kuiper, P.W. Wester, M.A. Vaal, A.D. Vethaak, J.G. Vos: Effects on thymus size and CYP1A immunoreactivity in hematopoietic cells in European flounder (*platichthys flesus*) after oral exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl, *Organohal. Compounds*, **2000**, *49*, 65-66
- [48] I. Chu, J. Nakai, A. Yagminas, R. Poon, T. Valli, H. Håkansson, Å. Bergman: Toxicity of 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (PCB 156) in rats, *Organohal. Compounds*, **2000**, *49*, 185-187

- [49] J.F.Jr. Brown, R.W. Lawton, C.B. Morgan: PCB metabolism, persistence, and health effects after occupational exposure: Implications for risk assessment, *Chemosphere*, **1994**, 29, 2287-2294
- [50] S. Safe: Polychlorinated biphenyls (PCBs), Dibenzo-*para*-Dioxins (PCDDs), Dibenzofurans (PCDFs) and related compounds- Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs), *Crit. Rev. Toxicol.*, **1990**, 21, 51
- [51] D. Desaulniers, K. Leingartner, G. Cooke, M. Wade, A. Yagminas: Effects of exposure to a human milk PCB-DDT-DDE mixture from day 1 to 20 or to TCDD on day 18 of age, in prepubertal females, and on the development of methylnitrosourea-induced mammary tumors in the adult rat, *Organohal. Compounds*, **1999**, 42, 221-225
- [52] Stoffbericht Polychlorierte Biphenyle (PCB), Texte und Berichte zur Altlastenbearbeitung, *Landesamt für Umweltschutz Baden-Württemberg*, **1995**, 16
- [53] U. Ahlborg, G.C. Becking, L.S. Birnbaum, A. Brouwer, H.G.J.M. Derks, M. Feeley, G. Golor, A. Hanberg, J.C. Larsen, A.K.D. Liem, S.H. Safe, C. Schlatter, F. Waern, M. Younes, E. Yrjänheikki: Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs, *Chemosphere*, **1994**, 28, 1049
- [54] N. Johansson, M. Haag-Grönlund, R. Fransson-Steen, H. Håkansson, G. Scheu, L. Wärngård: Interactive effects of different polychlorinated biphenyls in rat, *Organohal. Compounds*, **1999**, 42, 229-233
- [55] J. Suh, J.S. Kang, K.-H. Yang, N.E. Kaminski: Antagonism by di-*ortho* polychlorinated biphenyls of aryl carbon recepto-dependent modulation of CYP1A1 and LPS-induced IgM gene expression in CH12.LX B cells, *Organohal. Compounds*, **2001**, 53, 342-345
- [56] M. van den Berg, B. Bosveld, U. Ahlborg: The use of TEFs for environmental risk assessment, *Organohal. Compounds*, **1995**, 26, 277-282
- [57] H. Hühnerfuss, B. Pfaffenberger, B. Gericke, L. Karbe, W.A. König, O. Landgraff: Gas chromatographic enantiomer separation and potential toxicity of atropisomeric polychlorinated biphenyls in marine biota: Has the toxic equivalence factor [TEF] concept to be expanded?

- [58] S. Jensen, B. Jansson: Antropogenic substances in seal from the Baltic: Methyl sulfone metabolites of PCB and DDE, *Ambio*, **1976**, 5, 257-260
- [59] T. Mio, K. Sumino, T. Mizutani: Sulfur containing metabolites of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl, a major component of commercial PCBs, *Chem. Pharm. Bull.*, **1976**, 24, 1958-1960
- [60] K. Haraguchi, M. Athanasiadou, Å. Bergmann, L. Hovander, S. Jensen: PCB and PCB methylsulphones in selected groups of seals from the Swedish coastwaters, *Ambio*, **1992**, 21, 552-555
- [61] K. Haraguchi, H. Kuroki, Y. Masuda: Capillary gas chromatography analysis of methyl sulphone metabolites of polychlorinated biphenyls retained in human tissues, *J. Chromatogr.*, **1986**, 361, 239-252
- [62] R.J. Letcher, R.J. Norstrom, D.C.G. Muir: Biotransformation versus bioaccumulation: Sources of methyl sulfone PCB and 4,4'-DDE metabolites in the polar bear food chain, *Environ. Sci. Technol.*, **1998**, 32, 1656-1661
- [63] Y. Kato, K. Haraguchi, M. Kawashima, S. Yamada, M. Isogai, Y. Masuda, R. Kimura: Characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with methylsulphonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners, *Chem.-Biol. Interact.*, **1995**, 95, 269-278
- [64] E. Klasson-Wehler, Å. Bergman, M. Athanasiadou, J.P. Ludwig, H.J. Auman, K. Kannan, M. van den Berg, A.J. Murk, L.A. Feyk, J.P. Giesy: Hydroxylated and methylsulfonyl polychlorinated biphenyl metabolites in albatrosses from Midway atoll, North Pacific Ocean, *Environ. Tox. Chem.*, **1998**, 17(8), 1620-1625
- [65] P. De Voogt, P. van Raat, M. Rozemeijer: Methyl sulfonyl PCBs in cormorant chicks from the Netherlands, *Organohal. Compounds*, **1992**, 8, 517-521
- [66] R.J. Letcher, R.J. Norstrom, Å. Bergman: Geographical distribution and identification of methyl sulphone PCB and DDE metabolites in pooled polar bear (*Ursus maritimus*) adipose tissue from western hemisphere Arctic and Subarctic regions, *Sci. Tot. Environm.*, **1995**, 160/161, 409-420

- [67] Å. Bergman, R.J. Norstrom, K. Haraguchi, H. Kuroki, P. Béland: PCB and DDE methyl sulfones in mammals from Canada and Sweden, *Environm. Toxicol. Chem.*, **1994**, *13*, 121-128
- [68] R.J. Letcher, R.J. Norstrom, D.C.G. Muir, C.D. Sandau, K. Koczanski, R. Michaud, S. De Guise, P. Béland: Methylsulfone polychlorinated biphenyl and 2,2-bis(chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene metabolites in Beluga whale (*delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence river estuary and Western Hudson Bay, Canada, *Environ. Toxicol. Chem.*, **2000**, *19*, 1378-1388
- [69] G.M. Troisi, K. Haraguchi, M.P. Simmonds, C.F. Mason: Methyl sulphone metabolites of polychlorinated biphenyls (PCBs) in cetaceans from the Irish and the Aegean Sea, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1998**, *35*, 121-128
- [70] C. Westrand, K. Norén: Methylsulfonyl metabolites of PCBs and DDE in human tissues, *Environm. Health. Perspec.*, **1997**, *105*, 644-649
- [71] R.J. Hansler, J. Moisey, E. Montie, R.J. Norstrom, J.P. Boon, M. van den Berg, W. Seinen, R.J. Letcher: PCBs, DDTs, and methylsulfone PCB and 4,4'-DDE metabolites in cetaceans from the Atlantic ocean, *Organohal. Compounds*, **1999**, *42*, 197-200
- [72] J.P. Boon, F. Eijgenraam: The possible role of metabolism in determining patterns of PCB congeners in species from the Dutch Wadden Sea, *Marine Environ. Res.*, **1988**, *24*, 3-8
- [73] I. Brandt, Å. Bergman, C.A. Wachtmeister: Distribution of polychlorinated biphenyls: Structural requirements for accumulation in the mouse bronchial mucosa, *Experientia* **1976**, *32*, 497-498
- [74] Å. Bergman, I. Brandt, B. Jansson: Accumulation of methylsulfonyl derivatives of some bronchial-seeking polychlorinated biphenyls in the respiratory tract of mice, *Tox. Applied Pharmacol.* **1979**, *48*, 213-220
- [75] Å. Bergman, M. Athanasiadou, S. Bergek, K. Haraguchi, S. Jensen, E. Klasson-Wehler: PCB and methyl sulfones in mink treated with PCB and various PCB fractions, *Ambio*, **1992**, *21/8*, 570-576

- [76] Y. Kato, Y. Ito, T. Yamazaki, Y. Shinmura, R. Kimura: Reduction of serum thyroxine level by methylsulfonyl metabolites of chlorinated benzenes in male sprague-dawley rats, *Organohal. Compounds*, **2001**, 53, 50-53
- [77] Å. Bergman, E. Klasson-Wehler, H. Kuroki: Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood, *Environm. Health Perspect.*, **1994**, 102/5, 464-469
- [78] K. Janák, G. Becker, A. Colmsjö, C. Östman, M. Athanasiadou, K. Valters, Å. Bergman: Methyl sulfonyl polychlorinated biphenyls and 2,2-bis(4-chlorophenyl)-1,1-dichlorethene in gray seal tissues determined by gas chromatography with electron capture detection and atomic emission detection, *Environ. Toxicol. Chem.*, **1998**, 17, 1046-1055
- [79] N. Prud'homme, C. Brochu, S. Moore, M. Lebeuf, M. Hammill: Concentrations of methyl sulphone metabolites of PCBs and DDE in seals from the gulf of St. Lawrence, *Organohal. Compounds*, **1999**, 43, 73-76
- [80] K. Haraguchi, Å. Bergman, Y. Masuda: Comparative study on tissue retention of PCB methyl sulfone metabolites in different mammalian species, *Organohal. Compounds*, **1994**, 20, 501-504
- [81] J. Bakke, Å. Bergman, G. Larsen: Methylsulfone formation and PCB metabolism, *Organohal. Compounds*, **1995**, 25, 413-417
- [82] Lexikon der Medizin, *Buch und Zeit Verlag* (Hrsg.:Theodor von Keudell)
- [83] J. Reichen: Skript: Pathophysiologie der Leber, *Institut f. Klinische Pharmakologie, Universität Bern, Schweiz*, **2000**, Kap.6
- [84] F.R. Althaus, H. Naegeli: Skript: Toxikologie II-Mechanismen der Toxizität, *Institut f. Veterinärpharmakologie und –toxikologie, Zürich, Schweiz*, **2001**
- [85] B. Brunström, Å. Bergman, B.-M. Bäcklin, B.-O. Lund, J. Örberg: Effects of long-term exposure to PCB and PCB methylsulfones on reproduction in mink, *Organohal. Compounds*, **1994**, 20, 471-473
- [86] V.J. Kramer, W.G. Helferich, Å. Bergman, E. Klasson-Wehler, J.P. Giesy: Hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites are anti-estrogenic in a stably transfected human breast adenocarcinoma (MCF7) cell line, *Toxikol. Applied Pharmacol.*, **1997**, 144, 363-376

- [87] Y. Kato, K. Haraguchi, M. Kawashima, S. Yamada, Y. Masuda, R. Kimura: Induction of hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes by methylsulphonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats, *Chem.-Biol. Interact.*, **1995**, 95, 269-278
- [88] Y. Kato, K. Haraguchi, S. Yumoto, Y. Nagano, T. Yamazaki, Y. Masuda, R. Kimura: 3-methylsulfonyl-2,2',4',5-tetrabromobiphenyl, a metabolite of 2,2',4',5-tetrabromo-biphenyl induces CYP 2B1 in rats, *Organohal. Compounds*, **2000**, 49, 209-212
- [89] G.L. Larsen, Å. Bergman: Interaction of methylsulfonyl-containing PCB with mammalian carrier proteins, *Organohal. Compounds*, **1994**, 20, 451-454
- [90] J. Lund, L. Nordlund, J.-Å. Gustafsson: Partial purification of a binding protein for polychlorinated biphenyls from rat lung cytosol: Physicochemical and immunochemical characterization, *Biochemistry*, **1988**, 27, 7895-7901
- [91] Y. Kato, K. Haraguchi, T. Shibahara, S. Yumoto, Y. Masuda, R. Kimura: Reduction of serum thyroxine concentrations by methylsulfonyl metabolites of tetra-, penta-, and hexachlorinated biphenyls in male sprague-dawley rats, *Chemosphere*, **2000**, 40, 1233-1240
- [92] P.W. Atkins: *Physikalische Chemie*, 2.Aufl., VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, **1996**, 485
- [93] M.F. Landoni, A.L. Soraci, P. Delatour, P. Lees: Enantioselective behaviour of drugs used in domestic animals: a review, *J.vet.Pharmacol.Therap.*, **1997**, 20, 1-16
- [94] H.J. Roth, C.E. Müller, G. Folkers: Stereochemie & Arzneistoffe, *Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*, **1998**, ISBN 3-8047-1485-4
- [95] K. Mislow in *Topics in stereochemistry*, Vol.22, (Hrsg.: S.E.Denmark), John Wiley & Sons. Inc, **1999**
- [96] T. Nezel, F. Müller-Plathe: Theoretical considerations about chiral PCBs and their methylthio and methylsulfonyl metabolites being possibly present as stable enantiomers, *Chemosphere*, **1997**, 35, 1895-1906
- [97] M. Püttmann, F. Oesch, L.W. Robertson: Characteristics of polychlorinated biphenyl (PCB) atropisomers, *Chemosphere*, **1986**, 15, 2061-2064

- [98] D.W. Armstrong: The evolution of chiral stationary phases for liquid chromatography, *LC&GC international-Current issues in HPLC technology*, April **1998**
- [99] A. Villiers: Gärung der Stärke durch das Buttersäureferment, *Chem. Centrbl.*, **1891**, 830-831
- [100] W. Saenger: Cyclodextrin-Einschlußverbindungen in Forschung und Industrie, *Angew. Chem.*, **1980**, 92, 343-361
- [101] T. Koscielski, D. Sybilska, J. Jurzak: Separation of *a*- and *b*-pinene into enantiomers in gas-liquid chromatography systems via *a*-cyclodextrin inclusion complexes, *J.Chromatogr.*, **1983**, 280, 131-134
- [102] W. Boland, W.A. König, R. Krebber, D.G. Müller: Separation of enantiomeric algal pheromones and related hydrocarbons by gas-liquid chromatography on modified cyclodextrins as chiral stationary phases. Biosynthetic relevance of racemic by-products, *Helv. Chim. Acta*, **1992**, 72, 1288-1292
- [103] W.A. König, in I.W. Wainer (Hrsg.): The direct resolution of enantiomeric drugs by chiral-phase gas chromatography, *Drug stereochemistry*, M.Dekker, New York, **1993**, 107-137
- [104] W.A. König, D. Icheln, T. Runge, B. Pfaffenberger, P. Ludwig, H. Hühnerfuss: Gas chromatographic enantiomer separation of agrochemicals using modified cyclodextrins, *J.High Resolut.Chromatogr.*, **1991**, 14, 530-535
- [105] T. Ellerichmann, Å. Bergman, S. Franke, H. Hühnerfuss, E. Jakobsson, W.A. König, C. Larsson: Gas chromatographic enantiomer separations of chiral PCB methyl sulfones and identification of selectively retained enantiomers in human liver, *Fresenius. Envir. Bull.*, **1998**, 244-257
- [106] H. Hühnerfuss: Chromatographic enantiomer separation of chiral xenobiotics and their metabolites - A versatile tool for process studies in marine and terrestrial ecosystems, *Chemosphere*, **2000**, 40, 913-919
- [107] A. Jaus, M. Oehme: Enantioselective behaviour of ethylated γ -cyclodextrins as GC stationary phases for chlorinated pesticides and phase characterisation by HPLC, *Chromatographia*, **1999**, 50, 299-304

- [108] H. Dittmann, K. Scharwächter, W.A. König: Synthesis and silica-based immobilisation of monofunctionalized cyclomalto-heptaose derivatives for enantioselective HPLC, *Carbohydr. Res.*, **2000**, 75-96
- [109] W.H. Pirkle, T.C. Pochapsky: Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers, *Chem. Rev.*, **1989**, 89, 347-362
- [110] A.D. Mescear, D.E. Koshland: Structural biology - A new model for protein stereospecificity, *Nature*, **2000**, 403, 614-615
- [111] P. Haglund: Isolation and characterisation of polychlorinated biphenyls (PCB) atropisomers, *Chemosphere*, **1996**, 32 (11), 2133-2140
- [112] A. Jaus, M. Oehme: Benefits of partially alkylated cyclodextrins for enantioselective separation of chiral polychlorinated compounds, *Organohal. Compounds*, **1999**, 40, 387-390
- [113] A. Jaus, M. Oehme, S. Skopp, H. Karlsson: Towards more reproducible separation of polychlorinated compounds with modified cyclodextrins: Necessary requirements and present status, *Organohal. Compounds*, **1998**, 35, 325-330
- [114] R.J. Letcher, E. Klasson-Wehler, Å. Bergman: Methyl sulfone and hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls: New type of persistent halogenated organic compounds, in Paasivirta, *The Handbook of Environmental Chemistry*, 3, Springer-Verlag, **2000**
- [115] G.L. Larsen, Å. Bergman, E. Klasson-Wehler, N.M. Bass: A methylsulfonyl metabolite of a chlorinated biphenyl can serve as a ligand for liver fatty acid binding proteins in rat intestinal mucosa, *Chem.-Biol. Interact.*, **2000**, 77, 315-323
- [116] G.L. Larsen, J.K. Huwe, Å. Bergman, E. Klasson-Wehler, P. Hargis: Methylsulfonyl metabolites of xenobiotics can serve as ligands for fatty acid binding proteins in chicken liver and intestinal mucosa, *Chemosphere*, **1992**, 25, 1189-1194
- [117] J. Lund, I. Brandt, L. Poellinger, Å. Bergman, E. Klasson Wehler, J.-Å. Gustafsson: Target cells for the chlorinated biphenyl metabolite 4,4'-bis(methylsulfonyl)-2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl Characterisation of high affinity binding in rat and mouse lung cytosol, *Mol. Pharmacol.*, **1985**, 27, 314-323

- [118] Y. Kato, K. Haraguchi, K. Tomiyasu, H. Saito, M. Isogai, Y. Masuda, R. Kimura: Structure-dependent induction of CYP2B1/2 by 3-methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats, *Environm.Toxicol.Pharmacol*, **1997**, *3*, 137-144
- [119] CD Römpp Chemie Lexikon-Version 1.0, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag, **1995**
- [120] P.J. Stephens, M.A. Lowe: Vibrational circular dichroism, *Ann.Rev.Phys.Chem.*, **1985**, *36*, 213-241
- [121] E. Tajkhorshid, K.J. Jalkanen, S. Suhai: Structure and vibrational spectra of the zwitterion L-Alanine in the presence of explicit water molecules: A density functional analysis, *J.Phys.Chem.B.*, **1998**, *102*, 5899-5913
- [122] Gaussian 98, Revision A.7, M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, V.G. Zakrzewski, J.A. Montgomery, Jr., R.E. Stratmann, J.C. Burant, S. Drappich, J.M. Millam, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, J.A. Petersson, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D.K. Malick, A.D. Rabuch, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.V. Ortiz, A.G. Baboul, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Lahan, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E.S. Replogle und J.A. Pople, *Gaussian Inc.*, Pittsburgh PA, **1998**
- [123] P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabalowski, M.J. Frisch: *Ab initio* calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields, *J.Phys.Chem*, **1994**, *98*, 11623-11627
- [124] F.J. Devlin, P.J. Stephens, J.R. Cheesemann, M.J. Frisch: Prediction of vibrational circular dichroism using density functional theory: Camphor and Fenchone, *J.Am.Chem.Soc.*, **1996**, *118*, 6327-6328
- [125] P.L. Polavarapu, C. Zhao, A.L. Cholli, G.G. Vernice: Vibrational circular dichroism, absolute configuration, and predominant conformations of volatile anesthetics: Desflurane, *J.Phys.Chem.*, **1999**, *103*, 6127-6132

- [126] A.D. Becke: Density functional thermochemistry. III. The role of exact exchange *J.Chem.Phys.*, **1993**, 98, 5648
- [127] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr: Development of the Cole-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys.Rev.*, **1988**, B37, 785
- [128] P.J. Stephens, A. Amouche, F.J. Devlin, S. Superchi, M.I. Donnoli, C. Rosini: Determination of the absolute structure using vibrational circular dichroism spectroscopy: The chiral sulfoxide 1-(2-methylnaphthyl) methyl sulfoxide, *J.Org.Chem.*, **2001**, 66, 3671-3677
- [129] Persönliche Kommunikation mit Prof. Dr. Helmchen von der *Universität Heidelberg* vom 21.6.2002
- [130] K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, *Organische Chemie*, 3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**
- [131] M. Johansson, C. Larsson, Å. Bergman, B.-O. Lund: Structure-activity relationship for inhibition of CYP11B1-dependent glucocorticoid synthesis in Y1 cells by aryl methyl sulphones, *Pharmacol. Toxicol.*, **1998**, 83, 225-230
- [132] M. Johansson, S. Nilsson, B.-O-Lund: Interactions between methylsulfonyl PCBs and the glucocorticoid receptor, *Environ.Health.Perspect.*, **1998**, 106, 769-774
- [133] M. Johansson, C. Larsson, N. Peters, T. Ellerichmann, B.-O.Lund: Enantioeric methylsulfonyl-2,2',4',5,5',6-hexaCBs; differences in biliary excretion but similar effects on the glucocorticoid-signalling pathway, *Dissertation C.Larsson*, **2002**, *Stockholm University*
- [134] C. Larsson, Å. Bergman: PCB methyl sulphones in rat liver after exposure to PCB (Clophen A50): analysis and radiosynthesis of selected methylsulphonyl-PCBs, *Xenobiotika*, **2001**, 31/2, 85-97
- [135] C. Larsson, T. Ellerichmann, H. Hühnerfuss, Å. Bergman: Chiral PCB methyl sulfones in rat tissues after exposure to technical PCB, *Environ.Sci.Technol.*, **2002**, in press
- [136] K. Wiberg, R. Letcher, C. Sandau, J. Duffe, R. Norstrom, P. Haglund, T. Bidleman: Enantioselective gas chromatography/mass spectrometry of Methylsulfonyl PCBs with application to arctic marine mammals, *Anal.Chem.*, **1998**, 70, 3845-3852

- [137] G. Bachour, K. Failing, S. Georgii, I. Elmadfa, H. Brunn: Species and organ dependence of PCB contamination in fish, foxes, roe deer and humans, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **1998**, *35*, 666-673
- [138] J. Lund, O. Andersson, E. Ripe: Characterization of a binding protein for the PCB metabolite 4,4'-bis-(methylsulfonyl)-2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl present in bronchialveolar lavage from healthy smokers and non-smokers, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1986**, *83*, 486-493
- [139] J. Lund, L. Nordlund, J.A. Gustafsson: Partial purification of a binding protein for polychlorinated biphenyls from rat lung cytosol: physicochemical and immunochemical characterization, *Biochemistry*, **1988**, *27*, 7895-7901
- [140] I. Brandt, A. Mohammed, P. Slanina: Persistence of 2,3,6-substituted pentachlorobiphenyls in the lung parenchyma: a new structure-dependent tissue localisation of polychlorinated biphenyls in mice, *Toxicology*, **1981**, *21*, 317-322
- [141] N. Peters: Entwicklung einer Methode zur Analyse von C₁₀-Chlorparaffinen in Biota-Proben, *Diplomarbeit, Universität Hamburg*, **1999**
- [142] W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer: Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry, *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, **1980**, *63*, 1344 pp
- [143] V.R. Meyer: Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern Wiley-VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, **1999**, 26-27
- [144] Y. Kato, K. Haraguchi, K. Tomiyasu, H. Saito, M. Isogai, Y. Masuda, R. Kimura: Structure-dependent induction of CYP2B1/2 by 3-methylsulfonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats, *Environm.Toxicol.Pharmacol.*, **1997**, *3*, 137-144
- [145] P.J. Stephens, M.A. Lowe: Vibrational circular dichroism, *Ann.Rev.Phys.Chem.*, **1985**, *36*, 213-241
- [146] T.I. Diamondstone: Assay of thyrosine transaminase activity by conversion of *p*-hydroxy phenylpyruvate to *p*-hydroxy benzaldehyde, *Anal. Biochem.*, **1966**, *16*, 395-401

- [147] A.S. Heiman, L.E. Tonner: The acute effect of lead acetate on glucocorticoid regulation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells, *Toxicol*, **1995**, *100*, 57-68
- [148] A. Lorenzen, S.W. Kennedy: A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader, *Anal. Biochem.*, **1993**, 346-348

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hühnerfuß für die Überlassung dieses interessanten Themas bedanken. Den Arbeitskreismitgliedern Sonja During, Sandra Otte, Heike Dannhauer, Jan Kuhlmann, Stefan Weigel und Ninja Reineke danke ich für zahlreiche Anregungen und Diskussionen, Frank Hoffmann außerdem für die Lösung diverser Computerprobleme.

Herrn Dr. Riering und Dr. Rieger von Macherey-Nagel sei für ihre Begeisterung und vertrauensvolle Zusammenarbeit in Bezug auf die chiralen HPLC-Phasen gedankt.

Insbesondere danke ich Jens Döbler für die umfangreichen VCD-Kalkulationen und Herrn Dr. Drews für die VCD-Messungen bei Bruker Optics in Ettlingen. Diese beiden sind für eine außergewöhnlich erfolgreiche und motivierende Zusammenarbeit verantwortlich. Diese Kooperation hat mir auf höchst erfreuliche Art und Weise gezeigt, welche, auch anfänglich unreal erscheinenden Ziele, mit vereinten Kräften zu erreichen sind.

Herrn Prof. Dr. Westendorf und Sabine Schröder danke ich für die nette Zusammenarbeit und das Ermöglichen und den Einblick in toxikologische Untersuchungen, die ansonsten gar nicht durchführbar gewesen wären.

Herr Ministerialrat Dr. Eisenhuth ermöglichte durch sein schnelles Handeln die Probenahme der Dessau-Proben, die vom Forstamtsleiter Herrn Wadas organisiert wurde. Ihm und Herrn Dr. habil. Schöll gebührt Dank für die freundliche Aufnahme in Dessau und die sehr interessanten Einblicke in ihre Arbeit. Seitdem sehe ich die Region Dessau und Bitterfeld mit ganz anderen Augen. Ebenso danke ich Herrn Dr. Jonas für die Proben aus dem Labor in Stendal.

Die Füchse wurden vom Landesjagdverband Kiel von Herrn Hoffmann organisiert, von Jasper Müller transportiert und von Ingrid Beese sezirt. So habe ich im wahrsten Sinne des Wortes einen tiefen Einblick in das Innenleben der Füchse erhalten. Selbstverständlich gilt auch ihnen mein besonderer Dank.

Zum Ende der Arbeit unterstützten mich die beiden Prager Lubomir Karasek und Petr Suchan bei vielerlei spannenden Experimenten. Durch den angenehmen und fruchtbaren Austausch sind wir, so hoffe ich zumindest, alle um einige Erfahrungen reicher geworden.

Zuletzt geht natürlich auch ein ganz besonderer Dank an meine Freunde und Familie, die mich moralisch immer sehr unterstützten, wenn es mal wieder schwierig geworden war und keinen Millimeter mehr vorwärts ging.

Anhang

Biotaprobieren

Tabellen A1: Einzelergebnisse der Reh-Proben

Reh, Fett							
PCB [ng/g EOM]	1	2	3	4	5	6	Mittelwert± SD
28	4,2	35,5	13,9	14,4	15,0	4,0	14± 11
52	2,7	8,9	12,4	15,3	5,1	4,7	8± 4
81	n.q.	3,1	n.q.	n.q.	1,1	n.q.	2± 1
77	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
95	4,9	4,9	12,2	n.q.	n.q.	3,5	6± 3
91	n.d.	n.d.	2,4	n.d.	n.d.	n.d.	2,4*
101	5,4	28,2	4,9	24,1	11,3	8,3	13± 9
118	3,5	22,5	14,1	18,2	9,2	5,0	12± 7
105	n.d.	6,7	1,2	2,5	1,4	n.d.	2± 2
126	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
187	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
174	n.d.	n.d.	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
180	8,8	17,3	36,2	n.q.	40,9	10,5	22± 14
170	2,7	5,4	12,3	n.q.	2,0	n.d.	5± 4
149	10,0	13,4	8,2	21,6	3,4	7,0	10± 6
153	32,8	28,0	67,1	35,9	65,0	20,7	41± 19
132	2,4	4,2	3,1	2,3	3,2	1,6	2± 0
138	6,0	18,9	n.q.	22,5	n.q.	18,5	16± 7
169	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Summe	83,5	197,0	188,2	156,8	157,6	83,8	144± 49

Reh, Lunge							
PCB [ng/g EOM]	1	2	3	4	5	6	Mittelwert± SD
28	138,7	59,4	41,7	57,2	24,8	57,9	63± 39
52	90,9	44,0	27,7	29,3	12,4	28,9	38± 27
81	n.q.	24,0	14,8	9,8	5,8	n.q.	13± 7
77	n.q.	4,0	2,3	n.d.	2,5	n.d.	2± 0
95	n.q.	n.q.	17,5	36,7	28,2	28,2	27± 7
91	n.q.	n.d.	n.q.	5,1	2,0	n.d.	3± 2
101	176,1	87,0	56,1	56,8	31,8	51,0	76± 51
118	n.q.	47,2	31,3	40,8	14,6	32,7	33± 12
105	n.q.	n.d.	1,8	2,6	n.d.	3,1	2± 0
126	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
187	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
174	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
180	n.q.	39,4	n.q.	16,2	11,6	n.q.	22± 14
170	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
149	n.q.	59,6	34,8	13,7	28,5	26,0	32± 16
153	n.q.	68,5	38,3	47,1	14,6	19,8	37± 21
132	n.q.	20,0	12,1	5,7	12,1	4,8	10± 6
138	n.q.	76,1	n.q.	35,3	22,5	n.q.	44± 27
169	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Summe	405,7	529,1	278,2	356,3	211,3	252,5	338± 116

Reh, Leber

PCB [ng/g EOM]	1	2	3	4	5	6	Mittelwert± SD
28	24,2	24,0	7,1	9,3	31,6	62,5	26± 20
52	21,0	19,7	6,4	n.q.	18,1	41,1	21± 12
81	9,4	7,8	2,8	n.q.	n.d.	n.q.	6± 3
77	3,5	n.d.	1,6	n.d.	n.q.	n.q.	2± 1
95	n.q.	19,0	n.q.	8,2	n.q.	n.q.	13± 7
91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
101	21,1	45,3	12,3	14,2	n.q.	n.q.	23± 15
118	21,9	16,6	6,0	7,8	10,6	n.q.	12± 6
105	2,8	n.d.	4,1	n.q.	2,9	1,0	2± 1
126	n.d.	n.d.	n.d.	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.
187	n.q.	n.q.	n.d.	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.
174	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
180	15,2	16,5	n.q.	n.q.	6,2	n.q.	12± 5
170	n.d.	n.d.	n.d.	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.
149	24,2	28,4	3,3	n.q.	17,6	40,7	22± 13
153	28,8	33,2	16,4	13,2	13,7	51,0	26± 14
132	36,6	30,1	16,4	13,2	10,9	29,9	22± 10
138	17,5	27,3	11,6	n.q.	18,0	n.q.	18± 6
169	n.d.	n.d.	n.d.	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.
Summe	226,3	268,0	88,1	65,9	129,5	226,2	167± 83

Tabellen A2: Einzelergebnisse der Wildschwein-Proben

Wildschwein, Fett

PCB [ng/g EOM]	1	2	3	4	5	Mittelwert± SD
28	3,5	2,6	n.q.	n.q.	2,7	2± 0
52	6,1	3,4	n.q.	n.q.	1,8	3± 2
81	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.
77	n.d.	n.d.	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
95	n.d.	n.q.	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
91	n.d.	n.d.	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
101	5,1	19,7	n.q.	n.q.	3,5	9± 8
118	1,5	8,3	n.q.	n.q.	1,8	3± 3
105	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
126	n.d.	n.d.	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
187	5,9	5,0	n.q.	n.q.	9,0	6± 2
174	n.d.	n.d.	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
180	5,0	7,1	n.q.	n.q.	6,2	6± 1
170	3,4	4,5	n.q.	n.q.	11,0	6± 4
149	1,2	8,0	n.q.	n.q.	4,0	4± 3
153	12,0	16,8	n.q.	n.q.	30,7	19± 9
132	n.q.	3,7	n.q.	n.q.	n.d.	3,7*
138	12,2	8,9	n.q.	n.q.	20,0	13± 5
169	n.d.	n.d.	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.
Summe	56,0	88,0	n.q.	n.q.	90,7	78± 19

Wildschwein, Lunge

PCB [ng/g EOM]	1	2	3	4	5	Mittelwert± SD
28	54,5	21,6	31,4	50,5	38,6	39± 13
52	33,7	13,1	13,5	33,4	23,7	23± 10
81	7,2	2,4	1,8	n.q.	n.d.	3± 2
77	n.d.	1,0	1,3	n.d.	n.d.	1± 0
95	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.	n.q.	n.d.
91	2,3	n.d.	2,9	n.d.	n.d.	2± 0
101	38,6	22,3	23,1	42,6	48,9	35± 11
118	15,2	9,0	8,3	8,4	n.q.	10± 3
105	8,0	1,5	1,3	n.d.	n.q.	3± 3
126	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.q.	n.d.
187	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.q.	n.d.
174	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
180	9,4	17,7	n.q.	n.q.	10,4	12± 4
170	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
149	8,8	5,0	5,1	6,3	n.q.	5± 1
153	17,0	14,9	12,0	n.q.	n.q.	14± 2
132	n.d.	3,1	n.d.	n.d.	n.q.	3,1*
138	15,8	10,4	13,1	n.q.	23,7	15± 2
169	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Summe	210,4	121,9	113,7	141,1	145,4	146± 43

Wildschwein, Leber

PCB [ng/g EOM]	2	3	4	5	Mittelwert± SD
28	4,9	15,7	33,1	31,0	26± 9
52	n.q.	9,3	24,5	24,3	19± 8
81	n.q.	3,4	1,2	n.q.	2± 1
77	n.d.	1,2	n.d.	n.d.	1*
95	12,0	25,7	n.q.	26,8	18± 9
91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
101	21,6	16,9	14,8	48,0	25± 15
118	n.q.	11,1	3,7	6,3	7± 3
105	n.d.	3,0	3,4	n.d.	3± 0
126	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
187	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
174	n.d.	n.d.	n.d.	n.q.	n.d.
180	11,6	15,4	7,7	12,1	11± 3
170	n.d.	n.d.	n.q.	14,0	14*
149	9,3	8,5	4,5	12,7	8± 3
153	13,9	21,5	15,2	33,6	21± 9
132	n.d.	3,7	n.d.	n.d.	n.d.
138	11,0	n.q.	18,3	39,7	25± 14
169	n.d.	n.d.	n.q.	n.d.	n.d.
Summe	84,3	135,3	126,4	248,5	148± 60

Tabellen A3: Einzelergebnisse der Fuchs-Proben

Fuchs, Lunge

PCB [ng/g EOM]	1	2	3	Mittelwert± SD
28	38,0	33,5	55,0	42± 11
52	29,6	20,1	38,6	29± 9
81	6,3	3,9	9,7	6± 2
77	n.d.	0,6	n.d.	0,6*
95	n.d.	n.d.	n.q.	n.d.
91	n.q.	1,4	n.d.	n.d.
101	55,7	24,8	72,2	50± 24
118	25,2	10,7	35,4	23± 12
105	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
126	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
187	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
174	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
180	28,6	94,3	57,3	60± 32
170	33,4	45,3	22,8	33± 11
149	n.d.	4,8	n.q.	4,8*
153	137,7	96,9	179,3	137,0
132	n.q.	n.q.	5,6	6*
138	9,7	n.q.	24,8	17± 10
169	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Summe	364,2	336,3	500,7	400± 88

Fuchs, Leber

PCB [ng/g EOM]	1	2	3	Mittelwert± SD
28	21,8	20,8	19,3	20± 1
52	10,6	9,3	8,8	9± 0
81	1,8	1,0	n.d.	1± 0
77	n.d.	0,9	n.q.	0,9*
95	n.d.	n.d.	n.q.	n.d.
91	n.d.	n.d.	n.q.	n.d.
101	10,4	8,9	12,0	10± 1
118	8,0	4,7	11,4	8± 3
105	3,3	2,3	2,1	2± 0
126	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
187	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
174	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
180	132,9	914,2	243,0	430± 422
170	121,8	260,9	382,7	255± 130
149	3,0	1,4	17,2	7± 8
153	162,1	1457,3	493,2	704± 672
132	n.q.	n.q.	27,6	27*
138	n.q.	126,4	199,4	162± 51
169	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Summe	475,6	2808,1	1416,7	1566± 1173

Tabelle A4: Einzelergebnisse der Human-Proben

Human, Fett												
[ng/g EOM] PCB	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	MW ± SD
8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
28	0,7	3,1	6,5	2,6	2,8	5,5	3,7	6,2	5,1	2,3	n.d.	3±1
31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
47	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
52	0,8	1,5	1,7	0,9	1,4	0,7	1,6	1,1	1,0	0,6	0,7	1±0
66	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
74	2,4	2,6	6,4	3,8	6,1	11	5,8	3,6	4,7	4,3	2,1	5±2
91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
95	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
101	5,6	4,7	8,5	3,4	6,1	7,1	3,3	5,9	2,4	3,9	1,1	5±1
105	5,4	3,9	4,8	6,4	2,8	4,1	5,6	2,1	5	1,8	2,2	4±1
118	58,3	66,5	13,5	90,2	14,8	71,3	58,3	139,1	88,5	59,1	12,8	65±34
128	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
132	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
136	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
138	311,1	512,3	554,7	498,2	355,1	188,4	611,2	12,8	501,7	71,4	56,8	361±199
149	10,3	4,3	5,2	9,4	18,7	11,5	2,8	2	4	2,9	n.d.	7±5
151	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
153	401,2	858,1	66,3	712,9	177,3	525,4	955,5	1024,4	712,3	688,1	168,5	612±302
156	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
163	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
170	10,5	11,5	16,1	14,3	9,7	6,9	8,7	15,4	14,7	5,8	4,8	11±3
174	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
180	284,3	705,4	659,8	544,1	558,7	274,3	614,0	61,3	455,4	85,6	109,3	424±221
194	5	6,3	8,8	7,1	8,5	3,9	5,1	9,1	6,7	3,6	2,4	6±1
195	3,2	4,1	5,8	6,2	7,4	2,3	2,2	6,4	4,1	1,8	2,7	4±1
206	0,5	0,9	0,8	1,4	0,8	0,7	0,9	0,7	1	0,7	n.d.	0±0
209	0,8	1,3	1,2	0,7	1,5	0,7	1,1	1,3	1,2	1,1	n.d.	1±0
Summe	1100,1	2186,5	1360,1	1901,6	1171,7	1113,8	2279,8	1291,4	1807,8	933	363,4	1514±462

Tabelle A5: *Probendaten der Biota-Proben*

[Geschlecht/Alter (Jahre)]					
Probe-Nr.	Mensch	Pelikan	Wildschwein	Reh	Fuchs
1	W/ 71	M/ 28	W/ 1	M/ 5	M/ 5 Mon.
2	W/ 56		M/ 1	F/ 1	M/ 5 Mon.
3	W/ 82		M/ 1	M/ 1	M/ 5 Mon.
4	M/ 76		M/ 1	M/ 3	
5	W/ 62		M/ 1	M/ 1	
6	M/ 68			M/ 1	
7	W/ 73				
8	M/ 57				
9	M/ 74				
10	W/ 69				
11	W/ 34				

Revier/ Gewicht [kg]			
Probe-Nr.	Reh	Wildschwein	Fuchs
1	Dessau-Nord, 20	Dessau-Nord, 23	Kattendorf, 4
2	Törten, 11	Dessau-Nord, 24	Kattendorf, 4
3	Törten, 13	Törten, 42	Kattendorf, 4
4	Törten, 14	Dessau-Nord, 68	
5	Dessau-Nord, 12	Dessau-Nord, 65	
6	Dessau-Nord, 13		