

**Beurteilung von Phyto- und Xenoöstrogenen am
Beispiel ausgewählter Substanzen**

-

**Biotransformation und Toxikokinetik von Daidzein
und Bisphenol A in Menschen und Ratten**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Thomas Colnot

aus

Neunkirchen / Saar

Würzburg 2001

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden wie folgt veröffentlicht:

Veröffentlichte Tagungsbeiträge:

Lederer, E., Wolf, N., Colnot, T., Schreiber, A., Dekant, W., Völkel, W. (2001).
Methodenvergleich zum sensitiven Nachweis von d₁₆-Bisphenol A-Glukuronid in Urin von
kontrolliert exponierten Freiwilligen. Posterpräsentation bei der Jahrestagung Chemie 2001
der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Würzburg, 23.-29. September 2001

Originalarbeiten:

Bayer, T., Colnot, T. und Dekant, W. (2001). Disposition and biotransformation of the
estrogenic isoflavone daidzein in rats. *Toxicol.Sci.* **62** (2), 205-11.

Völkel, W., Lederer E., Colnot, T. und Dekant, W. Toxicokinetics of d₁₆-Bisphenol A in
human volunteers. *Chem. Res. Toxicol.* (in Vorbereitung)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Dekant für die Themenstellung, für die zahlreichen Anregungen während der Durchführung der Arbeit und die ständige Gesprächsbereitschaft. Weiterhin sei ihm für das entgegengebrachte Vertrauen und die Gelegenheit zur Teilnahme an Kongressen und zahlreichen Fortbildungsveranstaltungen nochmals herzlich gedankt.

Besonderer Dank gebührt ihm vor allem für die Unterstützung, die er mir gegeben hat, als sich mir Anfang 2001 die Chance bot, bei der Merck KGaA als Toxikologe einzusteigen. Während meiner fünfmonatigen Abwesenheit hat er mit der Entwicklung der FLD-Analytik für Bisphenol A und der Optimierung der HPLC/UV-Methode für Daidzein wesentlich zur Klärung wichtiger Fragestellungen beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. H. J. Gross als Vertreter der Fakultät für Chemie und Pharmazie möchte ich mich besonders herzlich für die Betreuung meiner Dissertation am Institut für Toxikologie und Pharmakologie bedanken.

Bei Tanja Bayer möchte ich mich ganz besonders für die im Rahmen eines Praktikums durchgeführten Arbeiten zu Metabolismus und Kinetik von Daidzein in Ratten bedanken, womit sie mir wirklich eine Menge Arbeit abgenommen hat.

Für stete Unterstützung und Aufbauarbeit, wenn der MD800 mal wieder nicht so wollte, wie ich das gern gesehen hätte, sei Wolfgang ganz besonders gedankt. Ohne seine Gelassenheit und Hilfe wäre ich heute nicht, wo ich bin. Weiterhin schulde ich ihm großen Dank für die Koordinierung zahlreicher Versuche während meiner Abwesenheit und die Optimierung diverser Methoden.

Großen Dank bin ich auch allen beteiligten Probanden für ihre fast unbegrenzte Leidensfähigkeit sowie den beteiligten Ärzten, Ute Schauer und Stefan Engelhardt, für diverse nächtliche Blutentnahmen schuldig.

Den Kollegen vom Institut für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg sowie Herrn André Schreiber von der Firma Applied Biosystems danke ich für die Aufnahme diverser LC/MS-Spektren.

Großer Dank gebührt auch Elke für die Extraktion und Messung ungezählter Urin- und Plasmaproben.

Herrn Götz und seinen Kollegen vom zahntechnischen Institut der Universitätsklinik sei für die Lösungen zahlreicher technischer Probleme gedankt, die zum Gelingen der Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Caroline und Herrn Link möchte ich für die Pflege die Tiere und die Unterstützung beim Umgang mit den Tieren danken.

Danke auch an die eifrigen Korrekturleser Marie Isabel und Wolfgang. Mirabel sei an dieser Stelle auch für die langjährige Unterstützung gedankt, mit der sie mir aus so manchem Tief herausgeholfen hat.

Für gemeinsame Championsleague-Exzesse und zahlreiche andere Unternehmungen geht ein riesiges Dankeschön an Angela, Ali und Uli. Besonders die denkwürdigen Abende in der Morellistraße werden mir ewig in positivster Erinnerung bleiben. Selten habe ich mich bei Fans dieses rot-weißen Dorfvereins so wohl gefühlt.

Für die vielen denkwürdigen Feste mir vorzüglicher Verköstigung (mit Portionen, die auch bei einem Saarländer keine Wünsche offenließen) danke ich besonders Natalie und Detlef, ebenso für so manche zweirädrigen Touren, die in mir auch den Wunsch geweckt haben, mir ein solches Gefährt zuzulegen.

Allen anderen Mitgliedern des Arbeitskreises, nämlich Axel, Ellen, Hannelore, Heike, Herbert, Jens, Kai, Katja, Lissie, Marion und Susanne (auch wenn es manchmal gekracht hat), danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre.

Nicht versäumen möchte ich es auch, an dieser Stelle Herrn Dr. P. J. Kramer von der Firma Merck KGaA für das entgegengebrachte Vertrauen und die Flexibilität in der Gestaltung meines „Urlaubs“ zur Fertigstellung dieser Dissertation zu danken.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
2 KENNTNISSTAND	3
2.1 Begriffsdefinition - Wirkmechanismus - Belege für Wirksamkeit	3
2.2 Testsystem - Stoffgruppen - Wirkintensität.....	6
2.3 Bedeutung der Toxikokinetik für die Problematik	9
2.4 Daidzein – ein Vertreter der Gruppe der Phytoöstrogene	10
2.4.1 Eigenschaften und Vorkommen	10
2.4.2 Menschliche Belastung.....	11
2.4.3 Metabolismus und Toxizität	12
2.4.4 Epidemiologische Befunde zur hormonellen Wirkung	14
2.5 Bisphenol A – ein Vertreter der Gruppe der Xenoöstrogene.....	17
2.5.1 Eigenschaften und Verwendung.....	17
2.5.2 Menschliche Belastung.....	17
2.5.3 Metabolismus und Toxizität	19
2.5.4 Hormonelle Wirkung.....	19
3 AUFGABENSTELLUNG.....	21
4 MATERIAL UND METHODEN	23
4.1 Verwendete Chemikalien	23
4.1.1 Käufliche Chemikalien	23
4.1.2 Syntheschemikalien	24
4.2 Instrumentelle Analytik	24
4.2.1 Massenspektrometrie	24
4.2.1.1 Massenspektrometrie gekoppelt mit Gaschromatographie (GC/MS)	24
4.2.1.2 Massenspektrometrie gekoppelt mit Flüssigkeitschromatographie (LC/MS/MS) ...	26
4.2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	28

4.2.3	Bestimmung von klinisch-chemischen Parametern.....	30
4.3	Derivatisierungsreaktionen	30
4.4	Konjugatspaltungen	31
4.4.1	Enzymatische Spaltung von Daidzein- und BPA-Glucuronid in Ratten-Urin	31
4.4.2	Enzymatische Spaltung von Daidzein-Glucuronid in Human-Plasma.....	31
4.4.3	Enzymatische Spaltung von Daidzein-Glucuronid in Human-Urin	31
4.4.4	Enzymatische Spaltung von Bisphenol A-Glucuronid in Maus-Urin	32
4.4.5	Enzymatische Spaltung von d ₁₆ -BPA-Glucuronid in Human-Plasma	32
4.4.6	Enzymatische Spaltung von d ₁₆ -BPA-Glucuronid in Human-Urin.....	32
4.5	Inkubationen	33
4.6	Synthesen.....	34
4.6.1	Synthese von Daidzein (nach Wahala, K. <i>et al.</i> , 1995).....	34
4.6.2	Oxidation von Bisphenol A (modifiziert nach Udenfriend, S. <i>et al.</i> , 1954).....	35
4.6.3	Synthese von Hydroxy-Bisphenol A (variiert nach Metzler, M., 1998)	36
4.7	Tierversuche.....	37
4.7.1	Exposition von Ratten gegen Daidzein	37
4.7.2	Exposition von Ratten gegen Bisphenol A.....	38
4.7.3	Exposition von Mäusen gegen Bisphenol A	39
4.7.4	Exposition einer Ratte gegen d ₁₆ -Bisphenol A.....	39
4.8	Human-Expositionen.....	40
4.8.1	Exposition gegen Daidzein.....	41
4.8.2	Exposition gegen d ₁₆ -Bisphenol A	41
4.9	Qualitative Untersuchungen.....	42
4.9.1	HPLC-Messungen	42
4.9.2	GC/MS-Messungen	43
4.10	Quantifizierungen.....	44
4.10.1	Quantifizierung von Daidzein in Rattenfutter per HPLC/UV	44
4.10.2	Quantifizierung von Daidzein und seiner Konjugate in Ratten-Urin per HPLC/UV	45
4.10.3	Quantifizierung von Daidzein in Ratten-Faeces per HPLC/UV	45

4.10.4	Identifizierung von Equol und <i>O</i> -DMA in Ratten-Faeces per GC/MS	46
4.10.5	Quantifizierung von Gesamt-Daidzein in Human-Plasma per GC/MS.....	47
4.10.6	Quantifizierung von Gesamt-Daidzein in Human-Urin per HPLC/UV	49
4.10.7	Quantifizierung von BPA in Rattenurin per HPLC/UV	50
4.10.8	Quantifizierung von BPA in Rattenfaeces per HPLC/UV	50
4.10.9	Quantifizierung von Gesamt-BPA in Mausurin per GC/MS.....	51
4.10.10	Quantifizierung von BPA in Mausfaeces per HPLC/UV	52
4.10.11	Quantifizierung von d ₁₆ -BPA in Human-Plasma nach Konjugatspaltung	53
4.10.12	Quantifizierung von d ₁₆ -BPA in Human-Urin nach Konjugatspaltung	54
4.10.13	Bestimmung von d ₁₆ -BPA-Glucuronid in Human-Urin per HPLC/UV.....	56
4.10.14	Quantifizierung von BPA in Human-Plasma nach Konjugatspaltung	57
5	ERGEBNISSE.....	59
5.1	Analytik	59
5.1.1	Massenspektrometrie	61
5.1.2	HPLC	65
5.2	„in vitro-Metabolismus“ von Daidzein - Inkubationen	66
5.3	Biotransformation von Daidzein in Ratten	66
5.4	Toxikokinetik von Daidzein in Ratten.....	71
5.4.1	Urin.....	71
5.4.2	Faeces	75
5.4.3	Gesamtausscheidung - Übersicht	76
5.5	Biotransformation und Toxikokinetik von Daidzein im Menschen.....	78
5.5.1	Plasma.....	78
5.5.2	Urin.....	79
5.6	„in vitro-Metabolismus“ von BPA - Inkubationen.....	82
5.7	Biotransformation von Bisphenol A in der Ratte.....	83
5.8	Synthesen.....	86
5.9	Toxikokinetik von Bisphenol A in Ratten	87

5.9.1	Urin.....	87
5.9.2	Faeces	90
5.9.3	Gesamtausscheidung - Übersicht	90
5.10	Toxikokinetik von Bisphenol A in Mäusen	91
5.10.1	Orale Exposition mit 2 mg/kg KG Bisphenol A	92
5.10.2	Orale Exposition mit 20 mg/kg KG Bisphenol A	93
5.11	Biotransformation und Toxikokinetik von d₁₆-BPA im Menschen	95
5.11.1	Anmerkungen zur Wahl von d ₁₆ -BPA für die Humanstudie.....	95
5.11.2	Plasma.....	96
5.11.3	Urin.....	99
5.12	Hintergrundbelastung des Menschen	102
6	DISKUSSION.....	104
6.1	Vergleich und Bewertung der analytischen Methodik.....	104
6.2	Biotransformation und Toxikokinetik von Daidzein	106
6.2.1	Biotransformation <i>in vitro</i>	106
6.2.2	Biotransformation <i>in vivo</i> und Toxikokinetik in der Ratte.....	107
6.2.3	Toxikokinetik im Menschen.....	109
6.2.4	Bedeutung der Ergebnisse im Hinblick auf eine unerwünschte endokrine Wirkung 111	
6.3	Biotransformation und Toxikokinetik von Bisphenol A und d₁₆-Bisphenol A... 112	
6.3.1	Biotransformation <i>in vitro</i>	112
6.3.2	Biotransformation <i>in vivo</i> und Toxikokinetik in der Ratte.....	112
6.3.3	Toxikokinetik in der Maus	114
6.3.4	Toxikokinetik im Menschen.....	115
6.3.5	Bedeutung der Ergebnisse im Hinblick auf eine unerwünschte endokrine Wirkung 116	
6.4	Toxikologische Bewertung der Datenlage und Risikoabschätzung	117
6.4.1	Belastung durch Nahrungsmittel - äußere Exposition.....	117
6.4.2	Vergleich von innerer Belastung, wirksamen Dosen und Grenzwerten.....	119

6.4.3	Problematik der „Sensitiven Sub-Populationen“	122
7	ZUSAMMENFASSUNG	125
8	SUMMARY	128
9	LITERATURVERZEICHNIS	131

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AUC	area under the curve
BPA	2,2-(4,4'-dihydroxydiphenyl)-propan (Bisphenol A)
BSA	Bis-(trimethylsilyl)-acetamid
BSTFA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
ca.	circa
CAS	Chemical Abstracts
c_{\max}	maximale Konzentration
CYP	Cytochrom P450
DAD	Dioden Array Detektor
DDT	Dichloro-diphenyl-trichlorethan
DES	Diethylstilböstrol
<i>O</i> -DMA	<i>O</i> -Desmethylangolensin
DMF	Dimethylformamid
ECD	Elektrochemischer Detektor
EI	Electron Impact
EPA	Environmental Protection Agency
ER	Östrogenrezeptor
ES	Elektrospray
et al.	und andere (et alii)
F344-Ratten	Fischer 344 Ratten
FLD	Fluoreszenzdetektor
FDA	Food and Drug Administration
GC	Gaschromatographie
GGT	γ -Glutamyl-Transferase
GOT/AST	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase/Aspartat-Amino-Transferase
GPT/ALT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase/Alanin-Amino-Transferase
HMDS	Hexamethyldisilazan
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
I.D.	Innendurchmesser

KG	Körpergewicht
LC/MS/MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
LD ₅₀	Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere sterben
LM	Lösungsmittel
LOAEL	lowest observed adverse effect level
max.	maximal
MBTFA	N-Methyl-bis-trifluoracetamid
MeOH	Methanol
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MSD	Mass Selective Detector
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
NADPH	Nikotinamid Adenine Dinucleotid Phosphat
NCI	Negative Chemische Ionisation
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
NOAEL	no observed adverse effect level
NTP	National Toxicology Protocol
PCB	polychlorierte Biphenyle
PFBCl	Pentafluorbenzoylchlorid
rt	Retentionszeit
SHBG	Sex Hormone Binding Globulin
SIM	Single Ion Monitoring
SPE	Festphasenextraktion
SPI	Society of the Plastics Industry, Inc.
t _{1/2}	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TDI	tolerable daily intake
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Trimethylsilyl
TMCS	Trimethylchlorsilan
TSH	schilddrüsenstimulierendes Hormon
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

Die Möglichkeit, daß Chemikalien unerwünschte Wirkungen auf das endokrine System von Mensch und Tier haben, hat in den letzten Jahren nicht nur zu kontroversen Diskussionen in der Wissenschaft, sondern insbesondere auch zu weitverbreitetem Interesse in den Medien und der breiten Öffentlichkeit geführt.

Bedenken wurden geäußert, daß eine Exposition gegen Chemikalien, die in die Hormonregulation eingreifen, toxische Wirkungen im Menschen hervorrufen kann (McLachlan, J. A. und Korach, K. S., 1995; Colborn, T. *et al.*, 1996; Carr, C. J. und Wilkinson, C. F., 1997). Viele Beobachtungen, die zu diesen Bedenken geführt haben, wurden an wild lebenden Tieren oder bei Versuchstieren gemacht (LeBlanc, G. A., 1995; Daston, G. P. *et al.*, 1997); Effekte im Menschen konnten bisher nur nach Exposition gegen hohe Dosen einiger weniger Chemikalien, wie Diethylstilböstrol (DES) und polychlorierten Biphenylen (PCB's), eindeutig auf eine substanzspezifische Störung des Hormonsystems zurückgeführt werden (Giusti, R. M. *et al.*, 1995; Mittendorf, R., 1995; EPA, 1988). Zugleich sind die positiven Effekte der Einnahme von in Nahrungsmitteln oder Pharmazeutika enthaltenen (natürlichen) „endocrine active compounds“ ein wichtiges Forschungsgebiet in der Medizin (Henderson, B. E. *et al.*, 1993; Adlercreutz, H., 1995; Black, L. J. *et al.*, 1994).

Die der Diskussion zugrundeliegende Hypothese besagt, daß ein breites Spektrum synthetisch hergestellter und weltweit verbreiteter Chemikalien, die zudem in der Umwelt persistieren und sowohl im Tier als auch im Menschen akkumulieren können, in das Hormonsystem eingreifen und für eine Vielzahl verschiedener Krankheiten verantwortlich sein könnten. Als Indizien für diese Hypothese wurden unter anderem eine Zunahme der Inzidenz von Brust- (Ahlborg, U. G. *et al.*, 1995), Hoden- (Depue, R. H. *et al.*, 1983) und Prostatakrebs (McCaul, K. A. *et al.*, 1995) und ein vermehrtes Auftreten bösartiger Erkrankungen der Reproduktionsorgane genannt. Weitere Befunde, die mit Umwelthormonen in Verbindung gebracht wurden, sind Mißbildungen der Fortpflanzungsorgane wie Kryptorchismus oder Hypospadien (Toppari, J. e. al., 1995), eine angebliche Abnahme der Spermienzahl und -qualität (Carlsen, E. *et al.*, 1992; Auger, J. *et al.*, 1995) sowie Lern- und Verhaltensschwächen bei Kindern (Jacobson, J. L. und Jacobson, S. W., 1996) und eine Beeinträchtigung der Immunabwehr (Chryssikopoulos, A., 1997; Ahmed, S. A., 2000). In der Tierwelt hat sich das Interesse vor allem auf Störungen der Fortpflanzungsorgane, wie beispielsweise verringerte Penisgröße und erniedrigte Testosteron-Werte in Alligatoren im Lake Apopka in Florida (Semenza, J. C. *et al.*, 1997), auf Fortpflanzungsstörungen beim Florida-Panther aufgrund verringerter

Spermienanzahl und -qualität, (Facemire, C. F. *et al.*, 1995), auf verändertes Sexualverhalten von Bären, z.B. Vermännlichung weiblicher Tiere in Kanada (Cattet, M., 1988; Adams, N. R., 1981), und auf mögliche Immunprobleme z.B. bei Delphinen, Walen und Schildkröten gerichtet (Brouwer, A. *et al.*, 1998).

„Endocrine Disruption“ ist kein neues Phänomen. In den 1930ern zeigten Studien an Laborieren östrogene Eigenschaften einer ganzen Anzahl von Industriechemikalien (Dodds, E. C. und Lawson, W., 1938). Der feminisierende Effekt des Pestizids Dichloro-diphenyl-trichlorethan (DDT) in Hähnen wurde in den 1950ern beschrieben (Burlington, H. und Lindemann, V. F., 1950). Obwohl das Konzept der endokrinen Störung durch synthetische Chemikalien dann seit den 1970ern (Seaman, B. und Seaman, G., 1975) ernsthaft diskutiert wurde, rückte die Problematik erst Anfang der 1990er ins Bewußtsein der Öffentlichkeit, als in mehreren Artikeln erstmals eine Verbindung zwischen „endocrine disrupters“ und vermehrtem Auftreten von Brustdrüsentumoren bei Frauen sowie einer abnehmenden Fruchtbarkeit beim Mann gezogen wurde (Colborn, T. und Clement, C., 1992; Colborn, T. *et al.*, 1993; Davis, D. L. *et al.*, 1993; Sharpe, R. M. und Skakkebaek, N. E., 1993 ; Wolff, M. S. *et al.*, 1993). Das Interesse der Medien an dem Themenkomplex wurde 1993 durch eine BBC-Reportage mit dem Titel „Assault on the Male“ geweckt. Nach der Veröffentlichung des Buches „Our Stolen Future“ (Colborn, T. *et al.*, 1996), das mit einem Vorwort des damaligen US-Vizepräsidenten Al Gore versehen war, wurden zahlreiche nationale und internationale Forschungsprogramme zur Aufklärung der Einflüsse von sogenannten Umwelthormonen initiiert.

Hormonvermittelte Toxizität verschiedener Chemikalien zu untersuchen sowie deren „östrogene“ Potenz *in vivo* einzuschätzen, ist damit zu einer aktuellen Herausforderung für Toxikologen geworden. Um eine Risikoabschätzung machen zu können, sind Informationen zur Toxikokinetik und zur Biotransformation unabdingbar. Ein positives Ergebnis in einem *in vitro* Östrogenitätstest alleine erlaubt keine abschließende Aussage zum Gefahrenpotential eines Umwelthormons. Vielmehr kommt es darauf an, Kenntnisse über die tatsächlichen Konzentrationen im Körper zu erlangen und diese in Relation zu den in der Literatur beschriebenen *in vitro* Ergebnissen zu setzen. Um weiterhin Tierversuchsdaten auf den Menschen extrapolieren zu können, sind vergleichende Untersuchungen von Toxikokinetik und Metabolismus sehr wichtig. Diese sollten an zwei relevanten Stoffen als Beispiel für östrogene Industriechemikalien (Bisphenol A) und Phytoöstrogene (Daidzein) durchgeführt werden.

2 Kenntnisstand

2.1 Begriffsdefinition - Wirkmechanismus - Belege für Wirksamkeit

Der Begriff „endocrine disruption“ wurde Mitte der 1990er eingeführt. Darunter werden die unterschiedlichen Wirkungen von Chemikalien auf das Hormonsystem auf plakative, wenn auch wissenschaftlich ungenaue Weise zusammengefaßt. Spricht man von der „endokrinen Wirkung“ von Chemikalien, so umfaßt dieser Ausdruck alle Arten von Wirkungen (östrogen, anti-östrogen, androgen, anti-androgen, auf die Schilddrüse usw.), die in die hormonelle Regulation im Körper von Mensch und Tier eingreifen. Derartige Wirkungen können in allen Lebensstadien eines Organismus' auftreten und können von besonderer Bedeutung während sensibler Phasen der prä- und postnatalen Entwicklung sein.

Der Begriff „Umwelthormon“ (im englischen auch "endocrine disrupter“ genannt) bezieht sich sowohl auf natürlich vorkommende, hormonell wirksame Verbindungen (z.B. in Pflanzen vorkommende Phytoöstrogene) als auch auf eine ganze Reihe von Umweltchemikalien wie synthetisch hergestellte Hormone oder eine Vielzahl an Industriechemikalien (auch Xenoöstrogene genannt).

Das Hormonsystem besteht aus einer Anzahl endokriner Organe wie der Schilddrüse, den Keimdrüsen und den Nebennieren sowie aus den von diesen Organen produzierten Hormonen wie Thyroxin, Östrogen, Testosteron und Adrenalin, die die Entwicklung, das Wachstum, die Fortpflanzung und das Verhalten von Tieren und Menschen steuern. Neben den Steroidhormonen gibt es Polypeptidhormone (z.B. Insulin), von Aminosäuren abgeleitete Hormone (z.B. Schilddrüsenhormone) und von ungesättigten Fettsäuren abgeleitete Hormone (z.B. Prostaglandine). Hormone sind informationsvermittelnde Moleküle, die meist über das Blut transportiert werden und in anderen Teilen des Körpers Reaktionen hervorrufen. Man geht davon aus, daß die Funktionen dieses komplexen Systems durch hormonell aktive Stoffe auf mindestens drei unterschiedlichen Wegen beeinflusst werden können:

- durch Bindung an die Hormonrezeptoren und Imitation der Wirkung eines endogenen Hormons, wodurch ähnliche chemische Reaktionen im Körper ausgelöst werden;
- durch Blockierung der Hormonrezeptoren, wodurch eine normale Hormonwirkung verhindert wird, oder
- durch Beeinflussung der Synthese, des Transports, des Stoffwechsels und der Ausschüttung von Hormonen, wodurch die Konzentrationen natürlicher Hormone geändert werden.

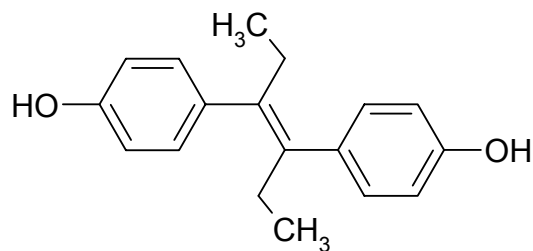


Abb. 2.1: Struktur von Diethylstilböstrol.

Maßgeblich zum Verständnis der Wechselwirkung exogener Substanzen mit dem Hormonsystem hat die Untersuchung des „DES-Syndroms“ Anfang der 1970er beigetragen. Diethylstilböstrol (DES, s. Abbildung 2.1) ist eine synthetisch hergestellte östrogene Verbindung, die aufgrund einer fehlenden Plasmaeweißbindung sehr gut bioverfügbar ist, praktisch dieselbe *in vitro* Bindungsaffinität für den Östrogenrezeptor wie Östradiol selbst und eine vergleichbare östrogene Effizienz *in vivo* hat (Degen, G. H., 1996). Wegen seiner geringen akuten (maternalen) Toxizität wurde DES von Anfang der 1930er bis 1971 mehrere Millionen Male in erheblichen Dosen an schwangere Frauen gegeben, um Fehlgeburten zu verhindern und allgemein schwangerschaftserhaltend zu wirken. Übliche Dosen betrug 5 mg/Tag, die im Verlauf der Schwangerschaft auf bis zu 125 **mg/Tag** gesteigert wurden. Auf diese Weise nahmen Schwangere oft eine Gesamtdosis von 1,4 - 17,9 g auf (Golden, R. J. *et al.*, 1998; Degen, G. H., 1996) - man vergleiche diese Werte mit heute üblichen Dosen von ca. 30-100 **µg/Tag** Ethinylöstradiol, das in oralen Kontrazeptiva enthalten ist. 1971 wurde die Verwendung von DES durch die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) gestoppt, nachdem mehrere Fälle eines seltenen vaginalen Adenokarzinoms bei jungen Frauen auf die Einnahme von DES durch deren Mütter während der Schwangerschaft zurückgeführt werden konnten. Die eingehende Untersuchung der Vorfälle lieferte eine beachtliche Menge

an Daten sowohl im Tier als auch im Menschen, die die Effekte von *in utero* Exposition auf den (adulten) Nachwuchs bestätigte.

So hatten Töchter ein erhöhtes Risiko, an krankhaften Veränderungen des Genitalbereiches (vaginale Adenosis, Adenokarzinome, Endometriose, Ovarialzysten, Menstruationsstörungen, Unfruchtbarkeit) und an Funktionsstörungen des Immunsystems zu erkranken (Golden, R. J. *et al.*, 1998; Melnick, S. *et al.*, 1987); „DES-Söhne“ wiesen eine Häufung von Anomalien der Genitalien (Kryptorchismus, Mikrophallus, Hypospadie, Hoden- und Prostatatumore) sowie abnorme Spermatogenese auf (Giusti, R. M. *et al.*, 1995). Weiterhin wurde eine Veränderung der für Männer bzw. Frauen typischen Verhaltensmuster beobachtet (Reinisch, J. M. *et al.*, 1991). Die Mütter selbst wiesen eine erhöhte Inzidenz für Brustkrebs auf, die allerdings erst nach einer Latenzzeit von mehr als zwanzig Jahren nach Ende der DES-Gabe zu beobachten war (Greenberg, E. R. *et al.*, 1984). Der große Datenbestand zu den Wirkungen von Diethylstilböstrol sowie klare Vorstellungen über den Mechanismus haben dazu geführt, daß DES heute oft als Positivkontrolle in Studien zu den Effekten von Umwelthormonen benutzt wird.

2.2 Testsystem - Stoffgruppen - Wirkintensität

Um hormonelle Wirksamkeit festzustellen, sind folgende Prüfverfahren gängig:

Tab. 2.1: Testsysteme für hormonelle Wirkung.

	Testsystem	Funktionsprinzip
<i>in vitro</i>	Bindungsassay	Verdrängung von radioaktiv markiertem 17 β -Östradiol vom Östrogenrezeptor (Korenman, S. G., 1969)
	E-Screen	Stimulierung der Zellproliferation in der östrogenresponsiven humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 (Soto, A. M. <i>et al.</i> , 1992)
	Hefezelltest	Induktion von Marker-Enzym-Synthese in genetisch veränderten Hefezellen, die den humanen Östrogenrezeptor tragen (Routledge, E. J. und Sumpter, J. P., 1997; Klein, K. O. <i>et al.</i> , 1994)
	Gen-Expressions-Assay	Stimulation der Transkriptionsaktivität in transfizierten Zellen; Korrelation der östrogenen Potenz mit der Aktivität der vom Reporter-Gen exprimierten Enzyme (Jobling, S., 1998)
<i>in vivo</i>	Uterotropher Assay	Auslösung des Uteruswachstums in ovariectomierten weiblichen Mäusen oder Ratten, Endpunkt: Uterusgewicht (Lan, N. C. und Katzenellenbogen, B. S., 1976); Eine prinzipiell ähnliche Testmethode ist der Allen-Doisy-Test: Erfassung der Verhornung des Scheidenepithels (Allen, E. und Doisy, E. A., 1923)
	Hershberger Assay	ähnlich dem uterotrophen Assay, aber für Androgene; durchgeführt in kastrierten männlichen Nagern, Endpunkt: Prostatagewicht (Cook, J. C. <i>et al.</i> , 1997)
	Vitellogenin-Synthese	Induktion der Produktion eines hormonabhängigen Fischproteins (Pelissero, C. <i>et al.</i> , 1991)

Der Nachweis einer hormonellen Wirkung eines Fremdstoffes im Körper und die Interpretation der vorhandenen Datenlage ist nicht unproblematisch. Es gibt eine Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Testsystemen (s. Tabelle 2.1), die die Bindung einer spezifischen Verbindung an einen Hormonrezeptor, die relative Affinität dieses Rezeptors für die jeweilige

Chemikalie oder auch die Induktion bestimmter hormonell regulierter Proteine bestimmen können. Das östrogene Potential läßt sich nur durch biologische Methoden in einem geeigneten System (Zellkultur, isoliertes Organ, Organismus) herausfinden. Hier kommt der Vorteil der *in vitro* Testsysteme zum Tragen: Sie erlauben ein schnelles und relativ preisgünstiges „Screening“ auf östrogene Wirkung und eine Einordnung nach relativen Wirkstärken. Die relative Potenz eines Umwelthormons wird ausgedrückt als das Verhältnis zwischen denjenigen Dosen der Test- und einer Referenzsubstanz (z.B. Östradiol), die denselben Effekt hervorrufen. In solchen *in vitro* Systemen identifizierte Stoffe lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen: natürliche Wirkstoffe (endogene Hormone, Phytoöstrogene und einige Mykotoxine) und Umweltchemikalien (synthetische Hormone und Industriechemikalien).

Der große Nachteil der *in vitro* Systeme besteht darin, daß sie keine Aussage über das Verhalten der Substanz im Gesamtorganismus erlauben. Genauere Abschätzungen des Risikopotentials von „endokrinen Disruptoren“ lassen sich anhand der üblichen Guideline-Testsysteme zur subakuten bzw. subchronischen Wirkung vornehmen; eine Wirkung auf den Nachwuchs kann nur anhand von Mehrgenerationenstudien festgestellt werden. Aufgrund der damit verbundenen hohen Kosten sind aussagekräftige Versuchsdaten nur zu wenigen Verbindungen vorhanden. Erschwerend kommt hinzu, daß für einige Verbindungen, wie beispielsweise Bisphenol A, ungewöhnliche Dosis-Wirkungskurven und Niedrigdosis-Effekte diskutiert werden (siehe Kapitel 2.5). Infolgedessen wurde bisher die östrogene Wirkung vieler verdächtiger Stoffe ausschließlich mit *in vitro* Systemen nachgewiesen. Um diese Daten auch ohne aufwendige Langzeitstudien in einen Kontext zu stellen und eine Abschätzung der Wirkung eines in einem *in vitro* Testsystem erkannten Umwelthormones im Körper machen zu können, bieten sich als Alternative toxikokinetische Untersuchungen über die Resorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung einer Substanz im Körper an.

Eine Übersicht der Substanzen (s. Tabelle 2.2), die auf das Hormonsystem wirken, zeigt, daß die östrogene Aktivität von Chemikalien nicht einfach anhand der Struktur abgelesen werden kann. Einerseits besitzen Verbindungen mit sehr diversen Strukturen hormonelle Wirkung (Östradiol, Zearalenon, DES, DDT, ...), andererseits kann die Aktivität von Verbindungen mit ähnlichen Strukturen sehr verschieden sein (o,p'-DDT verglichen mit p,p'-DDT).

Tab. 2.2: Relative Wirkstärken bezogen auf Östradiol.

Stoffgruppen	Verbindungen	relative Wirkstärken	
		rekomb. Hefezellen ¹	MCF-7 ²
<i>natürliche Steroidhormone</i>	17 β -Östradiol	100	100
	17 β -Östradiol-3(β -D-Glucuronid)	0,32	
	Testosteron	0,001	
	Cortisol	0	
	Progesteron	0	
<i>Synthetische Hormone</i>	17 α -Ethinylöstradiol	88,8	
	Diethylstilböstrol (DES)	74,3	
	Tamoxifen (Antiöstrogen)	0,0047	0,1 ³
<i>Pflanzeninhaltsstoffe</i>	Daidzein	0,0013	0,002
	Equol	0,085	0,01
	Genistein	0,049	0,1 ³
	Coumestrol	0,67	
<i>Mykotoxine</i>	Zearalenon	0,26	2,0 ³
<i>Industriechemikalien</i>	4-Nonylphenol	0,005	0,003
	p,p'-DDT	0,00003	
	o,p'-DDT	0,00011	0,012 ³
	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin	0,26	0,0 ³
	Methoxychlor	0,0033	
	2',4',6'-Trichloro-4-biphenylol	1,0	
	Bisphenol A	0,005	0,003
	Benzylbutylphthalat	0,0004	0,0003

¹ Coldham, N. G. *et al.*, 1997; ² Greim, H., 1998; ³ Zava, D. T. *et al.*, 1997

2.3 Bedeutung der Toxikokinetik für die Problematik

Wie für andere Xenobiotika wird auch das Ausmaß unerwünschter Wirkungen eines Umwelthormones durch Toxikokinetik und Toxikodynamik bestimmt. Die Toxikokinetik ist dabei ausschlaggebend für die Konzentration des Fremdstoffes am Wirkort, während die Toxikodynamik Wirkungsart und Wirkstärke (Potenz) bestimmt.

Unter Toxikokinetik versteht man im weiteren Sinne alle Vorgänge, die das Schicksal eines Fremdstoffes im Körper betreffen. Diese umfassen Resorption, Verteilung, metabolische Umwandlung (Biotransformation), Speicherung und Exkretion. Die letzten drei Vorgänge faßt man auch unter der Bezeichnung Elimination zusammen. Die wichtigsten Aspekte sind dabei die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Aufnahme eines Fremdstoffes, die Verteilung im Körper, der Umfang der Biotransformation und die Art der gebildeten Metabolite sowie die Geschwindigkeit der Ausscheidung.

Biotransformationsreaktionen lassen sich in Phase I- (Funktionalisierungsreaktionen, wie z.B. Oxidationen und Reduktionen) und Phase II-Reaktionen (Konjugationsreaktionen, wie Sulfatierung und Glucuronidierung) einteilen. Diese Reaktionen können zu einer metabolischen Aktivierung führen, aber auch zu einer Detoxifizierung des Fremdstoffes. Von besonderer Bedeutung ist dabei der „first pass effect“ bei Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt. Dabei wird ein Stoff über das vaskuläre System des Magen-Darm-Traktes direkt in die Leber transportiert, wo er sofort metabolisiert oder ausgeschieden wird und damit dem Körper nicht mehr zur Verfügung steht.

Die überwiegende Menge der Daten zu Umwelthormonen wurde in *in vitro* Untersuchungen zu Wirkungsart und -potenz gewonnen. Dabei haben Betrachtungen zur Toxikokinetik nur eine untergeordnete Rolle gespielt. Für eine Übertragung der Ergebnisse auf den intakten Organismus sind toxikokinetische Daten jedoch sehr wichtig. Eine Metabolisierung kann Stoffe entstehen lassen, deren Östrogenität erheblich von derjenigen der Muttersubstanz abweichen kann. Wird ein Umwelthormon beispielsweise in einem „first pass effect“ weitgehend konjugiert, steht nur ein Bruchteil der applizierten Dosis für eine eventuelle Wirkung am Wirkort zur Verfügung. Andererseits können im Zuge einer metabolischen „Giftung“ auch hormonell stärker wirksame Stoffe entstehen. Unterschiede können sich auch in der Toxikokinetik zwischen verschiedenen Spezies ergeben. So unterscheiden sich beispielsweise Darmflora oder Art der Metabolisierung zwischen Mensch und Ratte. Daher

wurde in dieser Arbeit die Toxikokinetik der folgenden Stoffe sowohl im Menschen als auch in der Ratte untersucht.

2.4 Daidzein – ein Vertreter der Gruppe der Phytoöstrogene

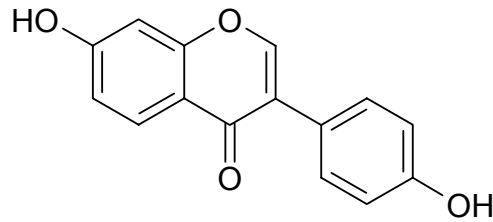


Abb. 2.2: Struktur von 7-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on (Daidzein).

2.4.1 Eigenschaften und Vorkommen

Daidzein (CAS-Nummer 486-66-8) lautet der Trivialname für ein Molekül, das nach IUPAC den systematischen Namen 7-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on trägt. Diese Verbindung gehört zu den natürlich vorkommenden pflanzlichen Verbindungen, die auf Basis ihrer strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit zu 17β -Östradiol sowie ihrer Eigenschaft, östrogene oder anti-östrogene Wirkungen in Tieren hervorzurufen, als Phytoöstrogene bezeichnet werden. Die Phytoöstrogene lassen sich grob in drei Klassen einteilen: in Isoflavone, Coumestane und Lignane. Sie kommen in einer Vielzahl von Pflanzen vor, z.B. in Hülsenfrüchten (hauptsächlich Isoflavone, z.B. Daidzein), in Futterpflanzen (vor allem Coumestane, z.B. Coumestrol) oder in Getreide, Früchten, Gemüse, Reis, Knoblauch und Hopfen (Lignane, z.B. Enterolacton). Die Isoflavone dienen der Pflanze unter anderem als Schutz vor Pilzbefall (Naim, M. *et al.*, 1974), als Pigmente (Clevenger, S., 1964) oder als Vorstufe zur Verholzung (Francis, C. M. und Hume, I. D., 1971). Zudem wird spekuliert, daß die Pflanzen im Laufe der Evolution diese Stoffe zur Abwehr von Pflanzenfressern entwickelt haben, um deren Reproduktionsfähigkeit über eine Beeinflussung des Hormonsystems einzuschränken (Hughes, C. L., Jr., 1988).

Kurz nach Einführung des ersten Testsystems auf östrogene Wirkung (Allen, E. und Doisy, E. A., 1923) wurde der erste Bericht über die östrogene Aktivität von Pflanzenextrakten veröffentlicht (Loewe, S. *et al.*, 1927). Biologische und wirtschaftliche Bedeutung erlangten von Pflanzen ausgehende hormonelle Effekte in den 1940ern, als es zu Zuchtproblemen in Schafen in West-Australien kam (Bennetts, H. W. *et al.*, 1946). Dieses als „Klee-Krankheit“

bezeichnete Syndrom war charakterisiert durch Zysten an den Eierstöcken, irreversible Endometriose sowie Unfruchtbarkeit und wurde dem Verzehr einer Kleesorte (*Trifolium subterraneum*) zugeschrieben, die hohe Konzentrationen an Isoflavonen enthält (Bradbury, R. B. und White, D. E., 1954).

2.4.2 Menschliche Belastung

Die Hauptquelle für eine Exposition des Menschen mit Pflanzenhormonen stellt die Nahrung dar. Die Mengen an Phytoöstrogenen, die der Mensch zu sich nimmt, hängen von der Art und Menge der konsumierten Lebensmittel ab (Dwyer, J. T. *et al.*, 1994). Der Gehalt der verschiedenen Phytoöstrogene in Lebensmitteln variiert stark. Sojaprodukte, die den größten Beitrag einer menschlichen Exposition gegen Daidzein liefern, enthalten viele Isoflavone, Alfalfa große Mengen an Coumestrol und Sellerie, Leinsamenöl und Zwiebeln viele Lignane und Flavonoide. Weiterhin hängt die Menge der in Lebensmitteln enthaltenen Phytoöstrogene von Faktoren wie Anbauart, Lagerung und Weiterverarbeitung der Pflanzen ab. Insgesamt kann die tägliche Aufnahme von Phytoöstrogenen erheblich schwanken. So nimmt man an, daß die Isoflavon-Aufnahme in Japan etwa dreißig mal höher ist als in Großbritannien (Cassidy, A. *et al.*, 1994a; Messina, M., 1995) und bei etwa 20–150 mg pro Tag mit einem Mittelwert von 40 mg/Tag liegt (Kelly, G., 1993).

In zunehmendem Maße bewirken die auch in den Medien diskutierten gesundheitsfördernden Eigenschaften der Phytoöstrogene eine Vermarktung verschiedenster Gesundheitsergänzungen und Getränke auf Sojabasis; zudem wurde die Gabe von Isoflavonextrakten als „natürliche“ Hormonersatztherapie vorgeschlagen und entsprechende Produkte auf den Markt gebracht (Bingham, S. A. *et al.*, 1998). Diese Produkte tragen zu einer zusätzlichen Exposition zumindest bestimmter Subpopulationen bei. Eine weitere Expositionsquelle, gerade in den USA, stellt Säuglingsnahrung auf Sojabasis dar, die zwischen 50 und 80 mg/kg Daidzein enthält (Przyrembel, H., 1998; Setchell, K. D. *et al.*, 1997).

2.4.3 Metabolismus und Toxizität

Daidzein ist eine chemische Verbindung mit sehr geringer akuter Toxizität, die im bakteriellen Mutagenitätstest kein genotoxisches Potential erkennen läßt (Bartholomew, R. M. und Ryan, D. S., 1980).

Wie Abbildung 3 zeigt, werden die in Pflanzen enthaltenen Vorstufen Daidzin (Daidzein-Glykosid, chemischer Name 7-(β -D-Glucopyranosyloxy)-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on) und Formonetin (Daidzein-Methyl-Ether) im Dünndarm zum Aglykon gespalten; Daidzein selbst kann über die Zwischenstufe Dihydrodaidzein zu Equol metabolisiert werden und unter Ringöffnung zu 1-(2,4-Dihydroxyphenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-1-propanon, das unter dem Trivialnamen *O*-Desmethylangolensin (*O*-DMA) bekannt ist, abgebaut werden (Axelson, M. *et al.*, 1984; Joannou, G. E. *et al.*, 1995). Die Pharmakokinetik der Phytoöstrogene ist komplex. Aufgenommene Pflanzenhormone oder ihre Metabolite durchlaufen einen enterohepatischen Kreislauf (Ausscheidung der Glucuronide aus der Leber in die Gallenflüssigkeit, gefolgt von Dekonjugation durch Darmbakterien, Rückresorption und erneute Konjugation in der Leber) und werden letztlich mit dem Urin ausgeschieden (Adlercreutz, H. *et al.*, 1986). Beträchtliche interindividuelle Unterschiede an Isoflavongehalten in verschiedenen physiologischen Matrices wurden nach Gabe einer kontrollierten Menge Soja gefunden (Kelly, G. E. *et al.*, 1995). Dies konnte auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Darmflora sowie eine daraus resultierende unterschiedlich stark ausgeprägte Metabolisierungsfähigkeit zurückgeführt werden (Moore, W. E. und Moore, L. H., 1995; Setchell, K. D. *et al.*, 1984). Da der Isoflavonmetabolismus hauptsächlich von der Darmflora bestimmt wird, wirken sich neben dem Geschlecht auch eine eventuelle Einnahme von Antibiotika oder eine Diarrhoe direkt auf diesen aus.

Mit der Nahrung aufgenommenes Daidzein durchläuft bakterielle Umwandlungen im Gastrointestinaltrakt (Setchell, K. D. *et al.*, 1987; Setchell, K. D. *et al.*, 1984); sowohl in Labortieren als auch im Menschen konnte Equol als Metabolit im Urin nachgewiesen werden. Daneben entstanden hauptsächlich Glucuronid- und Sulfatkonjugate sowie geringe Mengen *O*-DMA; freies Daidzein selbst wurde in Mengen von 1-5 % der gegebenen Dosis im Urin wiedergefunden (Adlercreutz, H. *et al.*, 1986 ; Bannwart, C. *et al.*, 1984; Chang, H. H. *et al.*, 1975; Morton, M. S. *et al.*, 1997 ; Yueh, T. L. und Chu, H. Y., 1977). Über die Entstehung zahlreicher weiterer diphenolischer Metabolite wie beispielsweise Dihydrodaidzein, Hydroxy-*O*-DMA oder Dehydro-*O*-DMA im Urin von Probanden nach wiederholter Gabe von

Sojamehl wurde berichtet, wobei jedoch quantitative Angaben fehlen (Kelly, G. E. *et al.*, 1993; Joannou, G. E. *et al.*, 1995).

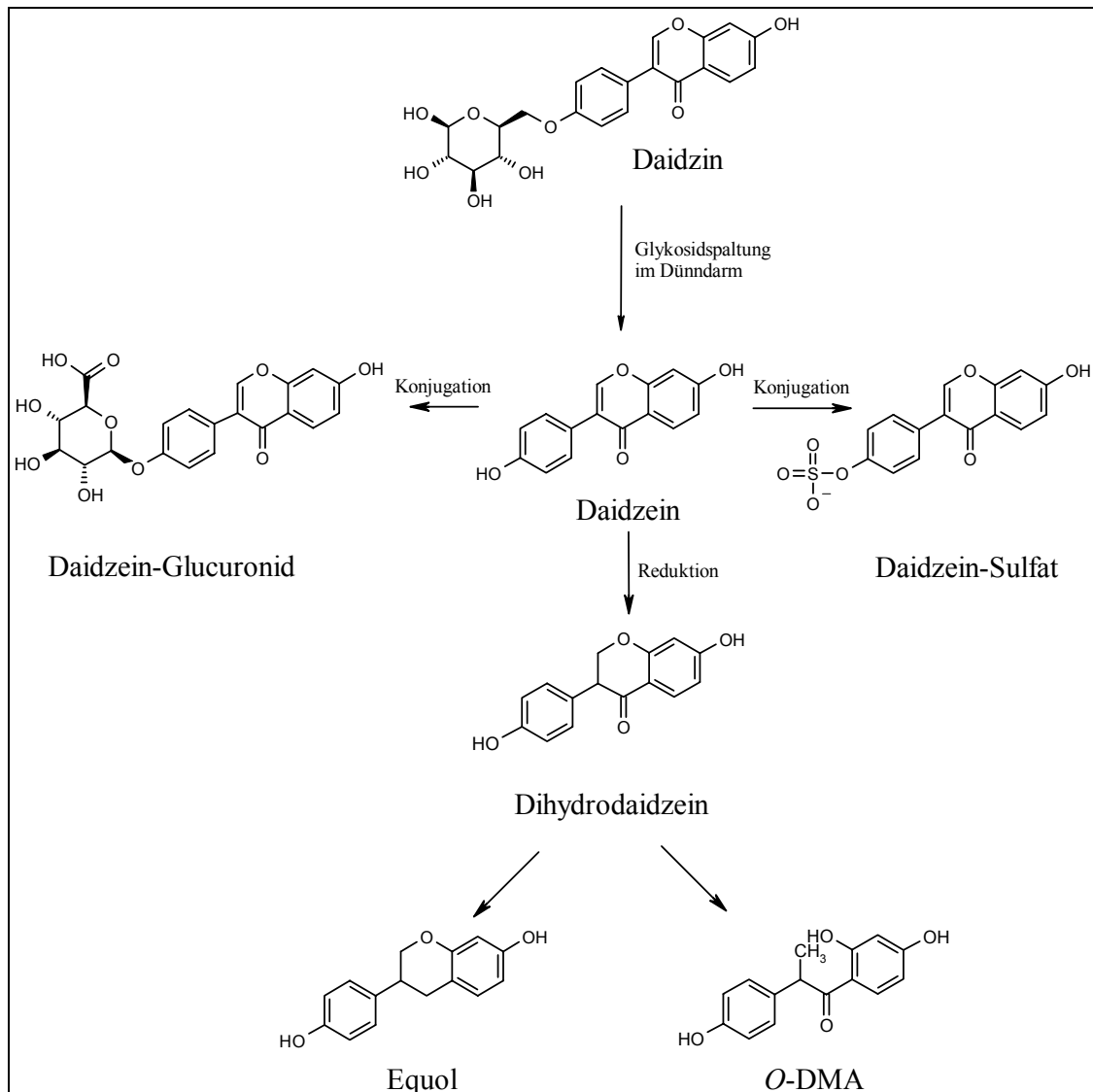


Abb. 2.3: Schematische Übersicht über den Daidzein-Metabolismus.

Unkonjugierte Isoflavone werden in der Ratte schnell aus dem oberen Dünndarm resorbiert (Sfakianos, J. *et al.*, 1997), während die glykosidischen Konjugate wegen ihrer erst noch zu erfolgenden Hydrolyse in tieferen Darmabschnitten langsamer resorbiert werden (King, R. A. und Bursill, D. B., 1998). Nach ihrer Resorption erfolgt eine schnelle Umwandlung zu den entsprechenden β -Glucuroniden (Sfakianos, J. *et al.*, 1997) und Sulfatestern (Yasuda, T. *et al.*, 1994). Die Frage der biologischen Aktivität der Konjugate ist noch nicht geklärt.

Nach Gabe von Sojamehl an Probanden wurde im Urin eine variable Anzahl und Menge an Metaboliten gefunden, wobei die größten Schwankungen in der Menge des ausgeschiedenen

Equols auftraten; die maximale Urinkonzentration wurde während der ersten zwölf Stunden erreicht, nach ca. 24 h erreichten die Daidzein-Werte wieder Hintergrundhöhe, während die Equol-Werte noch etwa zwölf Stunden länger erhöht blieben (Kelly, G. E. *et al.*, 1995; Xu, X. *et al.*, 1994). Zudem waren nicht alle Menschen in der Lage, Equol zu bilden. In verschiedenen Studien wurde geschätzt, daß etwa ein Drittel der Probanden kein Equol ausscheidet (Setchell, K. D. *et al.*, 1984; Morton, M. S. *et al.*, 1994).

Die Bioverfügbarkeit der in Soja enthaltenen Isoflavone ist wie beschrieben abhängig von der Darmflora (Xu, X. *et al.*, 1995). In Studien nach einmaliger, oraler Gabe von Soja erfolgt die Ausscheidung mit dem Urin ohne Geschlechtsunterschied größtenteils sehr schnell innerhalb von 24 h (Kirkman, L. M. *et al.*, 1995). In allen bislang durchgeführten Studien konnten nicht mehr als 30 Prozent der gegebenen Dosis in Urin und Plasma sowohl von Menschen als auch von Ratten wiedergefunden werden (Franke, A. A. und Custer, L. J., 1994; Xu, X. *et al.*, 1994; King, R. A. *et al.*, 1996).

2.4.4 Epidemiologische Befunde zur hormonellen Wirkung

Die biologischen Effekte der Phytoöstrogene auf die Fortpflanzungsfähigkeit wurden in vielen Tierarten (u.a. in Nutztvieh, Mäusen, Kaninchen, Schafen und Wachteln) untersucht. Die Effekte in Labortieren waren konsistent eine verringerte Fertilität, die in weiblichen Tieren ausgeprägter auftrat, und Fehlbildungen im weiblichem Nachwuchs von exponierten Tieren (Burroughs, C. D. *et al.*, 1990a; Chapin, R. E. *et al.*, 1996). Weitere Zielorte für die unerwünschte Wirkung von Pflanzenhormonen sind Zervix, Eierstöcke, Hypophyse und zentrales Nervensystem (Kaldas, R. S. und Hughes, C. L., Jr., 1989). Das Auftreten solcher Effekte in Tieren ruft Bedenken über mögliche negative Auswirkungen der Aufnahme von Phytoöstrogenen für den Menschen hervor. Andererseits gibt es beachtliche epidemiologische Daten zur positiven Wirkung auf die Gesundheit zumindest des Erwachsenen. Dies betrifft insbesondere die schützende Wirkung gegen mehrere der üblichen hormonabhängigen Krankheiten wie Brustkrebs, Endometriums- und Prostatabeschwerden, Darm-, Magen- und Lungenkrebs sowie gegen einige nicht-neoplastische Krankheiten wie Osteoporose, Menopausensyndrom und Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

Da keines der Phytoöstrogene eine annähernd starke Rezeptoraffinität zu einem der Östrogenrezeptoren hat wie Östradiol und da die Induktion bzw. Repression der Proteinbiosynthese ebenfalls bedeutend geringer erscheint (Setchell, K. D., 1985), können Phytoöstrogene sowohl eine östrogene als auch eine anti-östrogene Wirkung entfalten. In einem Individuum mit relativ niedrigen Östrogenspiegeln kann eine Rezeptorbelegung schon durch relativ

schwache (exogene) Hormone einen östrogenen Effekt bewirken, während im „normalen“ Menschen große Mengen an Umwelthormonen die effektive östrogene Aktivität durch Konkurrenz und Blockierung des Rezeptors für körpereigene Hormone verringern können (Kaldas, R. S. und Hughes, C. L., Jr., 1989).

Interessant ist zudem, daß sich die relative Bindungsaffinität von Daidzein zu den inzwischen bekannten zwei Östrogenrezeptoren deutlich unterscheidet. Diese ist größer für den erst 1996 entdeckten Östrogenrezeptor ER β (Kuiper, G. G. *et al.*, 1998), der der vorherrschende Typus in Hirn, Thymus, Blase, Prostata, Knochen und Lunge ist. Dieser Unterschied in den Bindungsaffinitäten könnte vorhandene Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen von in unterschiedlichen Geweben durchgeführten *in vitro* Versuchen zumindest teilweise erklären.

Kurze Übersicht über die Wirkungen von Phytoöstrogenen im Körper

a) Positive Auswirkungen auf die Gesundheit

Isoflavone haben antikanzerogene Wirkung *in vitro* und hemmen die Angiogenese (Fotsis, T. *et al.*, 1993). Weitere Effekte umfassen Inhibition der Aromatase (Adlercreutz, H. *et al.*, 1993a; Campbell, D. R. und Kurzer, M. S., 1993), Stimulation der Synthese von „Sex Hormone Binding Globulin“ (SHBG) (Adlercreutz, H., 1995; Mousavi, Y. und Adlercreutz, H., 1993), anti-oxidative Eigenschaften (Wiebe, V. J. *et al.*, 1993) und digitalisähnliche Aktivität (Braquet, P. *et al.*, 1986).

Isoflavone zeigen zusätzlich auch *in vivo* antikanzerogene Wirkungen. So weisen Labortiere, die mit einer sojareichen Diät gefüttert werden, nach chemischer Tumorinduktion signifikant erniedrigte Brusttumorraten auf (Messina, M. J. *et al.*, 1994).

Im Menschen weisen Vergleiche der Krebsinzidenzen zwischen Asien und westlichen Ländern mit der jeweiligen Nahrungszusammensetzung auf eine schützende Funktion der Phytoöstrogene hin. Mehrere epidemiologischen Studien zeigen eine negative Korrelation der hormonabhängigen Krebsarten wie Brust-, Eierstock-, Prostata- und Darmkrebs mit der Menge der aufgenommenen Phytoöstrogene. Ebenfalls kann ein Zusammenhang zwischen der Ausscheidung von Isoflavonen mit dem Urin und einem verringerten Brustkrebsrisiko gezeigt werden (Rose, D. P. *et al.*, 1986; Ingram, D. *et al.*, 1997). Bei japanischen Frauen, die viel Soja zu sich nehmen, ist häufig eine Zyklusverlängerung zu beobachten (Henderson, B. E. *et*

al., 1985). Dies wird ebenfalls als vor Brustkrebs schützend betrachtet, da das Brustkrebsrisiko mit zunehmender Zyklusdauer abnimmt (Wu, A. H. *et al.*, 1996).

Weiterhin wird die Tatsache, daß Japanerinnen weitaus seltener als westliche Frauen unter Hitzewallungen leiden, auf die Aufnahme großer Mengen an Phytoöstrogenen zurückgeführt (Lock, M., 1986). Auch vor kardiovaskulären Erkrankungen sollen in Soja enthaltene Phytoöstrogene schützen (Adlercreutz, H., 1990).

b) Negative Auswirkungen auf die Gesundheit

Verschiedene Tierstudien sowie Beobachtungen bei Nutztieren haben gezeigt, daß eine Aufnahme von hohen Dosen während kritischer Zeiträume der Entwicklung zu Reproduktionsstörungen und Fehlbildungen führen kann. (Burroughs, C. D. *et al.*, 1990b; Strauss, L. *et al.*, 1998). Hauptsächlich die Erkenntnis, daß Phytoöstrogene Infertilität in einigen Tierarten verursachen können, hat zu Bedenken geführt, was die Aufnahme von Sojaprodukten und den darin enthaltenen Isoflavonen bei Kleinkindern angeht. Bei Gabe einer handelsüblichen Sojameschung nehmen Säuglinge etwa 3 mg/kg Körpergewicht und Tag Isoflavone (Daidzein und Genistein) zu sich. In einer Studie konnten im Urin 2,9 mg/L Daidzein sowie 1,5 mg/L Genistein wiedergefunden werden. Die durchschnittliche Wiederfindung der täglichen, oralen Aufnahme betrug 38 % bzw. 13 % (Irvine, C. H. *et al.*, 1998). Plasmaspiegel bei 4 Monate alten, auf Sojabasis ernährten Säuglingen lagen bei ca. 1,2 µmol/L (Setchell, K. D. *et al.*, 1997). Diese Zahlen zeigen, daß Isoflavone von Säuglingen gut resorbiert werden. Ein Vergleich mit Studien an Erwachsenen zeigt, daß die Isoflavonzufuhr über Sojanahrung bei Kleinkindern bezogen auf das Körpergewicht sechs- bis elfmal höher ist als die Menge, die bei Frauen zu Zyklusveränderungen führen kann (Cassidy, A. *et al.*, 1994b). Im Säugling wurden Plasmaspiegel gemessen, die höher als bei westlichen Erwachsenen nach Zufuhr vergleichbarer Isoflavonmengen und auch höher als bei Japanern mit hohem Sojaverbrauch (Coward, L. *et al.*, 1996; Adlercreutz, H. *et al.*, 1993b) waren. Die Plasmaspiegel lagen bis zu 10-20 000fach über den Östradiolspiegeln (40-80 pg/mL), die im frühen Säuglingsalter gemessen wurden (Setchell, K. D. *et al.*, 1997).

Ein weiteres gesundheitliches Risiko besteht darin, daß bei unzureichender Jodzufuhr eine sehr hohe kontinuierliche Isoflavonzufuhr zunächst zu einer Hypothyreose führen kann, da dann bevorzugt jodierte Isoflavone gebildet werden. Die erhöhte Sekretion von schildrüsenstimulierendem Hormon (TSH) könnte anschließend folliculäre Hyperplasie und Tumorbildung zur Folge haben (Divi, R. L. *et al.*, 1997).

2.5 Bisphenol A – ein Vertreter der Gruppe der Xenoöstrogene

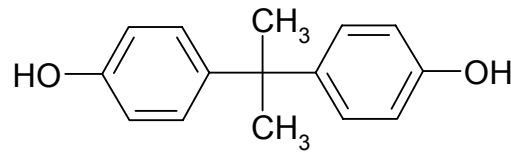


Abb. 2.4: Struktur von 2,2-(4,4'-dihydroxydiphenyl)-propan (Bisphenol A).

2.5.1 Eigenschaften und Verwendung

Bisphenole besitzen seit 1945 eine bis heute stetig wachsende Bedeutung in der Kunststoffherstellung. Bisphenol A (BPA) ist die mit Abstand wichtigste Verbindung dieser Substanzklasse. Bisphenol A (CAS-Nr. 85-05-7) ist der Trivialname für 2,2-(4,4'-dihydroxydiphenyl)-propan, vor allem im englischen Sprachgebrauch auch häufig 4,4'-Isopropylidendiphenol genannt. Es ist ein weißer, kristalliner Feststoff mit leicht phenolischem Geruch, der bei 150-155 °C schmilzt und in Wasser kaum löslich (Löslichkeit 120 mg/L) ist (HSDB, 2000). Hergestellt wird BPA bei hohen Temperaturen aus Phenol, Aceton und Chlorwasserstoffgas in Gegenwart von Katalysatoren. Im Jahre 1997/98 wurden in der EU 640 kt BPA hergestellt, für Deutschland wurde im selben Zeitraum eine Jahresproduktion von 260 kt angegeben (Eur.Chem.News, 1999); in Europa werden ca. 30 % der Weltproduktion hergestellt (Schaefer, W. R. *et al.*, 1996). BPA dient überwiegend als Monomer zur Herstellung von Polycarbonat (ca. 50 % der Weltproduktion) und Epoxidharzen (ca. 40 % der Weltproduktion). Der Rest verteilt sich auf eine breite Palette von Anwendungen. Kunststoffe, die BPA enthalten, werden zur Verpackung von Lebensmitteln eingesetzt (z.B. Saugflaschen für Kleinkinder, Plastikdosen, Beschichtungen von Konservendosen) und finden auch in der Zahnbehandlung als Bestandteil amalgamfreier Zahnfüllungen Verwendung.

2.5.2 Menschliche Belastung

Der Mensch kann auf verschiedene Weise gegen Bisphenol A exponiert werden. So wurden im Jahre 1993 von den Herstellerfirmen ca. 109 t als in die Umwelt (Luft, Wasser oder Abwasser) entwichen gemeldet (Staples, C. A. *et al.*, 1998). Industriearbeiter werden bei Herstellung, Verwendung und Transport von BPA sowohl nach Inhalation als auch durch dermalen Kontakt belastet.

Für die Allgemeinbevölkerung am bedeutendsten und Ursache der jüngsten Kontroverse ist die Exposition über die Nahrung sowie das Herauslösen von BPA aus Zahnfüllungen. Aus Konservendosenbeschichtungen, Kunststoffutensilien und manchen Zahnfüllungen kann beim Erhitzen Bisphenol A abgegeben werden (Brotons, J. A. *et al.*, 1995; Krishnan, A. V. *et al.*, 1993). Bisher wurde dieser Umstand wegen der geringen akuten Toxizität von BPA toleriert. Im Zuge der Diskussion über die hormonelle Wirkung von Bisphenol A und wegen vermuteter inverser Dosis-Wirkungsbeziehungen sowie sogenannter „low-dose effects“ wurden verschiedenste Materialien auf eine östrogene Wirkung durch freigesetztes BPA untersucht. Nachdem unerwartete östrogene Effekte bei Untersuchungen in Zellkulturen auf Verunreinigungen des verwendeten destillierten Wassers mit Bisphenol A, die aus Polycarbonatgefäßen stammten, zurückgeführt werden konnten (Krishnan, A. V. *et al.*, 1993), untersuchten Brotons, J. A. *et al.*, 1995 die Belastung von Nahrungsmitteln mit BPA, die sich aus dem Herauslösen von BPA aus epoxidbeschichteten Dosen ergibt. Sie fanden einen Wert von 80 µg BPA pro kg Dosennahrung, was eine „worst-case“-Belastung des Menschen von ca. 1 µg/kg Körpergewicht pro Tag bedeuten würde.

Eine von der Society of the Plastics Industry, Inc. (SPI) durchgeführte Studie untersuchte das Migrationsverhalten von BPA aus Polycarbonat unter Testbedingungen, die von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für Lebensmittel- und Bierbehältnisse empfohlen werden (Howe, S. R. und Borodinsky, L., 1998). Als Ergebnis der Studie konnte keine meßbare Migration von BPA festgestellt werden (Nachweisgrenze 5ppb). Kawamura, Y. *et al.*, 1998, konnten unter alltagsüblichen Bedingungen ebenfalls keine BPA-Migration aus Polycarbonat-Babyflaschen entdecken (Nachweisgrenze 0,5 ppb). Unter Verwendung dieser Ergebnisse errechnet die SPI eine geschätzte tägliche Aufnahme von BPA aus Polycarbonatbehältnissen von weniger als 0,0125 µg/kg Körpergewicht pro Tag. Eine ebenfalls von der SPI durchgeführte Studie zur Migration von BPA aus verschiedenen Epoxid-Beschichtungen in Nahrungsmitteln ergab eine geschätzte tägliche Aufnahme von BPA mit der Nahrung von weniger als 0,105 µg/kg Körpergewicht pro Tag.

Eine Forschergruppe der Universität von Granada in Spanien entdeckte eine hormonelle Aktivität im Speichel von Patienten, die zuvor mit Zahnfüllungen auf Kunststoffbasis behandelt worden waren, und führte diese auf ein Vorhandensein von Bisphenol A und verwandten Verbindungen zurück (Olea, N. *et al.*, 1996).

Die maximal akzeptable tägliche Dosis für BPA wurde von der amerikanischen Umweltbehörde EPA auf 50 µg/kg Körpergewicht (EPA, 1997) festgelegt; der Wissen-

schaftliche Lebensmittelausschuß in Deutschland geht ebenfalls von einem TDI-Wert (*tolerable daily intake*) von 50 µg/kg Körpergewicht aus und schätzt die Exposition des Verbrauchers im ungünstigsten Fall auf 1 µg/kg Körpergewicht (Boehme, C., 1998).

2.5.3 Metabolismus und Toxizität

Die akute Toxizität von Bisphenol A ist gering ($LD_{50} = 3300-4100$ mg/kg in der Ratte), es liegen keine Hinweise auf eine krebserzeugende Wirkung vor. Verschiedene Mutagenitätstests verliefen ebenfalls negativ (HSDB, 2000).

Zum Metabolismus von Bisphenol A liegt nur eine Studie aus den sechzigern Jahren vor, die die Biotransformation in Ratten nach einmaliger Gabe von 800 mg/kg Körpergewicht untersucht hat (Knaak, J. B. und Sullivan, L. J., 1966). Dazu wurde BPA mit ^{14}C markiert und die Radioaktivität über acht Tage in regelmäßigen Zeitabständen in Urin, Faeces, Atemluft und nach Ende des Versuchs in Gewebe bestimmt. Bei Versuchsende waren durchschnittlich 30 % mit dem Urin und ca. 90 % in Urin und Faeces zusammen ausgeschieden worden, wobei die Ausscheidung bereits nach 48 h fast vollständig war. Freies Bisphenol A in Urin betrug etwa 1 %, der Rest lag in Form von Glucuronid- und Sulfatkonjugaten vor; in den Faeces wurden etwa 19 % freies Bisphenol A gefunden, der Rest in Form von Konjugaten und einem Metaboliten (ebenfalls ca. 19 %), der von den Autoren als „Hydroxy-Bisphenol A“ bezeichnet, aber dessen Struktur nicht näher untersucht wurde.

2.5.4 Hormonelle Wirkung

Die östrogene Aktivität von Bisphenol A ist schon länger bekannt. Der früheste Nachweis wurde 1936 in ovariectomisierten Ratten erbracht, die an drei aufeinanderfolgenden Tagen zweimal täglich 100 mg BPA (suspendiert in Sesamöl) verabreicht bekamen (Dodds, E. C. und Lawson, W., 1936).

Eine spätere, umfangreichere Studie in noch nicht geschlechtsreifen Ratten bestimmte die östrogene Aktivität 18 h nach einmaliger, subkutaner Gabe anhand einer Messung des Glykogengehaltes des Uterus (Bitman, J. und Cecil, H., 1970). Die minimale effektive Dosis von BPA lag bei 0,25 mg je Ratte (etwa 5 mg/kg/Tag).

Ähnliche Studien wurden vom National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) der USA in Ratten durchgeführt (Bond, G. P. *et al.*, 1980). In diesen Studien wurde BPA intraperitoneal (50-130 mg/kg), oral (1250 mg/kg), dermal (8000 mg/kg) und per inhalationem (156 mg/m³ über 6 Stunden) an ovariectomisierte Ratten appliziert und die

östrogene Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten anhand einer Änderung des Wassergehaltes des Urins gemessen.

Aktuelle *in vitro* Studien haben gezeigt, daß die östrogene Potenz von Bisphenol A etwa 20.000 mal geringer ist als die von Östradiol (s. Tabelle 2), wobei im Gegensatz zu Daidzein die relative Bindungsaffinität zu beiden Östrogenrezeptoren gleichermaßen ausgeprägt ist (Safe, S. *et al.*, 1998).

Darüberhinaus wurden mit Bisphenol A mehrere Untersuchungen zur Reproduktions- und Entwicklungstoxizität an Mäusen und Ratten durchgeführt, in denen bei hohen, maternal-toxischen Dosen eine Veränderung verschiedener Parameter beobachtet wurde, wie z.B. eine Verringerung des Gewichtes der Reproduktionsorgane sowie eine verringerte Motilität und Konzentration der Spermien der männlichen Nachkommen. Bei einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht und darunter traten diese Wirkungen jedoch nicht auf (Hardin, B. D. *et al.*, 1981; George, J. D. *et al.*, 1985b; George, J. D. *et al.*, 1985a; Reel, J. R. *et al.*, 1985; Morrissey, R. E. *et al.*, 1987).

Eine 1997 veröffentlichte *in vivo* Studie hingegen fand Effekte bereits nach Gabe sehr niedriger Dosen Bisphenol A (2 und 20 µg/kg Körpergewicht/Tag) an trächtige Mäuse. Bei den männlichen Nachkommen wurde in dieser Studie bei niedrigen Dosen eine Zunahme der Prostatagewichte, bei höheren Dosen dagegen eine Abnahme der Gewichte beobachtet (vom Saal, F. S. *et al.*, 1997). Angesichts der oben genannten, mehrere Zehnerpotenzen höher liegenden Wirkschwellen in etablierten Reproduktionstoxizitätstests ist diese Dosis-Wirkungs-Beziehung in Form eines umgekehrten U's (*engl.* inverted U-shape) in der Fachwelt umstritten.

3 Aufgabenstellung

Die Wahrscheinlichkeit des Eintritts eines Gesundheitsschadens nach Exposition gegen einen Stoff ist abhängig von der aufgenommenen Dosis, der dem Stoff eigenen Wirkungsstärke und der Dosis- und Zeitabhängigkeit dieser Wirkungen. Für eine Bewertung möglicher Schädwirkungen von Fremdstoffen mit östrogenen Wirkungen ist die Östrogenität eines Stoffes (Wirkstärke) alleine noch nicht ausreichend. Neben der Affinität des exogenen Hormons für den entsprechenden Rezeptor bestimmt die Konzentration des Stoffes in der Umgebung des Rezeptors maßgeblich die Wirkstärke. Diese Konzentration ist abhängig vom Ausmaß der Exposition und toxikokinetischen Parametern des Stoffes wie Bioverfügbarkeit, Verteilung, Biotransformation und Ausscheidung.

Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung der Biotransformation und Toxikokinetik je eines Phyto- und Xenoöstrogens in Ratte und Mensch. Dazu sollten Methoden zur Quantifizierung von Daidzein und Bisphenol A oder deren Metaboliten in Plasma und Urin entwickelt werden. Anhand der Ergebnisse sollte ein Beitrag zur Risikoabschätzung geleistet werden.

Aus der Gruppe der Phytoöstrogene wurde Daidzein als wichtiger Vertreter, der in hohen Konzentrationen in vielen Nutzpflanzen und Nahrungsmitteln vorkommt, ausgewählt. Die Wahl des gut untersuchten Daidzeins als „Referenzsubstanz“ sollte eine Einordnung der für Bisphenol A erhaltenen Ergebnisse ermöglichen und anhand eines Vergleichs mit Literaturdaten zugleich eine Überprüfung der entwickelten Methoden erlauben. Zudem waren zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeit keine Studien zur Toxikokinetik im intakten Organismus nach alleiniger Gabe des Aglykons (anstatt der Gabe in Form von Soja, das neben Daidzein noch andere Inhaltsstoffe enthält) bekannt.

Bisphenol A wurde als Vertreter der Xenoöstrogene gewählt, da es - was Weltjahresproduktion und Verwendung angeht - die wohl wichtigste Substanz dieser Gruppe darstellt und durch Publikationen zu angeblichen „low-dose-effects“ (vom Saal, F. S. *et al.*, 1997) in der Diskussion stand. Zu dieser Substanz wurden bisher noch keinerlei toxikokinetischen Untersuchungen im Menschen durchgeführt. Kenntnisse darüber wären jedoch zur Beurteilung eventueller Risiken für den Menschen von besonderer Bedeutung, da eine Extrapolation vom Tier auf den Menschen aufgrund der inhärenten Speziesunterschiede immer fehlerbehaftet bleiben muß.

Im ersten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, welche Metaboliten die beiden Verbindungen nach oraler Gabe *in vivo* in der Ratte bilden und mit dem Urin ausscheiden. Die Identifizierung erfolgte mit HPLC/UV, GC/MS und LC/MS/MS. Im zweiten Teil der Arbeit sollten zunächst empfindliche GC/MS-Methoden nach Derivatisierung zur Quantifizierung der im ersten Teil gefundenen Metabolite in Blut und Urin entwickelt werden. Danach sollte eine orale Exposition freiwilliger Probanden gegen Daidzein bzw. d₁₆-Bisphenol A stattfinden. Ziel war es dabei, einen Vergleich der Biotransformation zwischen Ratte und Mensch zu erhalten und die Eliminationskinetik der Stoffe aus Blut und Urin zu bestimmen.

Mit den erhaltenen Daten zur Toxikokinetik sollte eine verbesserte Extrapolation der Daten aus Tierstudien auf den Menschen ermöglicht und somit Aussagen über die Relevanz für den Menschen erleichtert werden. Die Ergebnisse sollten zudem bei der Interpretation der Daten zur hormonellen Wirksamkeit der Verbindungen helfen und einen Beitrag zur Risikoabschätzung liefern. In Kombination mit Literaturdaten zur relativen östrogenen Potenz und durch einen Vergleich mit der „Belastung“ durch endogene Östrogene sollte eine Aussage über den zu erwartenden Einfluß der beiden Stoffe auf das Hormonsystem des Menschen gemacht werden.

Im Rahmen eines vom Umweltbundesamt geförderten Forschungsvorhabens (F & E Vorhaben 297 61 001/06) sollten die toxikokinetischen Daten zudem im Verbund mit Ergebnissen zu Ausmaß der Bindungen der untersuchten Stoffe sowie der identifizierten Metabolite an den Östrogenrezeptor *in vitro* (durchgeführt im Rahmen einer Dissertation von Elmar Schmitt, ebenfalls Institut für Toxikologie, Würzburg) die Entwicklung eines physiologisch-toxikokinetischen-toxikodynamischen Lebenszeitmodells ermöglichen (Arbeitsgruppe um Filser, GSF, München). Dieses soll stoffspezifische und physiologische Daten in Abhängigkeit vom Lebensalter berücksichtigen und später auch auf andere Stoffe und Belastungsszenarien unter Berücksichtigung der relevanten Stoffparameter angewendet werden.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Chemikalien

4.1.1 Käufliche Chemikalien

Folgende in der Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den genannten Firmen im höchstmöglichen Reinheitsgrad bezogen:

Aceton (Sigma-Aldrich, Deisenhofen); Acetonitril p.a. (Roth, Karlsruhe); Acetonitril trocken (Merck, Darmstadt); Bortrifluorid Diethyletherat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen); Chloroform (Fluka, Buchs, CH); Daidzein (Sigma-Aldrich, Deisenhofen); Diethylether (Fluka, Buchs, CH); Dimethylformamid (Sigma-Aldrich, Deisenhofen); Eisensulfat Heptahydrat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen); Eisessig (Merck, Darmstadt); Essigsäure (Sigma-Aldrich, Deisenhofen); Ethylacetat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen); Flavon (Aldrich, Steinheim); β -Glucuronidase von *Helix pomatia* Typ HP-2 (Sigma, Steinheim); Hexamethyldisilazan (Fluka, Buchs, CH); n-Hexan (Fluka, Buchs, CH); 4-Hydroxy-Phenylelessigsäure (z.B. Fa. Fluka, Buchs); Bis-(4-hydroxyphenyl)-methan (Aldrich, Steinheim); 2,2'-Bis-(4-hydroxyphenyl)-propan (Aldrich, Steinheim); 2,2'-Bis-(4-hydroxyphenyl)-propan-d₁₆ (Aldrich, Milwaukee, WI, USA); Kaliumphosphat (Merck, Darmstadt); Katechol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen); Magnesiumsulfat (Aldrich, Steinheim); Maiskeimöl „Mazola“[®] (Maizena, Heilbronn); Methanol (Fluka, Buchs, CH); Methansulfonsäurechlorid (Sigma-Aldrich, Deisenhofen); N-Methyl-bis-trifluoracetamid (Fluka, Buchs, CH); Natriumacetat (Roth, Karlsruhe); Natriumcarbonat (Sigma-Aldrich, Deisenhofen); Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt); Natriumphosphat (Merck, Darmstadt); Nikotinamid Adenine Dinucleotid Phosphat, NADPH (Sigma-Aldrich, Deisenhofen); Perchlorsäure (Merck, Darmstadt); Phenol (Fluka, Buchs, CH); Phosphorpentoxid (Sigma-Aldrich, Deisenhofen); 2-Propanol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen); Pyridin (Merck, Darmstadt); Resorcin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen); Salzsäure 37 % (Merck, Darmstadt); konzentrierte Schwefelsäure (Sigma-Aldrich, Deisenhofen); Trifluoressigsäure (Fluka, Buchs, CH); Trimethylchlorsilan (Fluka, Buchs, CH); Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (Merck, Darmstadt); N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (Sigma, Deisenhofen); Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt)

4.1.2 Syntheschemikalien

Folgende Verbindungen wurden selbst hergestellt und charakterisiert:

- Daidzein (zur Methodenentwicklung)
- Hydroxy-Bisphenol A

Folgende nicht selbsthergestellten Verbindungen wurden für die Arbeit eingesetzt und von anderen Mitarbeitern des Arbeitskreises synthetisiert und charakterisiert:

- Equol (Bayer, T. *et al.*, 2001)
- O-DMA (Bayer, T. *et al.*, 2001)

4.2 Instrumentelle Analytik

4.2.1 Massenspektrometrie

4.2.1.1 Massenspektrometrie gekoppelt mit Gaschromatographie (GC/MS)

Messungen zur Aufklärung der Biotransformation sowie verschiedene Quantifizierungen aus Blut- und Urinproben erfolgten durch Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC/MS) unter den folgenden Bedingungen. Es sind nur die Parameter angegeben, die bei allen Messungen gleich waren, die restlichen Parameter, insbesondere die gemessenen Massen im Single-Ion-Monitoring (SIM)-Modus, sind bei den einzelnen Quantifizierungen beschrieben.

- GC/MS-System A:
MD 800 Massenspektrometer gekoppelt mit einem Carlo Erba 8000 Series Gaschromatographen und einem AS 800 Autosampler (Fisons, Mainz)
- GC/MS-System B:
Hewlett Packard 5973 Mass Selective Detector (MSD) gekoppelt mit einem Hewlett Packard 6890 Series Gaschromatographen (Hewlett Packard, Waldbronn) und einem Combi Pal Autosampler (Chromtech, Idstein).

- Synthesekontrolle und Produktcharakterisierung

GC/MS-Spektren zur Charakterisierung und zur Reinheitskontrolle synthetisierter Verbindungen wurden entweder mit dem GC/MS-System A oder B im „electron impact“ (EI) Modus (70 eV) aufgenommen. Die Injektionen erfolgten splitless bei 280 °C, einem Injektionsvolumen von 2 µL und einem Heliumfluß von 1 mL/min, die Trennung der Analyten erfolgte auf einer DB-1 Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm I.D., 1 µm Filmdicke, J&W, Folsom, CA, USA) mit einem linearen Temperaturgradienten von 60 - 300 °C bei einer Heizrate von 20 °C/min. Die Quelltemperatur betrug 200 °C und die „Transferline“ wurde auf 280 °C gehalten. Die Auswertung der Massenspektren erfolgte mit der geräteeigenen Software MassLab bzw. HP Data-Analysis.

GC/MS-Experimente mit chemischer Ionisation und der Detektion negativer Ionen (NCI-Modus) wurden mit dem GC/MS-System A durchgeführt. Dabei diente Methan als Reaktandgas bei einer Quelltemperatur von 150 °C. Die Injektion erfolgte splitless bei 280 °C, die „Transferline“ wurde auf 280 °C gehalten. Die Trennung der Analyten erfolgte wie oben beschrieben mit einem linearen Temperaturgradienten von 80 - 300 °C bei einer Heizrate von 20 °C/min.

- Quantifizierung von Daidzein in Human-Plasma

Die Analytik zur Bestimmung von Daidzein in Plasma wurde mit dem GC/MS-System A im EI-Modus (70 eV) durchgeführt. Für die Trennungen wurde eine DB-1 Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm I.D., 1 µm Filmdicke, J&W Scientific, Folsom, CA, USA) bei einem Heliumfluß von 1 mL/min verwendet. Das Temperaturprogramm lief von 150 °C bis 320 °C mit einem Temperaturgradienten von 20 °C/min und einer Haltezeit der Endtemperatur von 10 min. Die Quelltemperatur betrug 200 °C, die Injektor- und Interfacetemperaturen jeweils 280 °C. Injektionen wurden in einem Split-Verhältnis von 1:5 durchgeführt, das Injektionsvolumen betrug 1 µL.

Messungen mit dem GC/MS-System B erfolgten wie oben; abweichend davon wurde die Quelltemperatur auf 230 °C gehalten, Interface- und Injektortemperatur betragen hierbei jeweils 320 °C. In diesem System erfolgten die Injektionen splitless.

- Identifizierung von Equol und *O*-DMA

Die Analytik zur Identifizierung von Equol und *O*-DMA in Faeces von Ratten wurde im GC/MS-System B im EI-Modus (70 eV) durchgeführt. Für die Trennungen wurde eine DB-1 Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm I.D., 1 µm Filmdicke, J&W Scientific, Köln) bei

einem Heliumfluß von 1 mL/min verwendet. Das Temperaturprogramm lief von 50 °C bis 330 °C mit einem Gradienten von 10 °C/min. Die Injektor- und die Interfacetemperatur betragen jeweils 350°C, die Quellentemperatur 200°C. Injektionen wurden im Split-Verhältnis 1:50 durchgeführt, das Injektionsvolumen betrug 2 µL.

- Quantifizierung von Bisphenol A bzw. d₁₆-Bisphenol A

Die Analytik zur Bestimmung von BPA bzw. d₁₆-BPA in Urin und Plasma wurde mit dem GC/MS-system A im NCI-Modus durchgeführt. Für die Trennungen wurde eine DB-1 Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm I.D., 1 µm Filmdicke, J&W Scientific, Folsom, CA, USA) bei einem Heliumfluß von 1 mL/min verwendet. Das Temperaturprogramm lief von 80 °C bis 300 °C mit einem Gradienten von 20 °C/min und einer Haltezeit der Endtemperatur von 2 min. Die Injektor- und die Interfacetemperatur betragen jeweils 280 °C. Injektionen wurden splitless durchgeführt; das Injektionsvolumen betrug 2 µL. Methan diente als Reaktandgas bei einer Quellentemperatur von 170 °C zur chemischen Ionisation für die Detektion negativer Ionen.

4.2.1.2 Massenspektrometrie gekoppelt mit Flüssigkeitschromatographie (LC/MS/MS)

- Messungen bei der Firma ThermoQuest (LC/MS-System A)

Die Aufklärung der Struktur der per HPLC isolierten gefundenen Konjugate erfolgte durch HPLC gekoppelt mit Massenspektrometrie und Elektrosprayionisation (LC/MS/MS) bei der Firma ThermoQuest (Hemel Hempstead, UK) unter folgenden Bedingungen:

Gerät:	Finnigan TSQ-700 Triple Quadrupol MS
Probenaufgabe:	„Direct Loop Injection“ mit Wasser (mit 0,1 % Ameisensäure)
Fluß:	0,5 mL/min
Ionisation:	Elektrospray-Ionisation (4,5 kV)
Kollisionsenergie:	30 eV
Kapillartemperatur:	200 °C

- Messungen bei der Firma Applied Biosystems (LC/MS-System B)
Weitere Untersuchungen wurden per HPLC gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC/MS/MS) an einem Gerät der Firma Applied Biosystems (Langen) durchgeführt.
Gerät: PE Sciex API 3000 Triple Quadrupol MS unter Verwendung einer TurboIonSpray-Interface (Applied Biosystems, Langen)
Probenaufgabe: LC-200 Autosamplers und LC-200 Micro Pumpe (Perkin Elmer, Überlingen)
LC-Trennung: A: Wasser mit 5 mM Ammoniumacetat
B: Methanol
linear von 80 % A auf 5 % A in 10 min
Säule: Discovery C 18 (2,1 mm x 50 mm) (Supelco, Deisenhofen)
Fluß: 0,2 mL/min
Ionisation: negative bzw. positive Turbo-Ionspray-Ionisation
Kollisionsenergie: für jede Verbindung optimiert über die Auto-Tune-Funktion der geräteeigenen Software Analyst
- Messungen am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg (LC/MS-System C)
Weitere Untersuchungen wurden per HPLC gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS/MS) an einem Gerät der Firma Finnigan MAT (Bremen) durchgeführt.
HPLC-Pumpe: Applied Biosystems 140B HPLC-Pumpe (Applied Biosystems, Langen)
Säule: Eurosphere 100-C18 (100 x 2 mm I.D.) (Macherey und Nagel, Düren)
Gerät: TSQ 7000 Tandem-MS
LC-Trennung: A: Wasser (auf pH = 2 eingestellt mit Trifluoressigsäure)
B: Acetonitril
linear von 100 % A auf 100 % B in 60 min
Fluß: 0,2 mL/min
Ionisation: Elektrospray, positive ion mode
Elektrosprayspannung: 3,5 kV
Kapillartemperatur: 250 °C

4.2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Weitere Messungen zur Aufklärung der Biotransformation sowie Quantifizierungen aus Urin- und Faecesproben erfolgten durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) gekoppelt mit den unten angegebenen Detektoren unter den folgenden Bedingungen. Es sind nur die Parameter angegeben, die bei allen Messungen gleich waren, die restlichen Parameter, insbesondere die gemessenen Wellenlängen, sind bei den einzelnen Quantifizierungen beschrieben.

- HPLC-System A

Pumpe:	HP Series 1090 (Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA)
Injektorsystem:	Rheodyne 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, USA)
Autosampler:	AS100 Spectra Series (Thermo Separation Products, Darmstadt)
Detektor:	Photodiodenarraydetektor 1040 A Series (Hewlett-Packard, Waldbronn)
Auswertung:	Computersystem 9000 mit entsprechender Software (Hewlett-Packard, Waldbronn)

- HPLC-System B

Pumpen:	Waters 501 und 510 (Waters, Milford, UK)
Gradient-Controller:	Waters (Waters, Milford, UK)
Integrator:	Waters-Millipore 740 (Waters, Milford, UK)
Injektorsystem:	Autoinjektor Shimadzu, Sil 9-A (Shimadzu, Tokyo, J)
Detektor:	Fluoreszenzdetektor HP 1046 A Series bzw. UV-Festwellenlängendetektor HP 1050 (Hewlett Packard, Waldbronn)
Auswertung:	Ausdrucke des Integrators

- Säulen

analytisch:

Säule:	4,6 x 250 mm
Füllmaterial:	Partisil ODS-3 (Dr. Maisch, Ammerbuch)
Korngröße:	5 µm
Vorsäule:	gleiches Füllmaterial
Fließmittel A:	Wasser, pH = 2, eingestellt mit Trifluoressigsäure (etwa 0,1 Vol-%)
Fließmittel B:	Methanol (Daidzein) bzw. Acetonitril (Bisphenol A)
Gradient 1:	linear von 100 % A auf 100 % B (=Methanol) in 30 min
Gradient 2:	linear von 100 % A auf 60 % B (= Acetonitril) in 30 min
Flußrate:	1 mL/min

halbpräparativ:

Säule:	8 x 250 mm
Füllmaterial:	Partisil ODS-3 (Bischoff, Leonberg, FRG)
Korngröße:	5 µm
Vorsäule:	8 x 50 mm, gleiches Füllmaterial
Fließmittel A:	Wasser, pH = 2, eingestellt mit Trifluoressigsäure (etwa 0,1 Vol-%)
Fließmittel B:	Methanol (Daidzein) bzw. Acetonitril (Bisphenol A)
Gradient:	linear von 100 % A auf 100 % B in 30 min
Flußrate:	3 mL/min

LC/MS/MS-Betrieb:

Säule:	4 x 250 mm
Füllmaterial:	Partisil ODS-3 (Bischoff, Leonberg, FRG)
Korngröße:	5 µm
Vorsäule:	gleiches Füllmaterial
Fließmittel A:	Wasser, pH = 2, eingestellt mit Trifluoressigsäure
Fließmittel B:	Methanol bzw. Acetonitril
Gradient:	linear von 100 % A auf 100 % B in 30 min
Flußrate:	0,5 (LC/MS-System A) bzw. 0,2 mL/min (LC/MS-Systeme B und C)

4.2.3 Bestimmung von klinisch-chemischen Parametern

Aus Blutplasma und Urin wurden folgende klinisch-chemische Parameter durch einen Autoanalyser bestimmt:

Gerät: Vitros 700 XR (Ortho-Clinical Diagnostics, Neckargemünd)

- Bestimmungen aus Plasma
 - GOT / AST (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase / Aspartat-Amino-Transferase)
 - GPT / ALT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase / Alanin-Amino-Transferase)
 - GGT (γ -Glutamyl-Transferase)
- Bestimmung aus Urin
 - Kreatinin

Probenvorbereitung: Blutplasma wurde direkt vermessen, Urin nach 1:100 Verdünnung (v/v) mit Wasser

4.3 Derivatisierungsreaktionen

- Derivatisierung mit TMCS / HMDS / Pyridin

Die getrockneten Proben (zur weiteren Probenvorbereitung siehe Beschreibungen der jeweiligen Quantifizierungen) wurden mit 500 μ L Derivatisierungsreagenz, bestehend aus Trimethylchlorsilan (TMCS), Hexamethyldisilazan (HMDS) und Pyridin im Verhältnis 1:3:9 (v/v/v), versetzt und verschlossen für 15 min im Heizblock bei 60 °C erwärmt.

- Derivatisierung mit MBTFA

Die getrockneten Proben (zur weiteren Probenvorbereitung siehe Beschreibungen der jeweiligen Quantifizierungen) wurden mit 500 μ L Derivatisierungsreagenz, bestehend aus trockenem Acetonitril und N-Methyl-bis-trifluoracetamid (MBTFA) 1:1 (v/v), versetzt und verschlossen für 30 min im Heizblock bei 80 °C erwärmt.

- Derivatisierung mit BSTFA

Zur Derivatisierung wurden die völlig trockenen Proben (zur weiteren Probenvorbereitung siehe Beschreibungen der jeweiligen Quantifizierungen) mit 300 μ L des Silylierungsreagenzes N,O-Bis-(Trimethylsilyl)-Trifluoracetamid (BSTFA) versetzt und verschlossen für eine Stunde bei 80°C im Heizblock erwärmt.

4.4 Konjugatspaltungen

Bei allen folgenden Spaltungen wurde die eingesetzte β -Glucuronidase (100.000 units/mL) vor Verwendung im Verhältnis 1:100 (v/v) mit einem 0,2 M Natriumacetatpuffer (pH = 4,7) verdünnt. Abweichungen von dieser Vorschrift wurden im betreffenden Unterpunkt vermerkt.

4.4.1 Enzymatische Spaltung von Daidzein- und BPA-Glucuronid in Ratten-Urin

Je 500 μ L der frisch aufgetauten Urinproben wurden in einem 2 mL GC-Vial mit 200 μ L 1 M Natriumacetatpuffer (pH = 5,0) versetzt. Hinzu wurden je 100 μ L einer mit demselben Acetatpuffer auf 500 units/mL verdünnten β -Glucuronidase-Lösung gefügt, das Gläschen verschlossen und die Proben 24 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde mit 20 μ L Perchlorsäure eine Proteinfällung durchgeführt.

4.4.2 Enzymatische Spaltung von Daidzein-Glucuronid in Human-Plasma

Je 1 mL der frisch aufgetauten Plasmaproben wurden in einem Schraubdeckelzentrifugenglas mit 10 μ L einer 10 nmol/mL Lösung von Bisphenol A in Methanol als internem Standard versetzt. Hinzu wurden 2 mL der verdünnten β -Glucuronidase-Lösung und 3 mL Acetatpuffer gefügt, verschraubt und gemischt. Die Proben wurden anschließend 18 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

4.4.3 Enzymatische Spaltung von Daidzein-Glucuronid in Human-Urin

Je 2 mL der frisch aufgetauten Urinproben wurden in einem Schraubdeckelzentrifugenglas mit 20 μ L einer 400 nmol/mL Lösung von Flavon in Methanol als internem Standard versetzt. Hinzu wurden je 2 mL verdünnter β -Glucuronidase-Lösung und Acetatpuffer gefügt, verschraubt und gemischt. Die Proben wurden anschließend 18 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

4.4.4 Enzymatische Spaltung von Bisphenol A-Glucuronid in Maus-Urin

Je 50 μL der frisch aufgetauten Urinproben wurden in einem 2 mL GC-Vial mit 30 μL 0,2 M Natriumacetatpuffer (pH = 4,7) und 10 μL einer 10 nmol/mL Lösung von d_{16} -BPA in Methanol als internem Standard versetzt. Dazu wurden je 15 μL einer wie oben beschrieben verdünnten β -Glucuronidase-Lösung hinzugefügt, das Gläschen verschlossen und die Proben 24 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

4.4.5 Enzymatische Spaltung von d_{16} -BPA-Glucuronid in Human-Plasma

Je 1 mL der frisch aufgetauten Plasmaproben wurden in einem Schraubdeckelzentrifugenglas mit 10 μL einer 10 nmol/mL Lösung von Bis-(4-hydroxyphenyl)-methan in Methanol als internem Standard versetzt. Dazu wurden 2 mL der verdünnten β -Glucuronidase-Lösung und 3 mL Acetatpuffer hinzugefügt, verschraubt und gemischt. Die Proben wurden anschließend für 18 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

4.4.6 Enzymatische Spaltung von d_{16} -BPA-Glucuronid in Human-Urin

Für die Quantifizierung per GC/MS

Je 2 mL der frisch aufgetauten Urinproben wurden in einem Schraubdeckelzentrifugenglas mit 5 μL einer 100 nmol/mL Lösung von Bis-(4-hydroxyphenyl)-methan in Methanol als internem Standard versetzt. Dazu wurden je 2 mL verdünnter β -Glucuronidase-Lösung und Acetatpuffer hinzugefügt, verschraubt und gemischt. Die Proben wurden anschließend für 18 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Für die Quantifizierung per HPLC/FLD

Je 100 μL der frisch aufgetauten Urinproben wurden in einem Schraubdeckelzentrifugenglas mit je 100 μL verdünnter β -Glucuronidase-Lösung und Acetatpuffer versetzt, verschraubt und gemischt. Die Proben wurden anschließend 18 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

4.5 Inkubationen

Um zu untersuchen, ob ein Cytochrom-P450 vermittelter, oxidativer Metabolismus in Suspensionen von Nager-Lebermikrosomen stattfindet, wurden sowohl Daidzein als auch Bisphenol A mit unbehandelten Mikrosomen (WLMic's männl. vom 4.6.96 (SOM/JH), Proteingehalt 34,6 µg/µL) wie folgt inkubiert:

Ansatz: 380 µL Kaliumphosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4)
 44 µL WLMic's männl. (Proteingehalt 34,6 µg/µL)
 20 µL NADPH (0,104175 g/mL H₂O)
 5 µL einer 0,25 M Lösung von Daidzein bzw. Bisphenol A in Methanol

Die Proben wurden verschlossen 30 min bei 37°C inkubiert. Eine Proteinfällung wurde mit 20 µL Perchlorsäure durchgeführt und die Proben sowohl direkt nach Verdünnung mit Methanol (1:1, v/v) als auch nach Extraktion mit Ethylacetat per HPLC/UV gemessen. Dazu wurden die Extrakte *in vacuo* zur Trockne eingengt, der Rückstand mit 100 µL Methanol aufgenommen und 50 µL davon in das HPLC-System A eingespritzt.

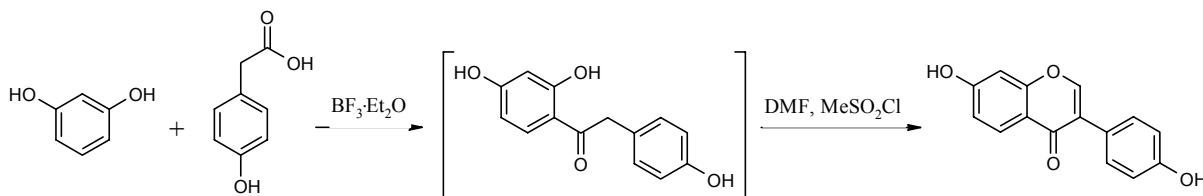
Zur Untersuchung des oxidativen Metabolismus von Daidzein wurde in einem weiteren Versuch nach Bestimmung des Proteingehaltes der unbehandelten Mikrosomen (= 47.01 mg/mL) erneut wie folgt inkubiert:

Ansatz: 918,7 µL Natriumphosphatpuffer 0,1 M
 21,3 µL Lebermikrosomen
 40 µL NADPH 125 mM
 3 min bei 37 °C vorinkubiert
 20 µL einer Lösung Daidzein der Konzentration 1 µmol/mL

Nach Zugabe von Daidzein wurden die Lösungen bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, Probennahmen erfolgten nach 30, 60 und 90 Minuten. Dazu wurden 300 µL der Probe auf 300 µL eisgekühltes Acetonitril gegeben und per HPLC/UV (HPLC-System A) gemessen. Analog wurden zur Kontrolle Inkubationslösungen ohne Mikrosomen und auch Inkubationslösungen ohne Daidzein untersucht.

4.6 Synthesen

4.6.1 Synthese von Daidzein (nach Wahala, K. *et al.*, 1995)



Ansatz: 2,64 g Resorcin (24 mmol)
3,64 g p-Hydroxyphenylelessigsäure (24 mmol)
62 mL Bortrifluorid-Etherat (480 mmol)
4,8 mL Methansulfonsäurechlorid (Mesylchlorid) (74 mmol)

Resorcin und p-Hydroxyphenylelessigsäure wurden in äquimolaren Mengen unter Argon in frisch vakuumdestilliertem Bortrifluorid-Etherat (im Überschuß) gelöst und 60 min bei 70 °C gerührt. Abweichend von der Originalvorschrift wurde das als Zwischenprodukt entstehende Deoxybenzoin isoliert. Dazu wurde das Reaktionsgemisch in ein großes Volumen Eiswasser gegossen und das Zwischenprodukt als gelber Feststoff über Nacht auskristallisiert. Nach Filtration über einen Nutschenfilter und Trocknen über Phosphorpentoxid wurde das Deoxybenzoin ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt. Dazu wurde die in wenig Dimethylformamid (DMF) gelöste Substanz bei Raumtemperatur unter Rühren langsam mit 4 Äquivalenten Bortrifluorid-Etherat versetzt. Nach Erwärmen der Lösung auf 50 °C wurden 4,8 mL frisch destilliertes Methansulfonsäurechlorid in 10 mL DMF langsam zugetropft. Nach 60 min bei 70 °C wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und in ein großes Volumen Eiswasser gegossen. Das Rohprodukt wurde über Nacht auskristallisiert, abfiltriert und nach Trocknen über Phosphorpentoxid zweimal aus einem 60 %igem Ethanol/Wasser-Gemisch umkristallisiert. Die Identifizierung des Produktes erfolgte sowohl durch GC/MS als auch mit HPLC über den Vergleich des UV-Spektrums und durch Co-Chromatographie mit käuflich erworbenem Daidzein.

Ausbeute: 4,15 g Daidzein (18 mmol, 75 % d. Th.)

Massenspektrum von Daidzein nach Silylierung: EI (70 eV): $m/z = 398 [M]^+$, $383 [M-Me]^+$

UV-Spektrum (MeOH/H₂O pH 2): Maxima bei $\lambda = 248$ nm und $\lambda = 302$ nm (Vergleich mit käuflicher Substanz ergab eine Reinheit von > 98 %)

4.6.2 Oxidation von Bisphenol A (modifiziert nach Udenfriend, S. *et al.*, 1954)

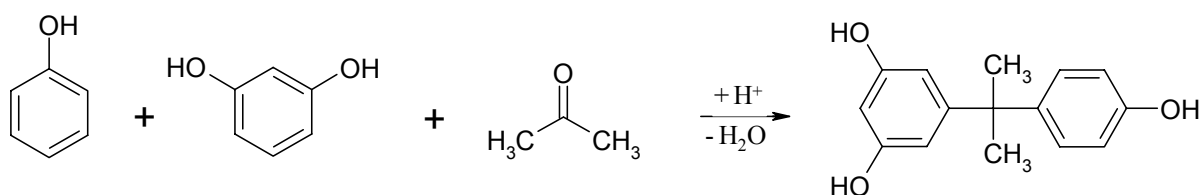
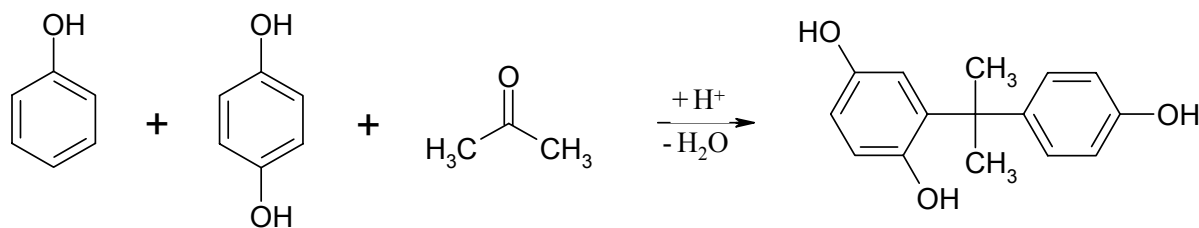
Zur Darstellung von hydroxylierten Bisphenol A-Derivaten wurde BPA mit Fenton's Reagens umgesetzt. Das bei der Umsetzung entstehende Gemisch verschiedener hydroxylierter Verbindungen sollte per HPLC/UV auf Signale, die eventuell mit in Rattenurin gefundenen Metaboliten übereinstimmten, untersucht werden.

Ansatz 1: 75 mg Bisphenol A (0,3 mmol)
 90 mg FeSO₄·7H₂O (0,3 mmol)
 1 mL 30 %iges H₂O₂ (10 mmol, Überschuß)

Ansatz 2: 50 mg Bisphenol A (0,2 mmol)
 60 mg FeSO₄·7H₂O (0,2 mmol)
 20 µL 30 %iges H₂O₂ (0,2 mmol, Verhältnis 1:1)

Die Reaktionsgemische wurden jeweils 15 min unter Rückfluß erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt, 5 min zentrifugiert und in 3 mL Ethylacetat extrahiert. Nach Trocknen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rückstand in 100 µL Methanol aufgenommen und per HPLC/UV mit dem HPLC-System A untersucht. Die Analyse zeigte ein Gemisch verschiedener Isomere, auf deren weitere Auftrennung verzichtet wurde, sowie unverändert vorliegende Muttersubstanz.

4.6.3 Synthese von Hydroxy-Bisphenol A (variiert nach Metzler, M., 1998)



Analog der Synthese von Bisphenol A aus Phenol und Aceton bei saurer Katalyse sollten unter Verwendung von Katechol (1,4-Dihydroxybenzol) bzw. Resorcin (1,3-Dihydroxybenzol) die entsprechenden Mono-Hydroxy-Derivate hergestellt werden.

Ansatz: 390 mg Phenol (4,15 mmol)
 456 mg Resorcin (4,15 mmol) bzw. 456 mg Katechol (4,15 mmol)
 305 µL (241 mg) Aceton (4,15 mmol)
 50 µL Eisessig
 50 µL konzentrierte Schwefelsäure (95-97 %)

Zu Resorcin (bzw. Katechol) und Schwefelsäure wurde langsam ein Gemisch von Aceton und Phenol zugetropft. Danach wurde für 60 min auf 80 °C erhitzt. In einem Parallelansatz wurden die Edukte zusammengegeben und für 24 h, 48 h und sieben Tage im Tageslicht stehen gelassen.

Die Synthesekontrolle erfolgte per HPLC/UV. Die Auswertung der Chromatogramme zeigte, daß sowohl unter Verwendung von Resorcin als auch von Katechol eine Vielzahl verschiedener Reaktionsprodukte entstand.

4.7 Tierversuche

Männliche (230-280 g) und weibliche (190-220 g) Fischer F344 Ratten im Alter von ungefähr 12 Wochen (F344-Ratten) und B6C3F1-Mäuse im Alter von etwa zehn Wochen wurden von Harlan-Winkelmann, Borcheln, bezogen und bei konstanter Luftfeuchtigkeit und Temperatur (21 °C) in einem 12 h Hell-/Dunkelzyklus in Stahlkäfigen mit 4 (Ratten) bzw. 8 (Mäuse) Tieren pro Käfig im Tierstall des Instituts für Toxikologie gehalten. Alle Versuchstiere wurden von zertifizierten Züchtern erhalten, nach der Ankunft inspiziert und im Tierstall des Instituts für Toxikologie der Universität Würzburg von zertifiziertem und geschultem Personal unter ständiger Kontrolle des Veterinäramtes des Freistaates Bayern gehalten. Alle Versuche wurden nach Genehmigung durch die zuständige Regierungsbehörde des Freistaates Bayern durchgeführt.

Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Wasser und Altromin-Standardfutter (Altromin, Langen), Daidzein-Expositionen wurden teilweise unter Fütterung des soja-armen Futters Altromin No. 1324 (Altromin, Langen) durchgeführt. Vor der Exposition wurde das Futter für 12 h entfernt, der Zugang zu Wasser wurde jedoch *ad libitum* sichergestellt.

Vor den Expositionen wurden die Tiere für mindestens drei Tage an die Stoffwechselkäfige zum getrennten Sammeln von Urin und Faeces gewöhnt. Dabei wurden 12-24 h vor den Expositionen Leerproben gesammelt. Bisphenol A und Daidzein (entsprechende Dosen siehe 4.7.1 und 4.7.2) wurden per Schlundsonde suspendiert in Maiskeimöl peroral an Ratten und Mäuse appliziert. Unmittelbar nach dem Sondieren wurden die Tiere einzeln (Ratten) bzw. paarweise (Mäuse) in die mit konstantem Luftstrom durchströmten Stoffwechselkäfige gesetzt.

Die Testsubstanzen wurden unmittelbar vor Applikation an die Tiere in Maiskeimöl suspendiert, eine gleichmäßige Verteilung wurde durch zehnminütiges Durchmischen im Ultraschallbad gewährleistet.

In regelmäßigen Zeitabständen wurden entsprechend der Studienprotokolle Urin- und Faecesproben genommen und bei -20 °C gelagert.

4.7.1 Exposition von Ratten gegen Daidzein

- Zur Aufklärung der Biotransformation von Daidzein wurde eine männliche Fischer F-344 Ratte (Gewicht etwa 270 g) einmalig peroral gegen 100 mg/kg KG Daidzein gelöst in 1,5 mL Maiskeimöl exponiert. Urinproben wurden über 48 h in 24 h Intervallen gesammelt und bei -20 °C aufbewahrt.

- An jeweils fünf männliche (Gewicht 280-300g) und weibliche (Gewicht 160-190 g) Fischer F344-Ratten (Charles-River-Wiga, Sulzfeld), die elf Tage vor Beginn der Exposition auf soja-armes Futter (Nr. 1324, Altromin, Langen) umgestellt worden waren, wurden je 100 mg/kg KG Daidzein, das in 1 mL Mazola Keimöl suspendiert worden war, einmalig peroral appliziert. Nach der Sondierung wurden die Tiere einzeln in Makrolon-Stoffwechselkäfige gesetzt. Urin wurde in auf 0°C gekühlten Meßröhrchen erstmals nach 6 h, danach in 6 h-Intervallen bis 24 h nach Sondierung, anschließend in 12 h-Intervallen bis 96 h nach Sondierung sowie danach in 24 h-Intervallen bis zum Ende der Exposition 7 Tage nach Gabe von Daidzein gesammelt und bei -20 °C aufbewahrt. Faecesproben wurden zeitgleich zu den Urinproben genommen und ebenfalls bei -20 °C aufbewahrt. Kontrollproben wurden 24 h vor Expositionsbeginn genommen und bei -20 °C aufbewahrt.

4.7.2 Exposition von Ratten gegen Bisphenol A

- Zur Aufklärung der Biotransformation von Bisphenol A wurde eine männliche Fischer-Ratte (F-344, Gewicht etwa 270 g) einmalig mit 600 mg/kg KG Bisphenol-A, das in 1,5 mL „Mazola“[®] Keimöl suspendiert worden war, per Schlundsonde exponiert. Urinproben wurden nach 24 h und 48 h gesammelt und bei -20 °C aufbewahrt.
- Zum Erstellen einer Ausscheidungskinetik wurden an jeweils drei männliche und weibliche Fischer-Ratten (F344, Gewicht 220 - 270 g) 200 mg/kg KG Bisphenol A, das in 1,5 mL Mazola Keimöl suspendiert worden war, einmalig per Schlundsonde appliziert. Nach der Sondierung wurden die Tiere einzeln in Makrolon-Stoffwechselkäfige gesetzt. Urin und Faeces wurden in auf 0°C gekühlten Meßröhrchen in 12 h-Intervallen bis 96 h (Faeces 48 h) nach Sondierung gesammelt und bei -20 °C aufbewahrt. Kontrollproben wurden 24 h vor Expositionsbeginn genommen und eingefroren.

4.7.3 Exposition von Mäusen gegen Bisphenol A

An jeweils acht männliche und weibliche B6C3F1-Mäuse wurden 2 mg/kg KG bzw. 20 mg/kg KG Bisphenol A, das in 0,2 mL Maiskeimöl suspendiert worden war, einmalig per Schlundsonde peroral appliziert. Nach der Sondierung wurden die Tiere getrennt nach Geschlechtern paarweise in speziell für Mäuse hergerichtete Stoffwechselkäfige gesetzt. Urin wurde in auf 0°C gekühlten Meßröhrchen über 72 h in 12 h-Intervallen aufgefangen und bei -20 °C aufbewahrt. Zusätzlich wurden Faecesproben 24 h und 48 h nach Exposition gesammelt und ebenfalls bei -20 °C aufbewahrt. Kontrollproben wurden 24 h vor Expositionsbeginn genommen und eingefroren.

4.7.4 Exposition einer Ratte gegen d₁₆-Bisphenol A

Um zu überprüfen, ob das vollständig deuterierte Bisphenol A analog zur Muttersubstanz metabolisiert wird, wurden an eine männliche Fischer-Ratte (F344) 200 mg/kg KG d₁₆-Bisphenol A, das in 1,5 mL Maiskeimöl suspendiert worden war, einmalig per Schlundsonde verabreicht. Nach Sondierung wurde das Tier in einen Stoffwechselkäfig gesetzt und Urin nach 12 h und nach 24 h in gekühlten graduierten Meßröhrchen aufgefangen und bei -20 °C aufbewahrt.

4.8 Human-Expositionen

Bei den Probanden, die an den Expositionsstudien teilnahmen, handelte es sich um weibliche und männliche Freiwillige im Alter von 28 bis 31 Jahren. Sie waren alle gesund, Nichtraucher (bzw. nur gelegentliche Raucher) und tranken nur mäßig Alkohol. Mit Hilfe eines Fragebogens wurde sichergestellt, daß die Probanden nicht an schwerwiegenden Krankheiten litten und vor und während der Expositionen keine Medikamente einnahmen. Weiterhin wurden vor und während der Expositionen typische Blutwerte (GOT, GPT und GGT) der Probanden untersucht. Vor Teilnahme an den Expositionen wurden die Probanden über Ziele und mögliche Risiken der Studien unterrichtet. Anschließend unterzeichneten sie eine Einverständniserklärung, in der sie die Aufklärung bestätigten. Alle Versuche mit den Probanden wurden gemäß der Deklaration von Helsinki über Humanstudien nach Überprüfung durch die zuständige Ethikkommission der Universität Würzburg durchgeführt. Vor und während der Expositionsstudie mit Daidzein verzichteten die Probanden soweit möglich auf die Aufnahme sojahaltiger Nahrungsmittel.

In Tabelle 4.1 sind alle Probanden, die an den Studien teilnahmen, in anonymisierter Form mit ihren charakteristischen Daten zusammengefaßt.

Tab. 4.1: Charakteristische Daten der Freiwilligen, die an den Human-Studien teilnahmen.

Probanden	Geschlecht	Alter	Größe [cm]	Gewicht [kg]	Teilnahme an folgenden Expositionen
A	weiblich	29	165	57	d ₁₆ -BPA
B	weiblich	24	175	63	d ₁₆ -BPA
C	weiblich	31	162	62	d ₁₆ -BPA
E	männlich	29	184	82	d ₁₆ -BPA
F	männlich	30	175	72	d ₁₆ -BPA, Daidzein
G	männlich	28	176	64	d ₁₆ -BPA, Daidzein
H	weiblich	28	171	61	Daidzein
I	weiblich	28	180	79	Daidzein
K	männlich	30	173	68	Daidzein
L	männlich	29	183	84	Daidzein

4.8.1 Exposition gegen Daidzein

Zur Untersuchung der Biotransformation und Toxikokinetik von Daidzein im Menschen nach oraler Exposition wurden sechs Probanden (zwei weibliche, vier männliche) mit je 5 mg Daidzein in einer Gelatinekapsel exponiert. Nach oraler Einnahme der Kapsel, die auf nüchternen Magen erfolgte, sammelten die Probanden in 6 h-Intervallen bis 72 h nach Exposition Urin, notierten das Volumen und füllten zwei Aliquots zu je 50 mL in Uroboxen ab. Zusätzlich wurde den Probanden während der ersten 12 h in 4 h-Intervallen, sowie 24 h und 48 h nach der Exposition mittels einer Monovette Blut (ca. 10 mL) entnommen. Nach Abtrennung des Plasmas wurde dieses wie die Urinproben bei -20 °C eingefroren. Auf entsprechende Weise wurden von den Probanden je eine Urin- und Blutprobe vor der Exposition als Kontrollprobe gesammelt.

4.8.2 Exposition gegen d₁₆-Bisphenol A

Zur Untersuchung der Biotransformation und Toxikokinetik von d₁₆-Bisphenol A im Menschen nach oraler Exposition wurden sechs Probanden (je drei weibliche und männliche) mit 5 mg d₁₆-BPA in einer Gelatinekapsel exponiert. Die deuterierte Substanz wurde gegeben, um störende Hintergrundwerte von BPA (dazu siehe Kapitel 5) auszuschließen. Nach oraler Einnahme der Kapsel, die auf nüchternen Magen erfolgte, sammelten die Probanden in 6 h-Intervallen bis 72 h nach Exposition Urin, notierten das Volumen und füllten zwei Aliquots zu je 50 mL in Uroboxen ab. Zusätzlich wurde den Probanden während der ersten 16 h in 4 h-Intervallen, sowie in 8 h-Intervallen bis 72 h nach der Exposition mittels einer Monovette Blut (ca. 10 mL) entnommen. Nach Abtrennung des Plasmas wurde dieses wie die Urinproben bei -20 °C eingefroren. Auf entsprechende Weise wurden von den Probanden je eine Urin- und Blutprobe vor der Exposition als Kontrollprobe gesammelt.

4.9 Qualitative Untersuchungen

4.9.1 HPLC-Messungen

Zur Identifizierung der Metabolite per HPLC/UV durch Vergleich der Chromatogramme exponierter mit denen nicht-exponierter Individuen wurden die Urinproben der Ratten bzw. Menschen aus den Expositionen mit Daidzein und Bisphenol A entweder direkt oder nach Glucuronidase-Spaltung (siehe Abschnitt 4.4) im HPLC System A nach den folgenden Methoden untersucht. Die Parameter für die Trennung wurden bereits in Kapitel 4.2.2 beschrieben.

- Daidzein

Zur Analyse wurden je 50 µL Urin der Ratte mit 100 µL Methanol verdünnt, zehn Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert und 50 µL des Überstandes in die HPLC injiziert.

Alternativ wurde der Urin vor der Injektion, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, enzymatisch gespalten, 30 µL der Probe mit Methanol auf 150 µL aufgefüllt und zehn Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert. Von dieser Lösung wurden ebenfalls 50 µL per HPLC analysiert.

Humanurin wurde wie unter Abschnitt 4.10.6 beschrieben vorbereitet.

Die Analyse erfolgte bei den Wellenlängen 248 nm und 302 nm, von allen eluierenden Verbindungen wurden im Bereich zwischen 220 und 400 nm UV-Spektren aufgenommen.

- Bisphenol A bzw. d₁₆-Bisphenol A

Zur Analyse wurden je 50 µL Urin der Ratte mit 100 µL Methanol verdünnt, zehn Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert und 50 µL des Überstandes in die HPLC injiziert.

Alternativ wurde der Urin vor der Injektion, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, enzymatisch gespalten, 30 µL der Probe mit Methanol auf 150 µL aufgefüllt und zehn Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert. Von dieser Lösung wurden ebenfalls 50 µL per HPLC analysiert.

Humanurin wurde wie unter Abschnitt 4.10.13 beschrieben vorbereitet.

Die Analyse erfolgte bei den Wellenlängen 226 nm und 276 nm, von allen eluierenden Verbindungen wurden im Bereich zwischen 220 und 400 nm UV-Spektren aufgenommen.

4.9.2 GC/MS-Messungen

Zur Identifizierung der Metabolite und Konjugate per GC/MS durch Vergleich der Chromatogramme exponierter mit denen nicht-exponierter Individuen wurden die Urin- und Plasmaproben der Ratten bzw. Menschen aus den Expositionen gegenüber Daidzein und Bisphenol A entweder direkt oder nach Glucuronidasespaltung nach den folgenden Methoden untersucht.

- BSTFA-Derivatisierung

Zur Identifizierung eventueller Metabolite wurden 50 µL Ratten-Urin in ein 2 mL GC-Vial gegeben und entweder direkt oder nach enzymatischer Spaltung (wie unter Abschnitt 4.4.4 für die Maus beschrieben) lyophilisiert. Die Vorbereitung der Human-Proben erfolgte wie in den Kapiteln 4.10.5 und 4.10.11 angegeben. Der getrocknete Rückstand wurde wie oben beschrieben derivatisiert, um die entsprechenden Trimethylsilylderivate zu erhalten. Von dieser Lösung wurden 2 µL in das GC/MS-System B injiziert. Die Messung erfolgte im EI-Modus (70 eV) unter den in Kapitel 4.2.1.1 beschriebenen Trennbedingungen. Dabei wurden im full scan-Modus die Massen m/z 100-550 gemessen.

- MBTFA-Derivatisierung

Zur Identifizierung eventueller Metabolite wurden 50 µL Ratten-Urin in ein 2 mL GC-Vial gegeben und entweder direkt oder nach enzymatischer Spaltung (wie unter Abschnitt 4.4.4 für die Maus beschrieben) lyophilisiert. Die Vorbereitung der Human-Proben erfolgte wie unter 4.10.5 und 4.10.11 angegeben. Der getrocknete Rückstand wurde wie oben beschrieben derivatisiert, um die entsprechenden flüchtigen Derivate zu erhalten. Von dieser Lösung wurden 2 µL per GC/MS analysiert. Die Messung erfolgte im GC/MS-System A unter den in Kapitel 4.2.1.1 beschriebenen Trennbedingungen. Dabei wurden bei negativer chemischer Ionisation mit Methan als Reaktandgas im full scan-Modus die Massen m/z 100-550 gemessen.

- HMDS/TMCS/Pyridin-Derivatisierung

Zur Identifizierung eventueller Metabolite wurden 50 µL Ratten-Urin in ein 2 mL GC-Vial gegeben und entweder direkt oder nach enzymatischer Spaltung (wie unter Abschnitt 4.4.4 für die Maus beschrieben) lyophilisiert. Die Vorbereitung der Human-Proben erfolgte wie in den Kapiteln 4.10.5 und 4.10.11 beschrieben. Der getrocknete Rückstand wurde wie oben beschrieben derivatisiert, um die entsprechenden Trimethylsilylderivate

zu erhalten. Von dieser Lösung wurden 2 μL in das GC/MS-System B injiziert. Die Messung erfolgte im EI-Modus (70 eV) unter den in Kapitel 4.2.1.1 beschriebenen Trennbedingungen. Dabei wurden im full scan-Modus die Massen m/z 100-550 gemessen.

4.10 Quantifizierungen

Bei den Quantifizierungen wurde eine Eichkurve jeweils vor und nach einer Probenserie gemessen. Dabei wurden sowohl die Eichkonzentrationen als auch die Proben jeweils doppelt nacheinander gemessen. Die Auswertung erfolgte über die Mittelwerte aus den Doppelbestimmungen. Der Konzentrationsbereich der Eichlösungen wurden so gewählt, daß die zu bestimmenden Konzentrationen innerhalb der Eichkurven lagen. Zum Ausgleich eventueller Schwankungen innerhalb einer Meßreihe wurde überwiegend unter Verwendung eines internen Standards quantifiziert. Dabei wird sowohl bei der Auswertung der Standards als auch der Proben die Fläche des Analytensignales durch die Fläche des Signals für den in immer gleichbleibender Konzentration zugesetzten internen Standard dividiert.

4.10.1 Quantifizierung von Daidzein in Rattenfutter per HPLC/UV

Je 2,5 g pulverisiertes Rattenfutter wurden mit 500 μL einer methanolischen Lösung von Flavon (40 $\mu\text{mol}/\text{mL}$) als internem Standard versetzt und in einem Rundkolben mit 10 mL HCl (37 %) und 40 mL Ethanol gelöst (Ultraschallbad) und 4 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung durch einen Faltenfilter quantitativ in einen 100 mL Rundkolben überführt und an einem Rotationsverdampfer auf weniger als 20 mL eingengt. Das Konzentrat wurde mit Ethanol auf 20 mL aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden 50 μL wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben per HPLC/UV aufgetrennt. Die Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 248 nm und 302 nm für Daidzein und 250 nm und 298 nm für den internen Standard; von allen eluierenden Verbindungen wurden im Bereich zwischen 220 und 400 nm UV-Spektren aufgenommen. Die Quantifizierung erfolgte mit der Methode des internen Standards über eine Eichkurve von 0,4 bis 10 $\mu\text{mol}/\text{g}$ Futter.

4.10.2 Quantifizierung von Daidzein und seiner Konjugate in Ratten-Urin per HPLC/UV

Je 20 μL der aufgetauten Urinproben wurden mit 10 μL einer methanolischen Lösung von Flavon (40 $\mu\text{mol}/\text{mL}$) als internem Standard versetzt und mit 770 μL Methanol verdünnt. Vor der Analyse wurden die Proben durchmischt und 10 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Die Auftrennung und Detektion von Daidzein, Daidzein-Glucuronid, Daidzein-Sulfat sowie des internen Standards Flavon erfolgten wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben per HPLC/UV (Injektionsvolumen 50 μL , System B) über die feste Wellenlänge von 302 nm (s.a. Abb. 4.1). Die Quantifizierung der Analyten erfolgte mit der Methode des internen Standards über eine Eichkurve von 3,5 bis 75 nmol/mL Urin.

Messungen am HPLC-System A erfolgten wie folgt: Je 40 μL der aufgetauten Urinproben wurden mit 5 μL einer methanolischen Lösung von Flavon (1,5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$) als internem Standard versetzt und mit 155 μL Wasser verdünnt. Vor der Analyse wurden die Proben durchmischt und 10 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Die Auftrennung und Detektion von Daidzein sowie des internen Standards Flavon erfolgten wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben per HPLC/UV (Injektionsvolumen 50 μL , System A) über die Wellenlängen von 248 nm und 302 nm für Daidzein und 250 nm für Flavon. Die Quantifizierung der Analyten erfolgte über einen internen Standard und eine Eichkurve von von 25 bis 350 nmol/mL Urin.

In Ermangelung authentischer Standards für Daidzein-Glucuronid und Daidzein-Sulfat wurden diese unter der Annahme quantifiziert, daß die UV-Absorptionen denen von Daidzein vergleichbar sind. Die Auswertung erfolgte daher über die Eichgeraden von Daidzein.

4.10.3 Quantifizierung von Daidzein in Ratten-Faeces per HPLC/UV

Je 250 mg der getrockneten Faecesproben wurden mit je 20 mL Ethylacetat 48 h bei 60 °C im Wasserbad extrahiert. Nach Filtration durch einen Faltenfilter wurde das Volumen des Extraktes auf 25 mL aufgefüllt. 790 μL davon wurden mit 10 μL einer methanolischen Lösung von Flavon (40 $\mu\text{mol}/\text{mL}$) als internem Standard versetzt und 50 μL per HPLC vermessen (s.a. Abb. 4.2). Die Auftrennung und Detektion von Daidzein, Daidzein-Glucuronid, Daidzein-Sulfat sowie des internen Standards Flavon erfolgten wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben per HPLC/UV (System B) über die feste Wellenlänge von 302 nm. Die Quantifizierung erfolgte über einen internen Standard und eine Eichkurve von 0,4 bis 100 $\mu\text{mol}/\text{g}$ getrocknete Faeces.

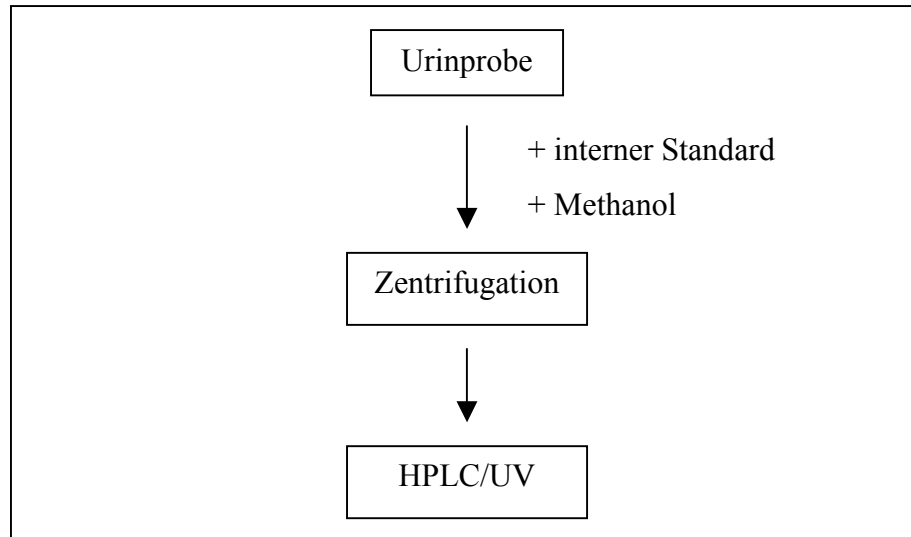


Abb. 4.1: Aufarbeitungsschema zur Quantifizierung von Daidzein in Ratten-Urin.

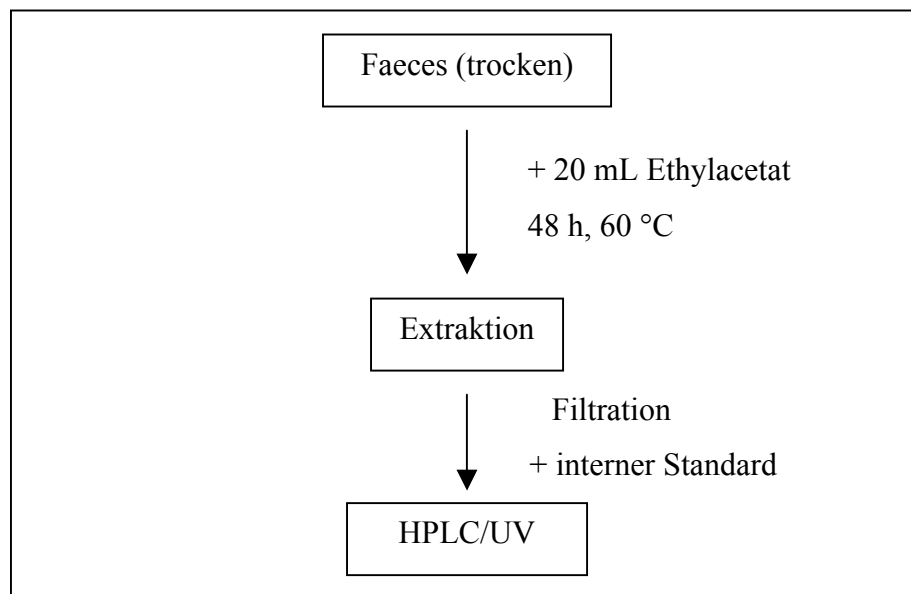


Abb. 4.2: Aufarbeitungsschema zur Quantifizierung von Daidzein in Ratten-Faeces.

4.10.4 Identifizierung von Equol und *O*-DMA in Ratten-Faeces per GC/MS

Je 800 mg der getrockneten Faecesproben wurden in eine Extraktionshülse eingewogen, die Hülse in eine Soxlethapparatur gegeben und ca. 15 mL Methanol zugegeben. Dazu wurden 20 µL einer methanolischen Lösung von 4-Hydroxy-phenylessigsäure (10,34 µmol/mL) als interner Standard pipettiert.

Die Probe wurde in einer Soxleth-Apparatur für 4 h extrahiert und der Extrakt bis zur Trockne eingengt. Die Proben wurden wie in Kapitel 4.3 beschrieben mit BSTFA derivatisiert und per GC/MS (System B) gemessen (s.a. Abb. 4.3). Die Detektion gelang unter den in Kapitel

4.2.1.1 aufgeführten analytischen Bedingungen anhand der charakteristischen Massenfragmente m/z 386 (für den Silylether von Equol) bzw. m/z 388 (für den Silylether von *O*-DMA) und m/z 291 (für den Silylether des internen Standards) im SIM-Modus.

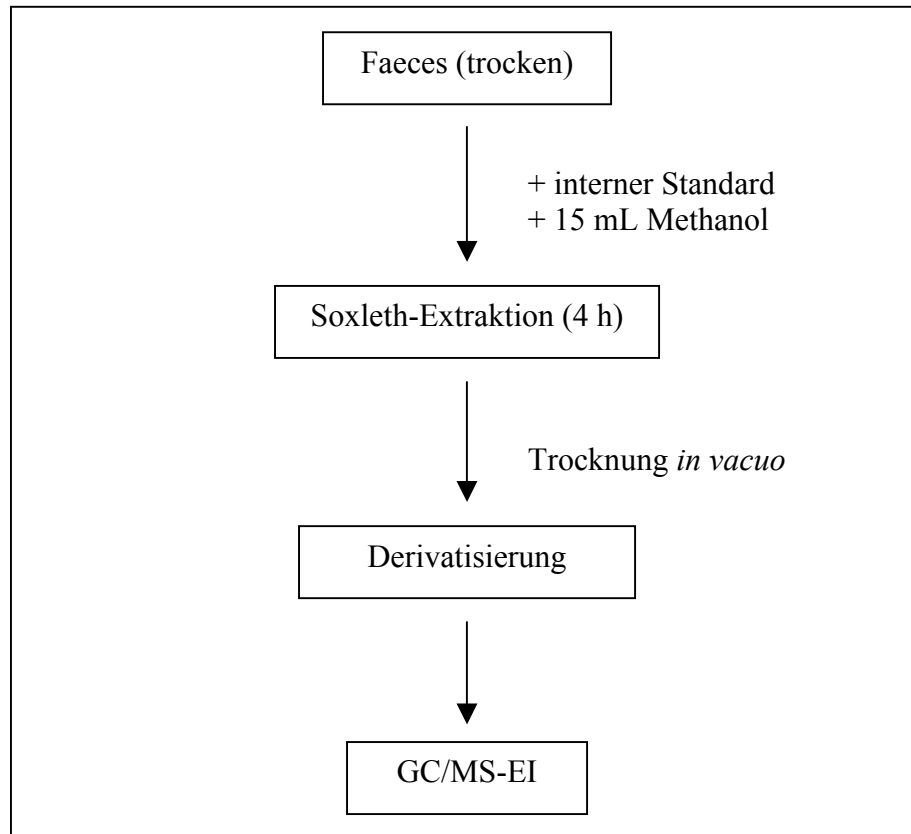


Abb. 4.3: Aufarbeitungsschema zur Bestimmung von Equol in Ratten-Faeces.

4.10.5 Quantifizierung von Gesamt-Daidzein in Human-Plasma per GC/MS

Je 2 mL der aufgetauten Plasmaproben wurden in einem Zentrifugenglas mit 10 μ L einer methanolischen Lösung von BPA (1000 nmol/mL) als internem Standard versetzt und mit 6 mL Methanol vermischt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 6000 U/min wurde der Überstand in ein neues Zentrifugenglas überführt und *in vacuo* bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 2 mL eines 0,2 M Natriumacetatpuffers (pH = 4,7) aufgenommen, im Ultraschallbad gelöst und dann zur Anreicherung von Daidzein auf eine vorkonditionierte SPE-Säule (C18, 200 mg, 3CC; MedChrom, Heidelberg) gegeben. Diese wurde zweimal mit 3 mL Methanol und anschließend 3 mL 0,2 M Natriumacetatpuffer (pH = 4,7) vorbehandelt. Danach wurde die Säule mit der Pufferlösung beladen und mit 2 mL des Acetatpuffers nachgewaschen. Die Probe wurde mit 2 mL Methanol eluiert und das Eluat in einem Reagenzglas aufgefangen. Das Lösungsmittel wurde bis zur Trockne eingengt. Der

Rückstand wurde wie in Abschnitt 4.3 beschrieben mit TMCS/HMDS/Pyridin derivatisiert und unter den in Kapitel 4.2.1.1 beschriebenen analytischen Bedingungen im EI-Modus über die spezifischen Massenfragmente m/z 398 und 383 (für das Trimethylsilylderivat von Daidzein) und m/z 372 und 357 (für den Trimethylsilylether des internen Standards) im SIM-Modus per GC/MS bestimmt (unterstrichene Werte kennzeichnen die zur Auswertung herangezogenen Massenfragmente; s.a. Abb. 4.4). Die Quantifizierung erfolgte über einen internen Standard und eine Eichkurve von 10 bis 100 pmol Daidzein pro mL Plasma.

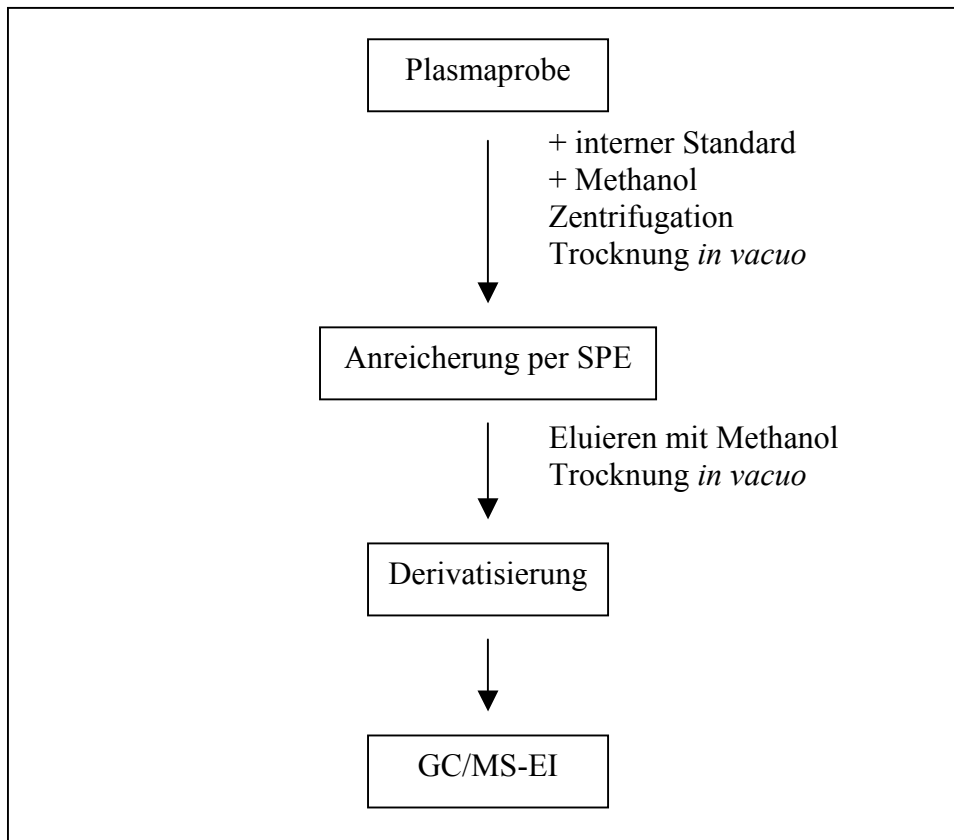


Abb. 4.4: Aufarbeitungsschema zur Quantifizierung von Daidzein in Human-Plasma.

4.10.6 Quantifizierung von Gesamt-Daidzein in Human-Urin per HPLC/UV

Die aufgetauten Urinproben wurden wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben enzymatisch gespalten. Die Inkubationslösungen der Spaltungen wurden zur Anreicherung von Daidzein auf eine wie oben beschrieben vorkonditionierte SPE-Säule gegeben. Dazu wurde die Säule mit der Inkubationslösung beladen und mit 2 mL des Acetatpuffers nachgewaschen. Die Probe wurde mit 2 mL Methanol eluiert und das Eluat in einem Reagenzglas aufgefangen. Das Lösungsmittel wurde bis zur Trockne eingengt, der Rückstand in 200 µL Methanol gelöst, anschließend 5 min bei 6000 U/min zentrifugiert und 50 µL des Überstandes in die HPLC injiziert (s.a. Abb. 4.5). Die Auftrennung und Detektion der Analyten erfolgte wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben per HPLC/UV (System A) bei der Wellenlänge von 249 nm, von allen eluierenden Verbindungen wurden im Bereich zwischen 220 und 400 nm UV-Spektren aufgenommen. Die Quantifizierung erfolgte mit einem internen Standard und einer Eichkurve von 0,5 bis 8 nmol Daidzein pro mL Urin.

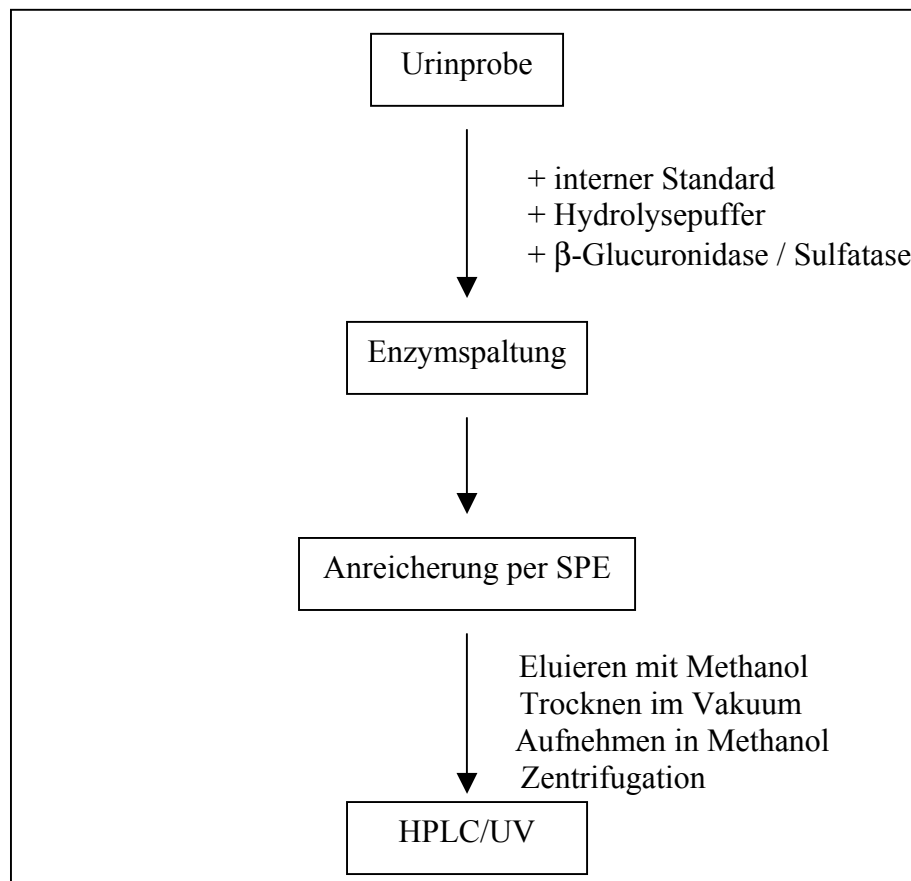


Abb. 4.5: Aufarbeitungsschema zur Quantifizierung von Daidzein in Human-Urin.

4.10.7 Quantifizierung von BPA in Rattenurin per HPLC/UV

Urinproben wurden direkt mittels HPLC/UV analysiert. Dazu wurden 100 μL Urin mit 10 μL HCl versetzt und 15 min auf 90°C erhitzt. Danach wurde mit Wasser auf 200 μL aufgefüllt, abzentrifugiert und 50 μL mit dem HPLC-System A (siehe Kapitel 4.2.2) aufgetrennt. Zur Vermeidung eventueller Kontaminationen (aus Kunststoffgefäßen) wurde die Probenvorbereitung in GC-Glasvials durchgeführt. Als Aufzeichnungswellenlängen wurden 226 nm und 276 nm für Bisphenol A und BPA-Glucuronid gewählt, von allen eluierenden Verbindungen wurden im Bereich zwischen 220 und 400 nm UV-Spektren aufgenommen. Die Quantifizierung erfolgte über eine Eichkurve von 10 bis 150 nmol Bisphenol A pro mL Urin. In Ermangelung eines authentischen Bisphenol A-Glucuronid-Standards wurde dieses, da die UV-Absorptionen vergleichbar waren, ebenfalls über die Eichgerade von Bisphenol A quantifiziert.

4.10.8 Quantifizierung von BPA in Rattenfaeces per HPLC/UV

Die tiefgefrorenen Faecesproben wurden gefriergetrocknet und das Trockengewicht bestimmt. Fein zermörserte Aliquots von 0,2 g wurden in verschlossenen Reagenzröhrchen mit 5 mL Ethylacetat 2 h gerührt und anschließend bei 6000 U/min zentrifugiert. Nach Evaporation des Überstandes *in vacuo* wurde in 2 mL Methanol aufgenommen. 100 μL davon wurden mit weiteren 100 μL Methanol verdünnt und die Proben nach erneuter Zentrifugation bei 6000 U/min wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben per HPLC/UV (System A) analysiert (s.a. Abb. 4.6). Als Aufzeichnungswellenlängen wurden 226 nm und 276 nm für Bisphenol A gewählt, von allen eluierenden Verbindungen wurden im Bereich zwischen 220 und 400 nm UV-Spektren aufgenommen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve von 0,75 bis 45 μmol Bisphenol A pro Gramm Faeces. Die Standards wurden hergestellt, indem die entsprechenden Mengen an BPA zu mit Wasser (1 mL) aufgeschlammten unbelasteten Faeces gegeben wurden und anschließend erneut lyophilisiert wurde.

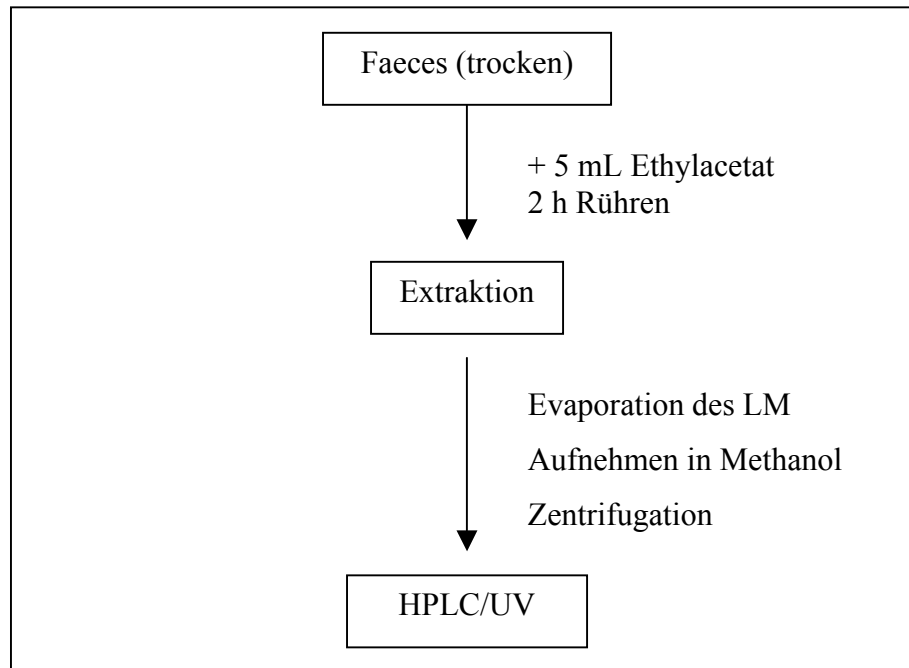


Abb. 4.6: Aufarbeitungsschema zur Quantifizierung von Bisphenol A in Ratten-Faeces.

4.10.9 Quantifizierung von Gesamt-BPA in Mausurin per GC/MS

Die aufgetauten Urinproben wurden wie in Kapitel 4.4.4 beschrieben enzymatisch gespalten. Anschließend wurden die Proben gefriergetrocknet. Die trockenen Proben wurden in Abweichung zu Abschnitt 4.3 wie folgt mit MBTFA derivatisiert: Die vollständig getrockneten Urinproben wurden mit 350 μL trockenem Acetonitril und 50 μL MBTFA versetzt, die Gläschen wieder verschlossen und die Proben nach fünfminütigem Durchmischen im Ultraschallbad 30 min bei 80 °C derivatisiert. Die Proben wurden vor der Messung zehn Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert. Die Detektion erfolgte unter den in Kapitel 4.2.1.1 beschriebenen analytischen Bedingungen per GC/MS bei negativer chemischer Ionisation im SIM-Modus über die spezifischen Massenfragmente m/z 323 für das flüchtige Derivat von Bisphenol A und m/z 337 für das Derivat des internen Standards d_{16} -BPA (das Injektionsvolumen betrug 2 μL ; s.a. Abb. 4.7). Die Quantifizierung erfolgte mit der Methode des internen Standards über eine Eichkurve von 0,08 bis 19 nmol Bisphenol A pro mL Urin.

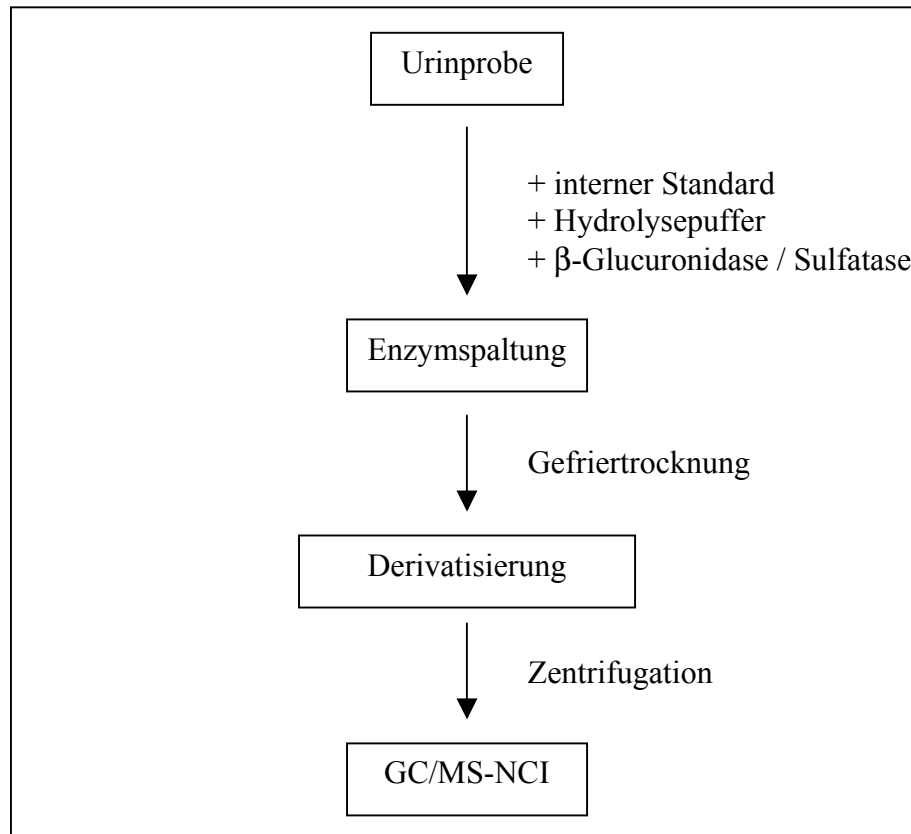


Abb. 4.7: Aufarbeitungsschema zur Quantifizierung von Bisphenol A in Maus-Urin.

4.10.10 Quantifizierung von BPA in Mausfaeces per HPLC/UV

Die tiefgefrorenen Faecesproben wurden lyophilisiert und das Trockengewicht notiert. Fein zerteilte Aliquots von 0,5 g (2 mg/kg KG Versuch) bzw. 0,25 g (20 mg/kg KG Versuch) wurden mit jeweils 5 mL Methanol versetzt, zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt und anschließend 36 h bei 37 °C im Schüttelbad extrahiert. 260 µL des Extraktes wurden mit 40 µL einer 4 µmol/mL enthaltenden methanolischen Lösung von Flavon als internem Standard versetzt. Die Proben wurden vor der Messung zehn Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert und 100 µL des Überstandes in die HPLC injiziert. Die Quantifizierung erfolgte wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben per HPLC/UV (System A) bei den Wellenlängen 226 nm und 276 nm für Bisphenol A und 250 nm für den internen Standard, von allen eluierenden Verbindungen wurden im Bereich zwischen 220 und 400 nm UV-Spektren aufgenommen (s.a. Abb. 4.8). Die Auswertung erfolgte über eine Eichkurve von 0,75 bis 7,5 µmol Bisphenol A pro Gramm getrocknete Faeces.

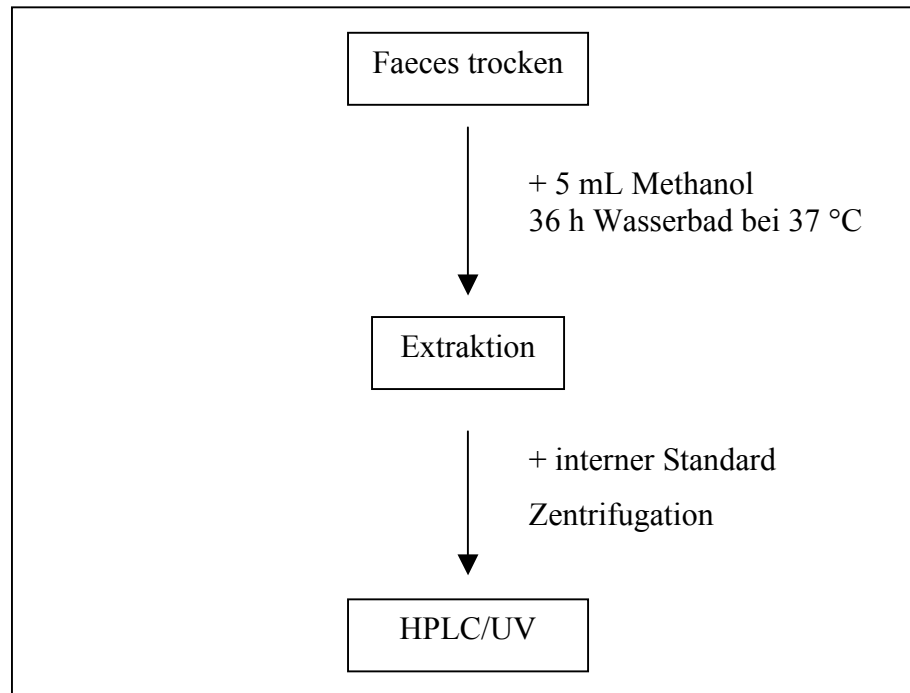


Abb. 4.8: Aufarbeitungsschema zur Quantifizierung von Bisphenol A in Maus-Faeces.

4.10.11 Quantifizierung von d_{16} -BPA in Human-Plasma nach Konjugatsspaltung

Die aufgetauten Plasmaproben wurden wie in Kapitel 4.4.5 beschrieben mit dem internen Standard versetzt und enzymatisch gespalten. Die Inkubationslösungen der Spaltungen wurden zur Abtrennung des Proteinanteiles bei Raumtemperatur 10 Minuten bei 6000 U/min zentrifugiert. Zur Anreicherung von d_{16} -BPA wurde der Überstand auf eine wie weiter oben beschrieben vorkonditionierte SPE-Säule gegeben. Dazu wurde die Säule mit der Inkubationslösung beladen und mit 1,5 mL des Acetatpuffers nachgewaschen. Die Probe wurde mit 1,5 mL Methanol eluiert und in einem GC-Vial aufgefangen. Das Lösungsmittel wurde bis zur Trockne eingeeengt und wie in Kapitel 4.3 beschrieben derivatisiert. Anschließend wurden die Proben mit 1 mL Acetonitril auf ein Endvolumen von 1,5 mL verdünnt. Die Quantifizierung erfolgte unter den in Kapitel 4.2.1.1 beschriebenen analytischen Bedingungen per GC/MS (System A) bei negativer chemischer Ionisation im SIM-Modus über die spezifischen Massenfragmente m/z 295 für das Derivat des internen Standards und m/z 337 für das Derivat von d_{16} -BPA (s.a. Abb. 4.9). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines internen Standards und einer Eichkurve von 10 bis 200 pmol d_{16} -Bisphenol A pro mL Plasma.

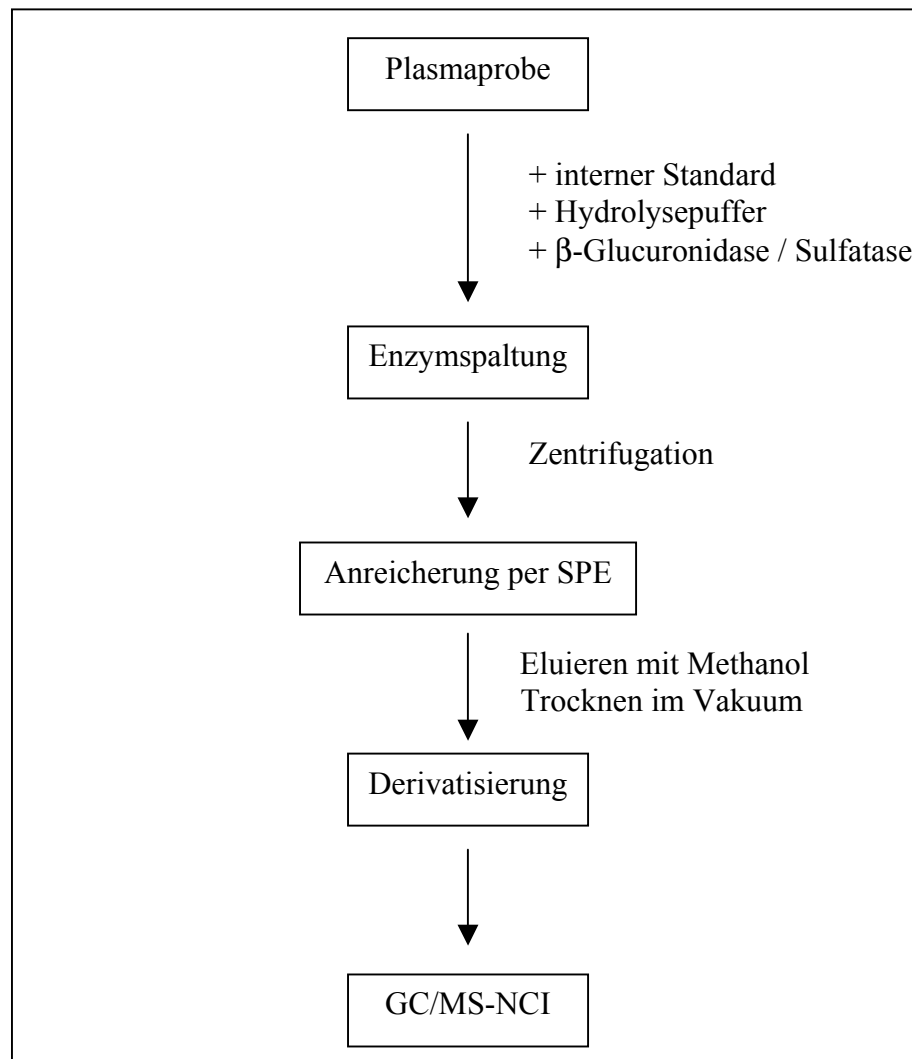


Abb. 4.9: Aufarbeitungsschema zur Quantifizierung von d₁₆-Bisphenol A in Human-Plasma.

4.10.12 Quantifizierung von d₁₆-BPA in Human-Urin nach Konjugatsspaltung

- mittels GC/MS-NCI

Die aufgetauten Urinproben wurden wie in Kapitel 4.4.6 beschrieben enzymatisch gespalten. Die Inkubationslösungen der Spaltungen wurden zur Anreicherung von d₁₆-BPA auf eine wie oben beschrieben vorkonditionierte SPE-Säule gegeben. Dazu wurde die Säule mit der Inkubationslösung beladen und mit 1,5 mL des Acetatpuffers nachgewaschen. Die Probe wurde mit 1,5 mL Methanol eluiert und in einem GC-Vial aufgefangen. Das Lösungsmittel wurde bis zur Trockne eingengt und wie in Abschnitt 4.3 beschrieben derivatisiert. Anschließend wurden die Proben mit 1 mL Acetonitril auf ein Endvolumen von 1,5 mL verdünnt (s.a. Abb. 4.10). Die Messung erfolgte unter den in Kapitel 4.2.1.1 beschriebenen analytischen Bedingungen per GC/MS (System A) bei

negativer chemischer Ionisation im SIM-Modus über die spezifischen Massenfragmente m/z 295 für das Derivat des internen Standards und m/z 337 für das Derivat von d_{16} -BPA. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines internen Standards und einer Eichkurve von 1 bis 6 nmol d_{16} -BPA pro mL Urin.

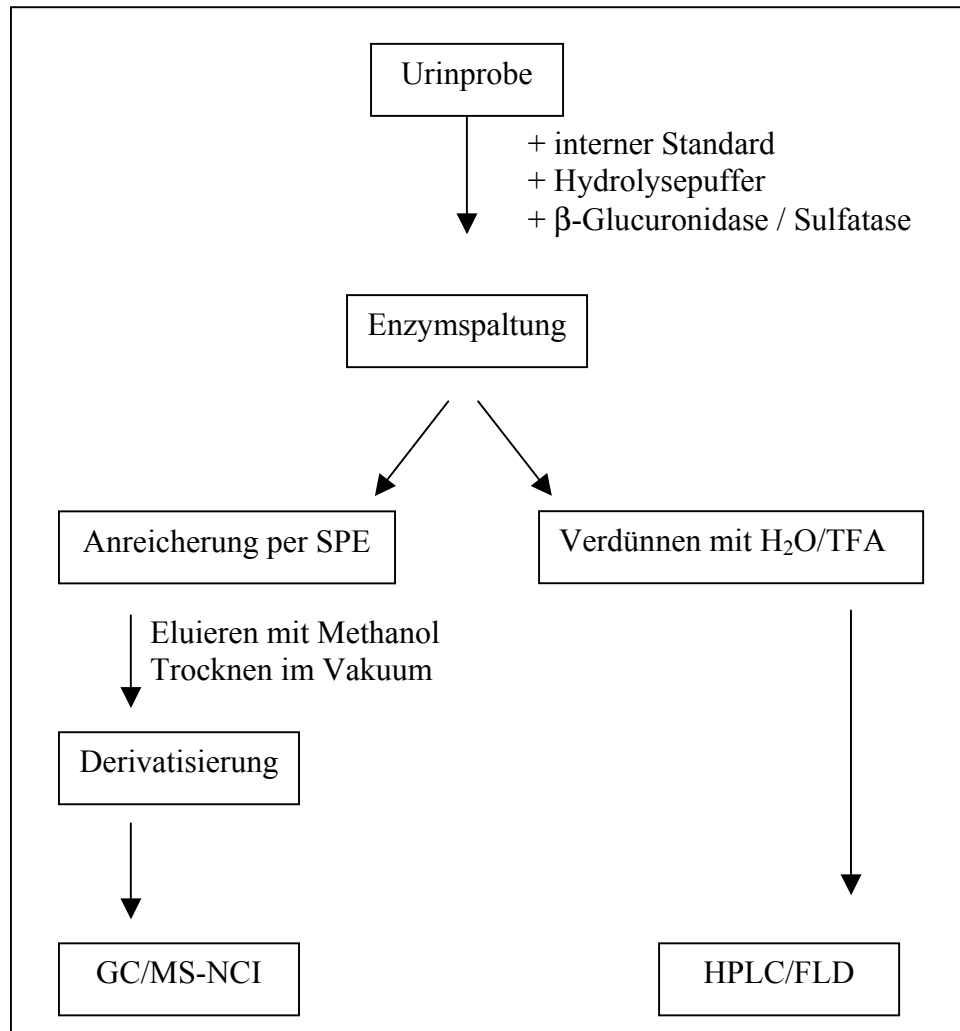


Abb. 4.10: Aufarbeitungsschema zur Quantifizierung von d_{16} -Bisphenol A in Human-Urin.

- mittels HPLC/FLD

Die aufgetauten Urinproben wurden wie in Kapitel 4.4.6 beschrieben enzymatisch gespalten. 50 μL der Inkubationslösungen wurden mit 200 μL H_2O /Trifluoressigsäure (TFA) (99,9/0,1; v/v) verdünnt und wie in 4.2.2 beschrieben analysiert. Die Detektion von d_{16} -BPA erfolgte bei der Anregungswellenlänge von 236 nm und der Emissionswellenlänge von 315 nm (s.a. Abb. 4.10). Die Quantifizierung erfolgte mit einem internen Standard und einer Eichkurve von 5 bis 80 nmol d_{16} -Bisphenol A pro mL Urin.

4.10.13 Bestimmung von d_{16} -BPA-Glucuronid in Human-Urin per HPLC/UV

Zu je 2 mL der aufgetauten Urinproben wurden in einem Glasreagenzglasröhrchen 25 μL einer 1,5 $\mu\text{mol/mL}$ enthaltenden Lösung von Flavon in Methanol als interner Standard gegeben und die Proben gemischt. Zur Anreicherung wurden die Proben auf eine wie oben beschrieben vorkonditionierte SPE-Säule gegeben. Dazu wurde die Säule mit der Probe beladen und mit 2 mL Acetatpuffer nachgewaschen. Die Proben wurden mit je 1,5 mL Methanol eluiert und das Eluat in einem GC-Vial aufgefangen. Das Lösungsmittel wurde bis zur Trockne eingeeengt und die trockenen Proben in 200 μL eines Wasser / Acetonitril (ACN)-Gemisches (1:1, v/v) aufgenommen. Die Analyse erfolgte wie in Abschnitt 4.2.2 per HPLC/UV (System A) beschrieben (s.a. Abb. 4.11). Als Aufzeichnungswellenlängen wurden 226 nm und 276 nm für d_{16} -Bisphenol A-Glucuronid und 294 nm für den internen Standard gewählt, von allen eluierenden Verbindungen wurden im Bereich zwischen 220 und 400 nm UV-Spektren aufgenommen. Die Quantifizierung erfolgte mit einem internen Standard über eine Eichkurve von 15 bis 100 nmol d_{16} -BPA pro mL Urin.

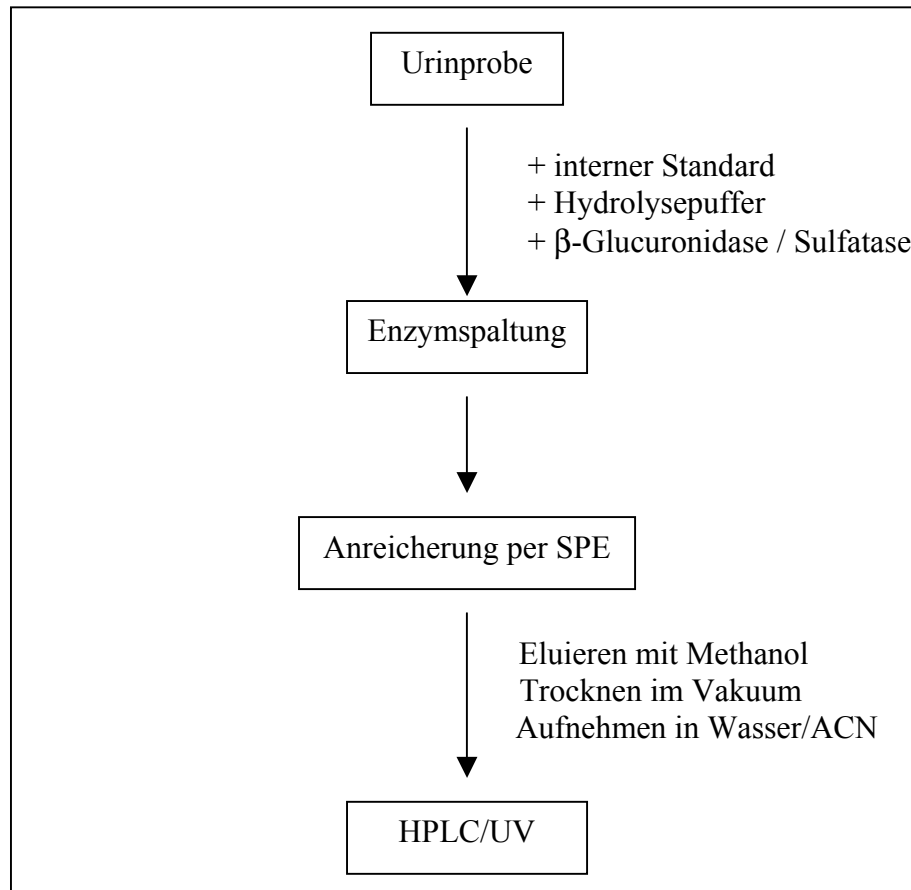


Abb. 4.11: Aufarbeitungsschema zur Bestimmung von d₁₆-Bisphenol A-Glucuronid in Human-Urin.

4.10.14 Quantifizierung von BPA in Human-Plasma nach Konjugatsspaltung

Die aufgetauten Plasmaproben wurden wie in Kapitel 4.4.5 für d₁₆-BPA beschrieben mit dem internen Standard versetzt und enzymatisch gespalten. Die Inkubationslösungen der Spaltungen wurden zur Abtrennung des Proteinanteiles bei Raumtemperatur 10 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Zur Anreicherung von BPA wurde der Überstand auf eine wie oben beschrieben vorkonditionierte SPE-Säule gegeben. Dazu wurde die Säule mit der Inkubationslösung beladen und mit 1,5 mL des Acetatpuffers nachgewaschen. Die Probe wurde mit 1,5 mL Methanol eluiert und in einem GC-Vial aufgefangen. Das Lösungsmittel wurde bis zur Trockne eingengt und wie unter Abschnitt 4.10.9 für die Maus beschrieben derivatisiert. Alternativ wurden die Proben mit 250 µL MBTFA ohne Lösungsmittelzusatz derivatisiert und anschließend mit zweimal 300 µL n-Hexan extrahiert. Die Detektion gelang unter den in Kapitel 4.2.1.1 beschriebenen analytischen Bedingungen per GC/MS (System A) bei negativer chemischer Ionisation im SIM-Modus über die spezifischen Massenfragmente m/z 295 für das Derivat des internen Standards und m/z 323 für das Derivat von BPA. Die

Quantifizierung erfolgte mit der Methode des internen Standards über eine Eichkurve von 10 bis 100 pmol BPA pro mL Plasma.

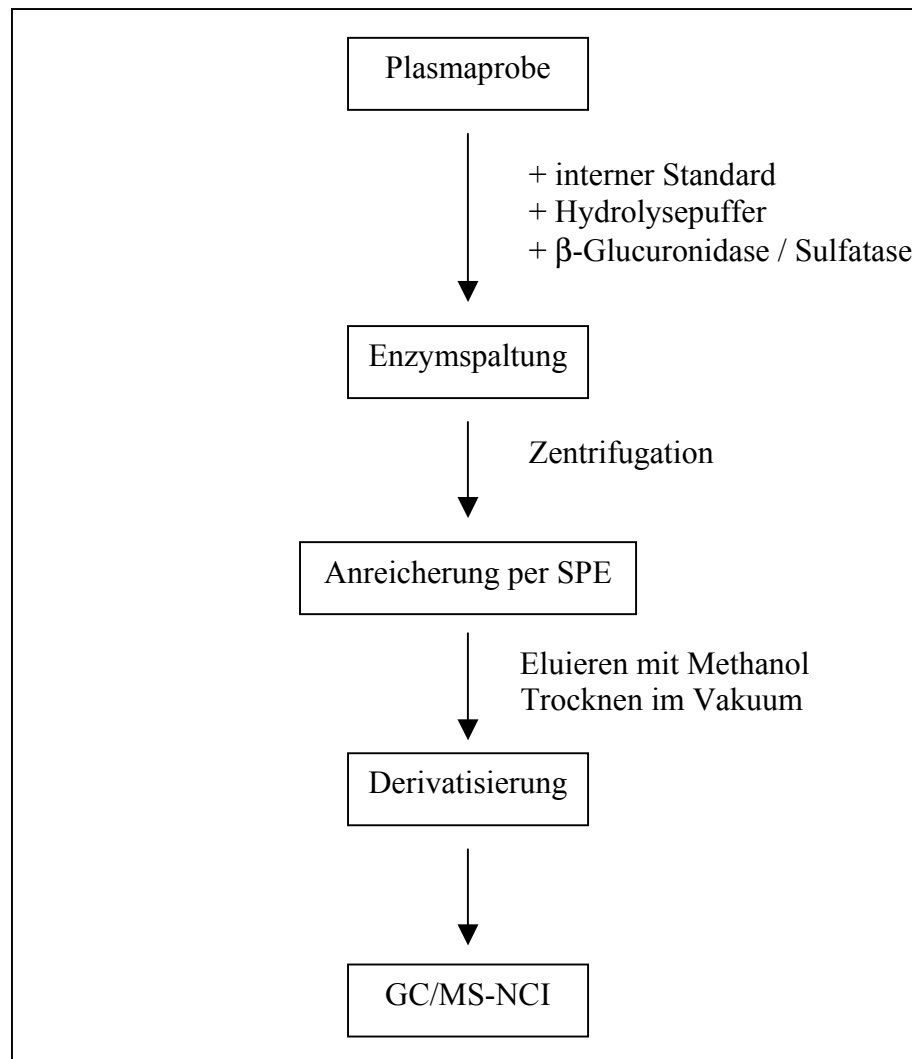


Abb. 4.12: Aufarbeitungsschema zur Quantifizierung von Bisphenol A in Human-Plasma.

5 Ergebnisse

5.1 Analytik

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Optimierung empfindlicher analytischer Nachweismethoden, die die verlässliche Bestimmung auch geringer Konzentrationen der beiden Modellsubstanzen in biologischen Matrices wie Blutplasma und Urin erlauben sollten. Neben der Ausarbeitung der Probenvorbereitung umfaßten die entwickelten analytischen Methoden die chromatographische Auftrennung der komplexen Matrixlösungen mittels Gaschromatographie (GC) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) sowie die Detektion der zu bestimmenden Probesubstanzen mit Massenspektrometrie (MS) und unter Verwendung von Ultraviolett- (UV) sowie Fluoreszenzdetektoren (FLD).

Um eine Verfälschung der Meßresultate durch unvollständige Spaltung der Konjugate beim Derivatisieren bzw. die thermische Spaltung der Konjugate im heißen Injektorblock des Gaschromatographen zu verhindern, wurden alle Humanproben während der Probenvorbereitung enzymatisch durch Glucuronidase/Sulfatase gespalten. Anschließend erfolgte eine Reinigung und Aufkonzentrierung der Proben durch eine Festphasenextraktion mittels SPE-Röhrchen.

Für die chromatographischen Systeme wurden alle variablen Parameter wie Fließ- und Elutionsmittel, Flußrate, Temperaturprogramm, Gradient in Hinblick auf Selektivität, Wiederfindung, Reproduzierbarkeit etc. optimiert; für die Detektion wurden charakteristische Wellenlängen (für UV oder FLD) oder spezifische Massenfragmente (MS) gewählt und eventuelle Meßschwankungen durch die Verwendung interner Standards ausgeglichen. Diese Methoden erlaubten eine sichere Quantifizierung der Analyten in humanen Urin- und Plasmaproben auch nach Gabe einer geringen Dosis (jeweils etwa 70-80 µg/kg KG) bis zu folgenden Konzentrationen:

Daidzein in Plasma: GC/MS-EI:	30 pmol/mL bei m/z 398 (entsprechend 240 fmol pro Injektionsvolumen von 2 µL)
Daidzein in Urin: HPLC/UV:	0,5 nmol/mL bei $\lambda = 249$ nm (entsprechend 2 nmol pro Injektionsvolumen von 50 µL)
d ₁₆ -BPA in Plasma: GC/MS-NCI:	10 pmol/mL bei m/z 337 (entsprechend 40 fmol pro Injektionsvolumen von 2 µL)

d_{16} -BPA in Urin: GC/MS-NCI:	1 nmol/mL bei m/z 337 (entsprechend 667 fmol pro Injektionsvolumen von 2 μ L). Der Nachweis war noch weitaus empfindlicher bis zu 25 pmol/mL Urin möglich. Die hohen Konzentrationen an BPA in humanen Urinproben machten bei der Quantifizierung jedoch eine so hohe Empfindlichkeit überflüssig.
d_{16} -BPA in Urin: HPLC/FLD:	5 nmol/mL bei Anregungswellenlänge $\lambda = 236$ nm und Emissionswellenlänge $\lambda = 315$ nm (entsprechend 16,7 pmol pro Injektionsvolumen von 50 μ L)
BPA in Plasma: GC/MS-NCI:	20 pmol/mL bei m/z 337 (entsprechend 80 fmol pro Injektionsvolumen von 2 μ L)

Im gewählten Konzentrationsbereich waren alle Eichgeraden linear mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 > 0,98$. Die Präzision der GC/MS-Methoden wurde durch wiederholtes Messen von Standardproben überprüft; die *intra-run*-Abweichungen (Wiederholbarkeit) lagen dabei zwischen 1 und 9 % je nach Konzentration. Die Richtigkeit (Präzision) der GC/MS-Methoden wurde ermittelt, indem die Konzentrationen der Eichstandards mit den Werten verglichen wurden, die sich ergaben, wenn man die Standards als Probe analysierte. Dabei ergaben sich Abweichungen der gemessenen von den wahren Konzentrationen zwischen 1 und 8 %.

Nachfolgend sind in den Abbildungen 5.1 und 5.2 beispielhaft Kalibrierungen für die Bestimmung von Daidzein bzw. d_{16} -BPA in menschlichen Proben dargestellt.

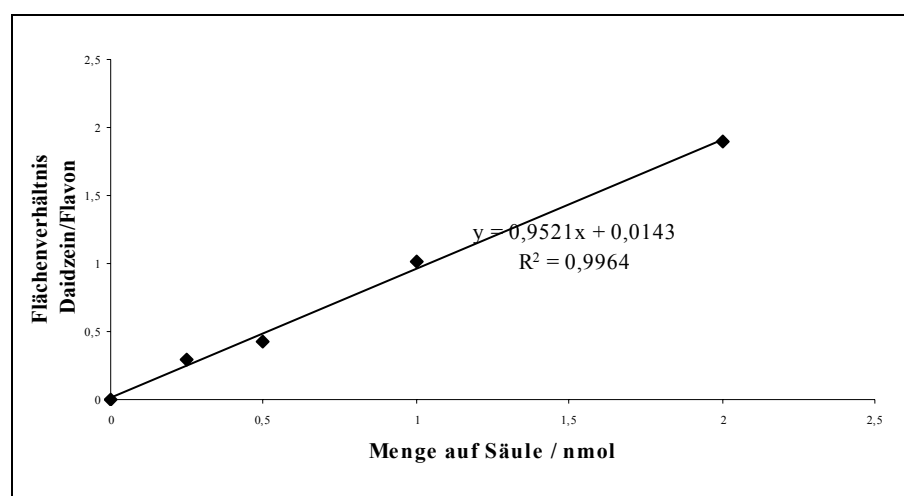


Abb. 5.1: Eichgerade zur Bestimmung von Daidzein Human-Urin per HPLC/UV. Da es sich um Einfachmessung handelte, wurden keine Standardabweichungen ermittelt.

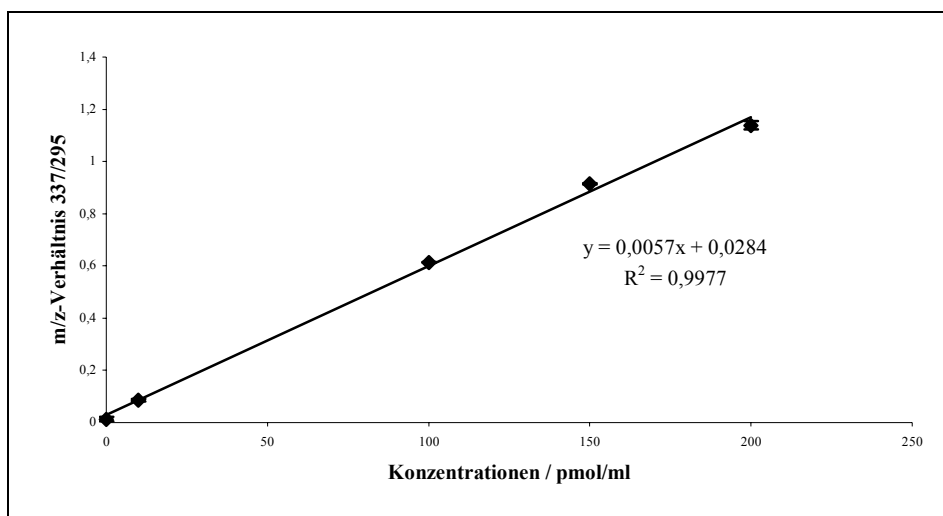


Abb. 5.2: Eichgerade zur Bestimmung von d_{16} -Bisphenol A in Human-Plasma per GC/MS-NCI. Die Standardabweichungen der Messung waren kleiner als die zeichnerische Auflösung.

Dreifache GC/MS-Detektion von d_{16} -BPA in Plasmaproben ergab bei nominal 10 pmol/ml $9,7 \pm 1,5$ pmol/ml, bei 100 pmol/ml $102,3 \pm 0,6$ pmol/ml und bei nominal 200 pmol/ml 197 ± 1 pmol/ml (jeweils Mittelwerte \pm Standardabweichungen). Für die Wiederholbarkeit ergaben sich bei vierfacher Bestimmung folgende Daten: bei nominal 10 pmol/ml $9,5 \pm 1,3$ pmol/ml, bei 100 pmol/ml $102,5 \pm 0,6$ pmol/ml und bei nominal 200 pmol/ml $195,8 \pm 2,6$ pmol/ml (jeweils Mittelwerte \pm Standardabweichungen).

5.1.1 Massenspektrometrie

- Umsetzung von Daidzein, O-DMA und Equol zu den entsprechenden Silylethern

Die phenolischen OH-Gruppen der beiden Verbindungen ließen sich entweder mit N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) oder mit einem Gemisch aus Trimethylchlorsilan (TMCS), Hexamethyldisilazan (HMDS) und Pyridin im Verhältnis 1:3:9 (v/v/v) in die entsprechenden leicht flüchtigen Trimethylsilylether umwandeln und für die gaschromatographische Untersuchung mittels GC/MS zugänglich machen. Abbildung 5.3 zeigt die entstehenden Trimethylsilylether. Durch die Einführung der Trimethylsilylgruppen und die dadurch entstehende Verschiebung der Analyten zu höheren Massen wird zudem die Selektivität für die jeweilige Verbindung erhöht. Mit GC/MS im „electron impact“ (EI) Modus (70 eV) ließen sich die entstehenden Derivate

sehr einfach nachweisen und mit sehr guter Empfindlichkeit quantifizieren. Zur Quantifizierung herangezogen wurden dabei im Single-Ion-Modus die Massenfragmente m/z 398 für Daidzein, m/z 388 für *O*-DMA und m/z 386 für Equol. Dies entsprach jeweils der doppelt derivatisierten Verbindung $[M-(TMS)_2]^+$.

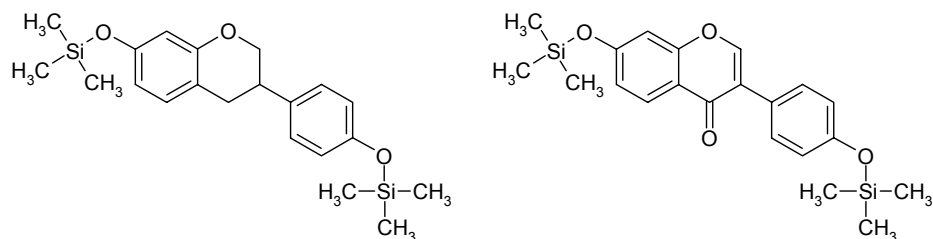


Abb. 5.3: Trimethylsilylderivate von Equol (links) und Daidzein.

- Umsetzung von Bisphenol A und d_{16} -Bisphenol A mit MBTFA

Die phenolischen OH-Gruppen der beiden Verbindungen ließen sich mit N-Methyl-bis-trifluoressigsäureester (MBTFA) in die entsprechenden leicht flüchtigen Trifluoressigsäureester umwandeln und damit für die gaschromatographische Untersuchung mittels GC/MS zugänglich machen. Abbildung 5.4 zeigt die Struktur der entstehenden Ester am Beispiel von Bisphenol A.

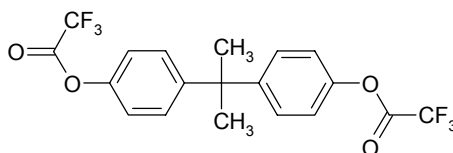


Abb. 5.4: Trifluoressigsäureester von Bisphenol A.

Wie schon bei der oben beschriebenen Silylierung wird auch hier durch die Einführung der $OCCF_3$ -Gruppe nicht nur die Flüchtigkeit der Verbindungen erhöht, sondern auch die Selektivität für die jeweilige Verbindung durch Verschiebung zu höheren Massenbereichen erhöht. Für die Derivatisierung der Urinproben erwies sich der Einsatz von Acetonitril als Lösungsmittel während der Derivatisierungsreaktion als unerlässlich. Mit GC/MS mit negativer chemischer Ionisation (NCI-Modus) ließen sich die entstehenden Derivate sehr einfach nachweisen und mit sehr guter Empfindlichkeit quantifizieren. Zur Quantifizierung herangezogen wurden dabei im Single-Ion-Modus die Massenfragmente m/z 323 für Bisphenol A bzw. m/z 337 für d_{16} -BPA. Dies entsprach jeweils der einfach derivatisierten

Verbindung $[M-OCCF_3]^-$, die zweite Trifluoracetylgruppe ging wahrscheinlich bereits im heißen Injektorblock verloren.

Die sichere Quantifizierung von Bisphenol A über das Massenfragment m/z 323 wurde im unteren Konzentrationsbereich durch das Vorhandensein einer Hintergrundbelastung gestört. In allen durchgeführten Leerproben (sowohl in Plasma als auch in Urin und ohne Matrix) konnte Bisphenol A entdeckt werden (s. Abb. 5.6). Dies läßt sich erklären über eine mögliche Kontamination der Proben einerseits bereits bei der Probenaufarbeitung (Verwendung von Plastikpipettenspitzen, Kunststoff-Verschlußkappen der MBTFA-Fläschchen), aber andererseits auch durch ein „Bluten“ der Septen des MS-Injektorblockes bei der gaschromatographischen Auftrennung. Mehrere Maßnahmen zur Reduktion dieser Hintergrundwerte waren nicht erfolgreich. So wurde das Derivatisierungsreagens vor Verwendung destilliert, um eine größtmögliche Reinheit zu gewährleisten. Eine Extraktion der Proben vor der Messung mit n-Hexan sollte überschüssiges MBTFA abtrennen; da jedoch bei der Derivatisierung der biologischen Proben auf die Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel nicht verzichtet werden konnte und sich diese Phasen nicht trennten, war eine Extraktion nicht praktikabel. Auch ein völliger Verzicht auf den Zusatz eines Derivatisierungsmittels wurde versucht, da sich Bisphenol A auch ohne Derivatisierung gaschromatographisch trennen läßt. Damit ließ sich allerdings die benötigte Empfindlichkeit nicht erreichen. Auch die Verwendung anderer Derivatisierungsmittel sowohl im EI- wie im NCI-Modus konnte die mit MBTFA-Derivatisierung erreichte Empfindlichkeit nicht erreichen. Weiterhin wurde von Kuch, H. M. und Ballschmiter, K., 2001) Bisphenol A auch in aufgereinigtem Millipore-Wasser gefunden, wie es in dieser Arbeit für die Herstellung von Pufferlösungen verwendet wurde. Um diese unvermeidliche Hintergrundbelastung zu minimieren, wurde letztendlich bei der Derivatisierung von Proben, in denen BPA bestimmt werden sollte, die Menge an MBTFA auf ein Minimum reduziert. Damit gelang es, die Blindwerte auf weniger als 20 fmol pro Injektionsvolumen (2 μ L) zu reduzieren.

Aufgrund der beschriebenen Hintergrundwerte lag die Bestimmungsgrenze (d.h. der Wert, ab dem eine sichere Quantifizierung gewährleistet war) von BPA in Mausurinproben (ermittelt über die siebenfache Standardabweichung der Leerprobe) bei 205 ± 80 pmol/mL Urin. Die Nachweisgrenze (ermittelt über die dreifache Standardabweichung der Leerprobe) lag bei 92 ± 37 pmol/mL Urin. Die dazugehörige Eichkurve ist in Abbildung 5.5 dargestellt. Ebenfalls aufgrund des Hintergrundes lag die Bestimmungsgrenze von BPA in humanen Plasmaproben (ermittelt über die siebenfache Standardabweichung der Leerprobe) etwas

schlechter als bei der deuterierten Verbindung bei etwa 20 pmol/mL Plasma (dazu s.a. Kapitel 5.12).

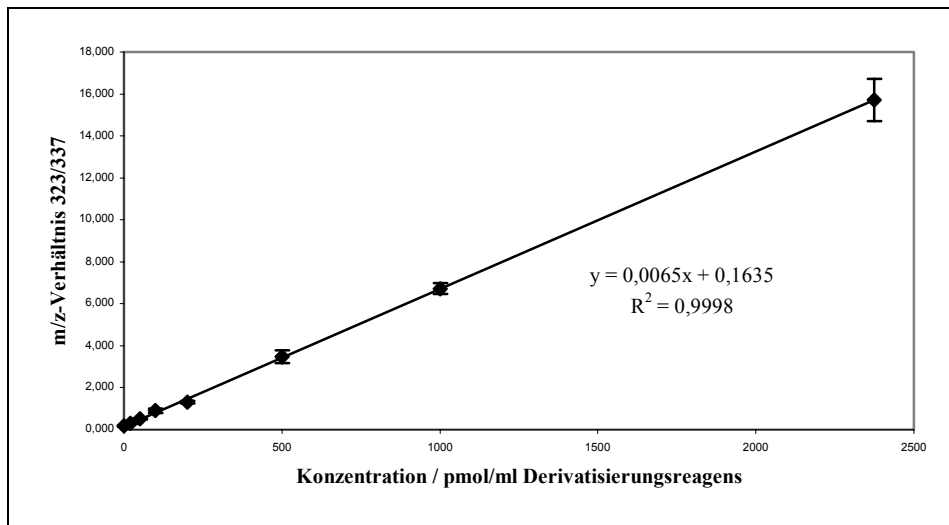


Abb. 5.5: Eichgerade zur Bestimmung von Bisphenol A in Maus-Urin per GC/MS-NCI.

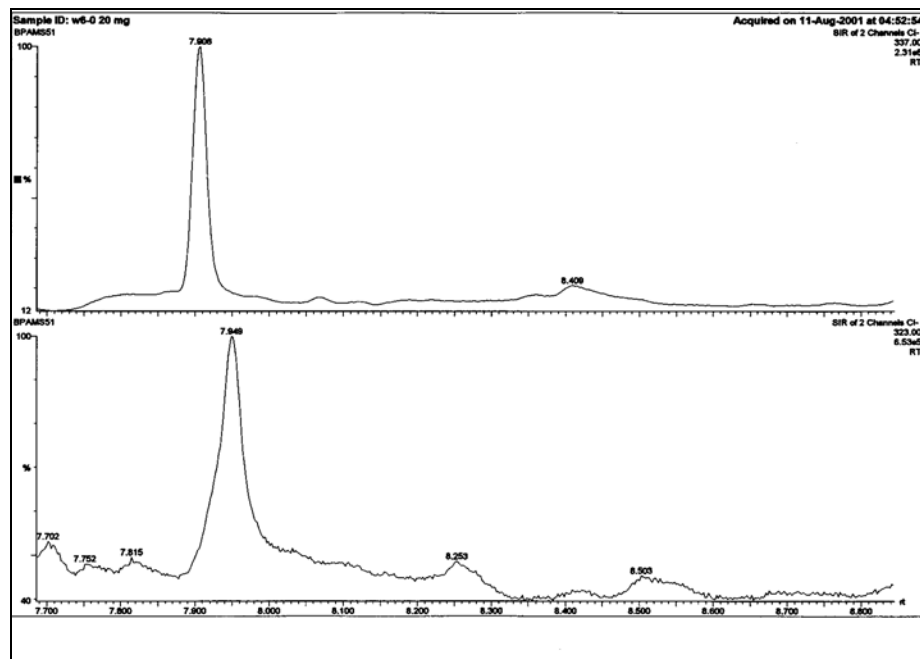


Abb. 5.6: Hintergrundbelastung durch Bisphenol A am Beispiel eines GC/MS-NCI Chromatogrammes einer Urinprobe einer nicht gegen BPA exponierten Ratte. Das obere Chromatogramm zeigt den internen Standard mit m/z 337, das untere Bisphenol A mit m/z 323. Analoge Chromatogramme ergaben sich bei Ersatz der Matrix Urin durch Wasser.

5.1.2 HPLC

Zur Quantifizierung der im Vergleich zu den Humanproben hoch konzentrierten Urin- und Faecesproben der in den Vorbereitungsstudien exponierten Ratten konnte wegen der UV-Absorption auf die Verwendung einer HPLC/UV-Methode (Diodenarraydetektor, DAD, System A) zurückgegriffen werden. Diese erlaubte die Auftrennung der Analyten und eine verlässliche Quantifizierung bis zu einer Konzentration von 25 nmol Daidzein bzw. 10 nmol BPA pro mL Urin und bis zu 750 nmol BPA pro Gramm Faeces, was bei einem Injektionsvolumen von jeweils 50 µL einer Nachweisgrenze von 250 pmol pro Injektion Daidzein und Bisphenol A in Urin bzw. von 1,9 nmol pro Injektion Bisphenol A in Faecesproben entsprach. Bei allen HPLC-Messungen wurden die Eichungen (Einmalmessung) unmittelbar vor der Messung der jeweiligen Probenserie durchgeführt.

Bei Verwendung eines Festwellenlängendetektors (HPLC-System B) konnte die Nachweisempfindlichkeit für Daidzein in Urin gesenkt auf 3,5 nmol/mL werden; in Faecesproben konnte Daidzein bis zu 400 nmol/g nachgewiesen werden. Dies entsprach bei einem Injektionsvolumen von jeweils 50 µL einer Nachweisgrenze von 4,5 pmol Daidzein pro Injektion in der Matrix Urin und von 200 pmol pro Injektion in der Matrix Faeces. Die Nachteile der HPLC-Methoden, wie lange Analysenzeiten und der dadurch begrenzte Probendurchsatz, wurden durch die einfache Probenvorbereitung ausgeglichen.

Die Quantifizierung von Daidzein in humanen Urinproben gelang per HPLC/UV (System A) bis zu einer Konzentration von 500 pmol/mL, was einer Bestimmungsgrenze von 250 pmol pro Injektionsvolumen von 50 µL entsprach. Durch die Möglichkeit der Detektion mittels Fluoreszenz konnte die Nachweisempfindlichkeit für d₁₆-Bisphenol A in Humanproben so weit optimiert werden, daß eine parallele Quantifizierung von freiem d₁₆-BPA und dem entsprechenden Glucuronid ermöglicht wurde. In Urinproben konnte so d₁₆-BPA bis zu einer Konzentration von 5 nmol/mL nachgewiesen werden, was einer Nachweisgrenze von 17 pmol pro Injektionsvolumen von 50 µL entsprach. Dabei wies d₁₆-Bisphenol A eine siebenfach bessere Quantenausbeute als das entsprechende Glucuronid in der Fluoreszenz auf.

Diese gute Empfindlichkeit erlaubte somit die Bestimmung von d₁₆-Bisphenol A in humanen Urinproben nach enzymatischer Spaltung mittels zweier unabhängiger Methoden und damit eine Überprüfung der Ergebnisse, die per GC/MS erhalten wurden.

5.2 „in vitro-Metabolismus“ von Daidzein - Inkubationen

Um eventuell in der Leber entstehende oxidative Metabolite zu identifizieren, wurde Daidzein *in vitro* mit Nager-Lebermikrosomen inkubiert. Auf eine gesonderte Positivkontrolle wurde verzichtet, da eine Überprüfung derselben Charge von Mikrosomen im Rahmen eines anderen Versuches am gleichen Tag die ordnungsgemäße Funktion belegte. Inkubationen wurden mit Lebermikrosomen bei verschiedenen Proteineinsätzen und Inkubationsdauern durchgeführt und die Reaktionsergebnisse nach Proteinabtrennung mit HPLV/UV überprüft. Dabei konnten keine Metaboliten nachgewiesen werden; als einzige Verbindung wurde durch Vergleich mit Standardsubstanz unverändertes Daidzein identifiziert. Diese *in vitro*-Untersuchung lieferte also keinen Hinweis auf eine ausgeprägte oxidative Metabolisierung in Ratten.

5.3 Biotransformation von Daidzein in Ratten

Zur Aufklärung der Biotransformation von Daidzein *in vivo* wurde Daidzein einmalig in einer Dosis von 100 mg/kg KG per Schlundsonde an eine männliche Fischer F344-Ratte verabreicht. Urinproben wurden nach 24 h und 48 h gesammelt und bis zur Messung tiefgefroren. Die Proben wurden per HPLC/UV analysiert. Dabei stellte sich heraus, daß schon in den Kontrollproben hohe Werte an Daidzein zu finden waren. Die Nachforschungen zu der Ursache dafür ergaben, daß diese Hintergrundbelastung von dem verwendeten Rattenstandardfutter verursacht worden war. Dieses wird auf Basis von Sojamehl hergestellt und kann bis zu 14 mg Daidzein pro 100 Gramm Futter enthalten (Boettger-Tong, H. *et al.*, 1998). Eigene Untersuchungen verschiedener im Institut verwendeter Futtersorten zeigten einen Gehalt an Daidzein von $13 \pm 3,4$ mg pro 100 Gramm Futter.

Abbildung 5.7 zeigt den Vergleich zweier Chromatogramme zum Zeitpunkt $t = 0$ h und zum Zeitpunkt $t = 24$ h. Wie sich nach Ende der Exposition herausstellte, konnte Daidzein schon in Urinproben vor Gabe der Substanz nachgewiesen werden. Dies ließ sich auf die Verwendung des Standard-Nagerfutters zurückführen, welches auf Basis von Sojamehl hergestellt wird. nd kann bis zu 14 mg Daidzein pro 100 Gramm Futter enthalten (Boettger-Tong, H. *et al.*, 1998). Eigene Untersuchungen verschiedener im Institut verwendeter Futtersorten zeigten einen Gehalt an Daidzein von $13 \pm 3,4$ mg pro 100 Gramm Futter. Man erkennt dennoch neben unverändertem Daidzein ($rt = 37,7$ min) eine neue Verbindung bei $rt = 31,8$ min, die bei $rt = 32,2$ min eluierende Verbindung konnte wegen des großen Hintergrundes an aus dem Rattenfutter stammendem Daidzein (und damit dessen Metaboliten) nicht eindeutig als

expositionsbedingte neue Verbindung definiert werden. Nach Behandlung der Urinproben mit Glucuronidase/Sulfatase bei 37 °C verschwanden beide Signale bei einem gleichzeitigen Zuwachs des Daidzein-Signals. Daher war davon auszugehen, daß es sich bei beiden Verbindungen um Konjugate von Daidzein handelte. Um eine exakte Aussage über die Anzahl und Art der Metaboliten treffen zu können, wurden weitere qualitative und quantitative Untersuchungen nach Gabe soja-armen Futters durchgeführt (s. unten).

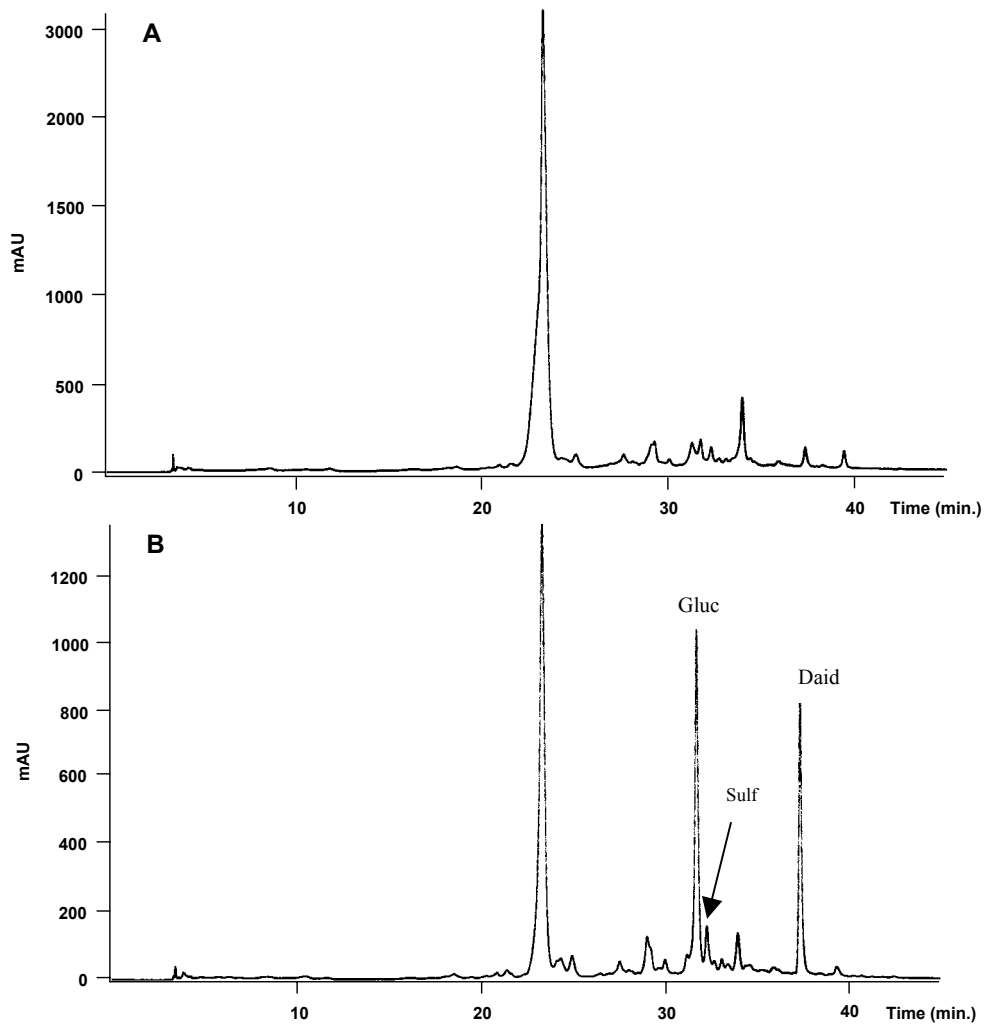


Abb. 5.7: HPLC-Chromatogramme (UV-Detektion) von Kontrollurin (A) und Urin einer mit Daidzein (100 mg/kg KG) behandelten männlichen Ratten. Neben unverändertem Daidzein ($rt = 37,7$ min) erkennt man die beiden Konjugate bei $rt = 31,8$ min (Glucuronid) und bei 32,2 min (Sulfat).

Die Durchführung der oralen Exposition von Ratten nach Fütterung mit sojafreiem und damit daidzeinarmem Futter (per HPLC-UV konnte kein Daidzein in den Futterproben nachgewiesen werden) erlaubte schließlich anhand des Vergleichs der Chromatogramme von Urinproben exponierter Tiere mit Kontrollproben die Identifizierung eines Metaboliten in der

weiblichen Ratte und die Bestätigung des Vorhandenseins zweier Metabolite in der männlichen Ratte. Abbildung 5.8 zeigt die HPLC/UV-Chromatogramme einer Urinprobe vor Gabe von Daidzein sowie jeweils einer 12 h-Probe einer weiblichen und einer männlichen Ratte.

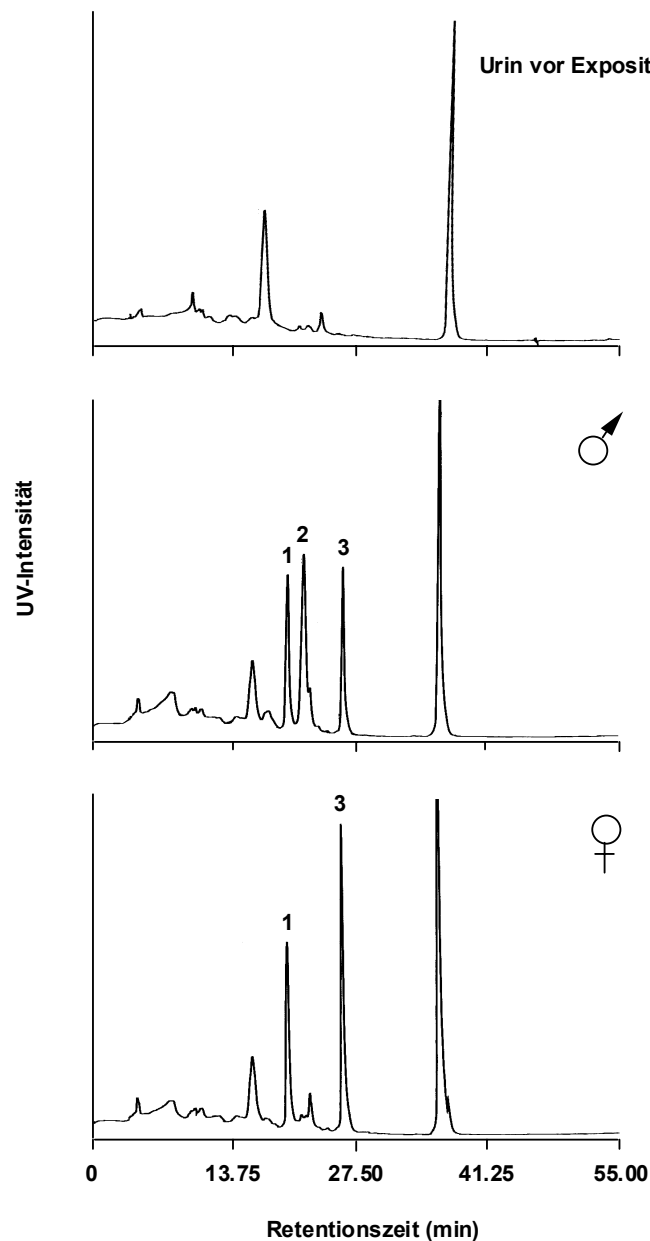


Abb. 5.8: HPLC-Trennungen je einer Urinprobe einer weiblichen und männlichen Ratte nach oraler Exposition mit Daidzein. Im Urin männlicher Tiere wurden neben unverändertem Daidzein (Signal 3) das Sulfat- (Signal 2) und das Glucuronidkonjugat (Signal 3) ausgeschieden, im Urin weiblicher Tiere fand sich nur Glucuronid (Signal 1). Das Signal bei 37,3 min entspricht dem internen Standard Flavon. Unterschiede zu Abb. 5.4 erklären sich aus der Verwendung unterschiedlicher HPLC-Apparaturen und Detektoren.

Zur Strukturaufklärung der gefundenen Verbindungen wurden die gebildeten Metaboliten per HPLC getrennt und durch die Aufnahme von LC/MS/MS-Spektren (Institut für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg) charakterisiert. Signal 3 zeigte ein Massenspektrum identisch mit dem von Daidzein; Signal 2, nur in männlichen Tieren gebildet, zeigte ein Molekülion bei m/z 335. Mit Kollisionsenergien von 30 eV wurde ein Fragment von m/z 255 (Daidzein, $[M+H]^+$) gebildet (s. Abb. 5.9). Diese Fragmentierung zeigte, daß der Metabolit ein Sulfat von Daidzein darstellt (die Differenz von 80 Masseneinheiten entspricht der Sulfatgruppe). Die Strukturzuordnung wird auch dadurch bestätigt, daß der Metabolit durch Glucuronidase/Sulfatase in Daidzein umgewandelt werden konnte. Signal 1 zeigte im Elektrospray-Massenspektrum ein Molekülion mit m/z 431, das bei einer Kollisionsenergie von 15 eV zu einem Fragment von m/z 255 (Daidzein, $[M+H]^+$) zerfiel (s. Abb. 5.9). Diese Fragmentierung deutete darauf hin, daß der Metabolit ein Glucuronid von Daidzein darstellte (die Differenz von 176 Masseneinheiten entspricht der Glucuronsäuregruppe). Diese Verbindung konnte durch enzymatische Spaltung ebenfalls in Daidzein umgewandelt werden.

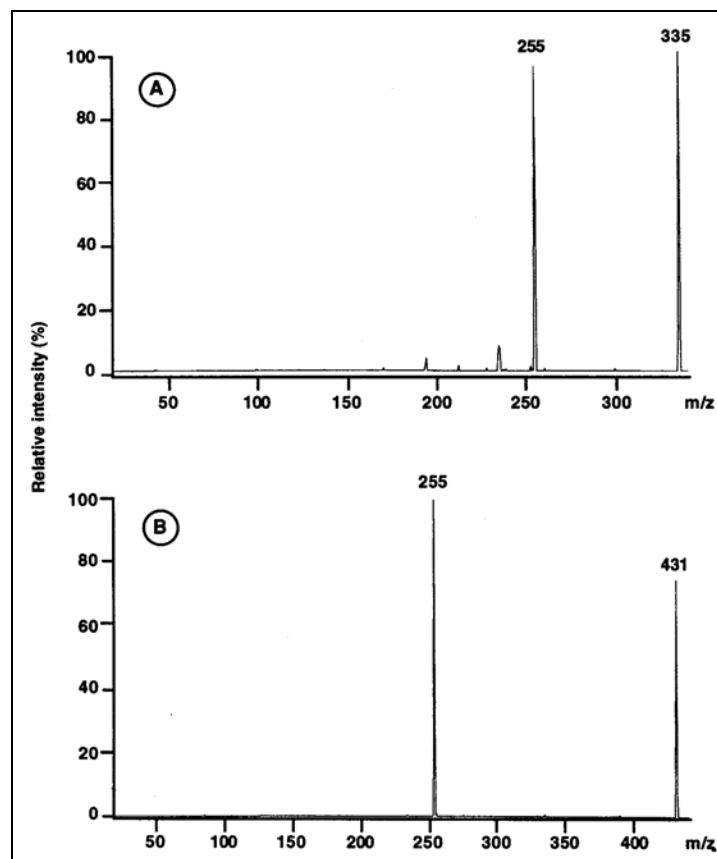


Abb. 5.9: ES-MS-Spektren von Daidzein-Metaboliten. Spektrum A zeigt die Fragmentierung von Signal 2. Der Verlust von 80 Masseneinheiten zeigt die Sulfatgruppe an. Spektrum B zeigt die Fragmentierung von Signal 1. Der Verlust von 176 Masseneinheiten zeigt die Glucuronidgruppe an.

Die Identifizierung eventueller Metabolite von Daidzein in Faecesproben wurden in der ersten Exposition wie bereits oben beschrieben durch Gabe des daidzeinhaltigen Standardfutters erschwert. Dadurch war es unmöglich, einfach anhand des Vergleichs zweier Chromatogramme (Probe vor Exposition vs. Probe nach Exposition) ein Metabolitenmuster zu erkennen; schon in Proben, die vor Expositionsbeginn genommen worden waren, konnte etwa 1 $\mu\text{mol/g}$ Faeces Daidzein nachgewiesen werden. Zwar ließ sich nach Exposition eine erhöhte Ausscheidung von Daidzein feststellen, eine Quantifizierung wurde jedoch dadurch erschwert, daß die Ratten das pulverisierte Standardfutter beim Fressen im Käfig verteilten und dieses (mit seinen hohen Gehalten an Daidzein) auch in den Sammelbehältern für Faecesproben landete.

Um eine Aussage über die Art und das Ausmaß der Metabolisierung von Daidzein in Faecesproben treffen zu können, wurde eine Exposition unter Fütterung sojafreien Futters durchgeführt. Nach Extraktion der getrockneten Faeces-Proben wurden diese sowohl per HPLC/UV als auch per GC/MS analysiert. Neben unverändertem Daidzein konnten per GC/MS nach Silylierung zwei durch Reduktion entstandene Metaboliten - Equol und *O*-DMA - identifiziert werden (s. Abb. 5.10). Die Identifizierung erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit den Trimethylsilylethern der Referenzsubstanzen. Dabei wies Equol das spezifische Massenfragment m/z 386 ($[\text{M-TMS}]^+$) auf, *O*-DMA das spezifische Massenfragment m/z 388 ($[\text{M-TMS}]^+$). Diese beiden Verbindungen konnten in den genommenen Urinproben auch per GC/MS nicht nachgewiesen werden.

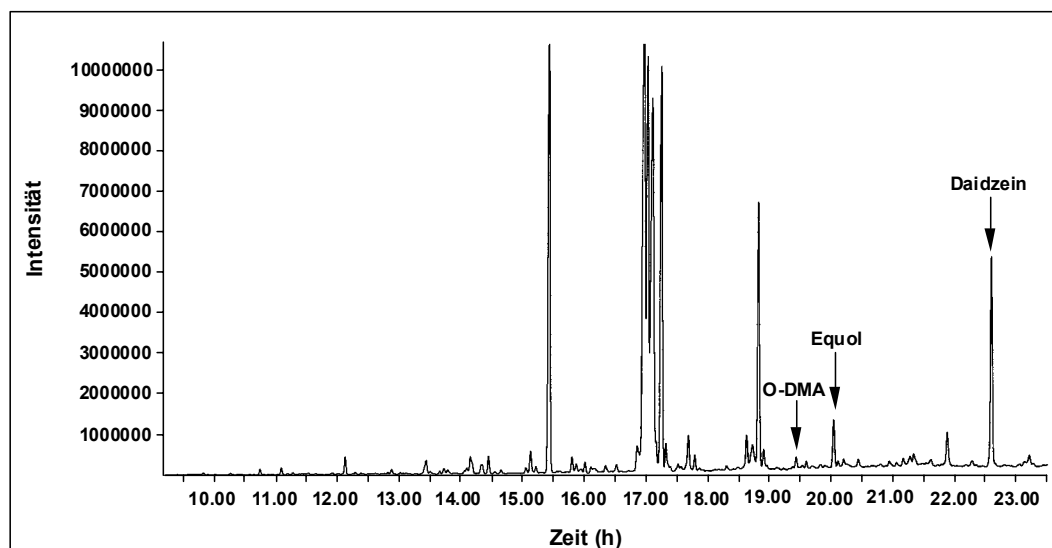


Abb. 5.10: Gaschromatographische Trennung einer Faecesprobe nach Silylierung. Neben unverändertem Daidzein wurden durch Vergleich mit authentischen Standards Equol und *O*-DMA identifiziert.

Die *in vivo*-Untersuchung lieferte ebenso wie die durchgeführten Inkubationen in Lebermikrosomen keinen Hinweis auf einen oxidativen Metabolismus von Daidzein in Ratten. Daidzein wurde in der Ratte effektiv in einem Phase II-Metabolismus konjugiert, in geringem Umfang fand ein reduktiver Abbau im Darm zu Equol und *O*-DMA statt.

5.4 Toxikokinetik von Daidzein in Ratten

Um die in der vorhergehenden Studie erlangten Kenntnisse zu vertiefen und durch Ausschluß einer Hintergrundbelastung von Daidzein aus dem Futter genaue Daten zur Toxikokinetik zu erhalten, wurden fünf männliche und fünf weibliche Fischer F344-Ratten mit jeweils 100 mg/kg KG Daidzein peroral exponiert. Bei der Untersuchung der Urinproben wurde eine männliche Ratte als Ausreißer identifiziert und bei der folgenden Auswertung nicht weiter berücksichtigt. Um dennoch gleiche Gruppengrößen zu erhalten, wurde eine weibliche Ratte ebenfalls aus dem Versuch genommen. Zur Vermeidung einer Hintergrundbelastung durch mit der Nahrung aufgenommenes Daidzein wurden die Ratten eine Woche vor Exposition und während des Versuches mit soja-armem Futter gefüttert. In der verwendeten Futtermischung konnte Daidzein nicht nachgewiesen werden, ebenso zeigten sich im vor der Exposition gesammelten Urin der Versuchstiere keine Hinweise auf eine Anwesenheit von Daidzein oder seiner Konjugate und Metaboliten. Auf diesem Wege war es nun möglich, die Anwesenheit der in Kapitel 5.3 beschriebenen Metabolite zu bestätigen und ihre Identifizierung per LC/MS/MS zu gewährleisten (s. dort). Die Auftrennung und Quantifizierung der nach der Exposition erhaltenen Urinproben und Faecesproben erfolgte per HPLC/UV.

5.4.1 Urin

Nur ein geringer Anteil der applizierten Dosis konnte als unveränderte Substanz im Urin wiedergefunden werden. Hauptmetabolit im Urin war das Glucuronid von Daidzein, in der männlichen Ratte wurde zudem das Sulfatkonjugat von Daidzein ausgeschieden. Die Ausscheidung von Daidzein und seinen Metaboliten mit dem Urin erfolgte schnell; die Konzentrationen der quantifizierten Verbindungen lagen in allen Urinproben, die 30 h nach Exposition und später genommen wurden, unter der Nachweisgrenze. Im Urin ließen sich hauptsächlich Phase II-Konjugate nachweisen - die geringen Mengen an unkonjugierter Substanz ließen sich auf die geringe Wasserlöslichkeit von Daidzein zurückführen. Im

nachfolgenden werden die toxikokinetischen Daten für die drei im Urin gefundenen Verbindungen zusammengefaßt.

Ausscheidung von Daidzein

Die Ausscheidung von freiem Daidzein mit dem Urin ist in Abbildung 5.11 nach Geschlechtern getrennt graphisch dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte der ausgeschiedenen Mengen \pm der Standardabweichungen.

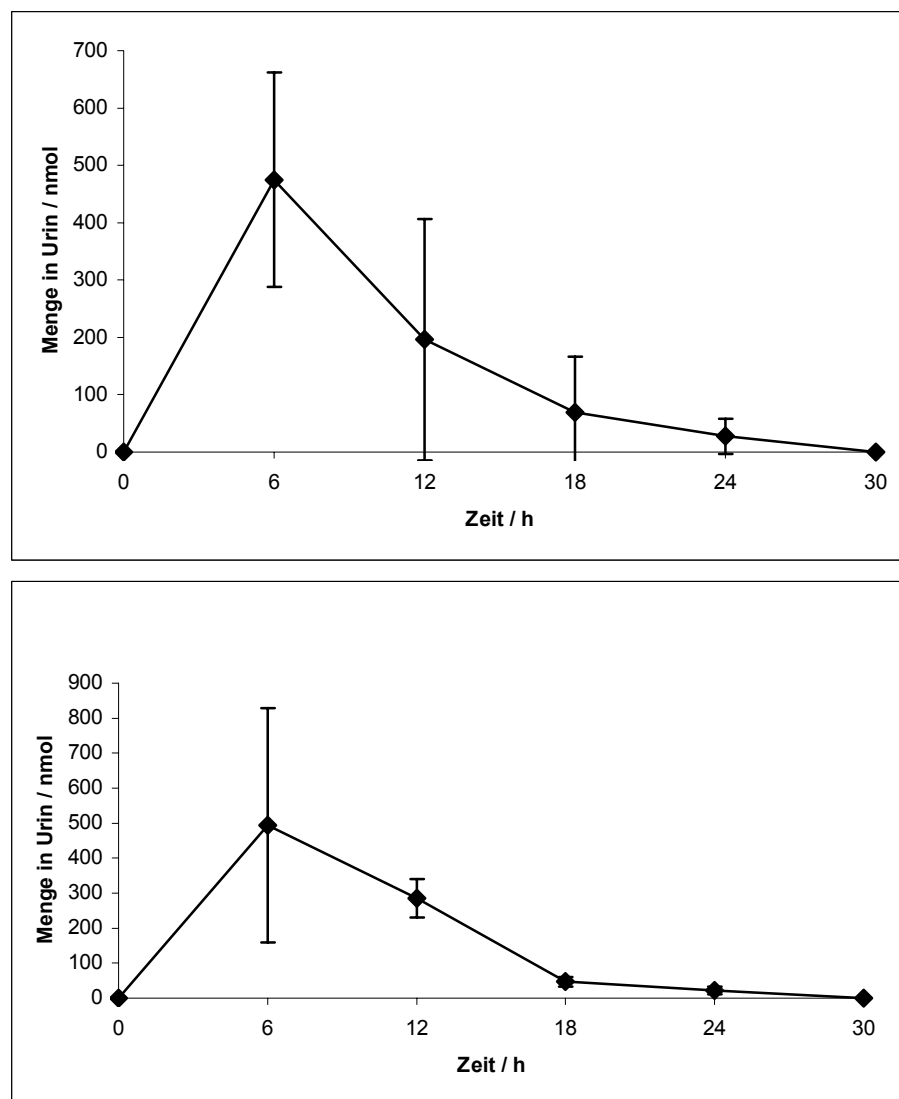


Abb. 5.11: Elimination von Daidzein mit dem Urin von jeweils vier Ratten nach oraler Gabe. Die obere Kurve zeigt die Elimination in weiblichen Ratten, die untere in männlichen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Man erkennt, daß die maximale Konzentration an Daidzein bereits nach sechs Stunden erreicht wurde. Die Elimination mit dem Urin verlief schnell mit einer Halbwertszeit von

$t_{1/2} = 4,3 \pm 0,6$ h in weiblichen Ratten bzw. $3,7 \pm 0,8$ h in männlichen Ratten; nach spätestens 30 h wurde die Nachweisgrenze erreicht. Die Summe der mit dem Urin ausgeschiedenen Mengen an Daidzein betrug $1,2 \pm 0,6$ % der gegebenen Dosis in weiblichen und $0,7 \pm 0,3$ % in männlichen Ratten. Im Urin der Ratten vor der Exposition sowie in Proben, die später als 24 h nach Gabe von Daidzein genommen wurden, konnte kein Daidzein nachgewiesen werden.

Ausscheidung von Daidzein-Glucuronid

Hauptmetabolit in der weiblichen Ratte war Daidzein-Glucuronid. In der männlichen Ratte wurde ebenfalls als bedeutender Metabolit das Glucuronid identifiziert, jedoch war die Menge im Vergleich zur weiblichen Ratte geringer, da die Sulfatierung in der männlichen Ratte überwog.

Die Ausscheidung von Daidzein-Glucuronid mit dem Urin ist in Abbildung 5.12 nach Geschlechtern getrennt graphisch dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte der ausgeschiedenen Mengen \pm der Standardabweichungen.

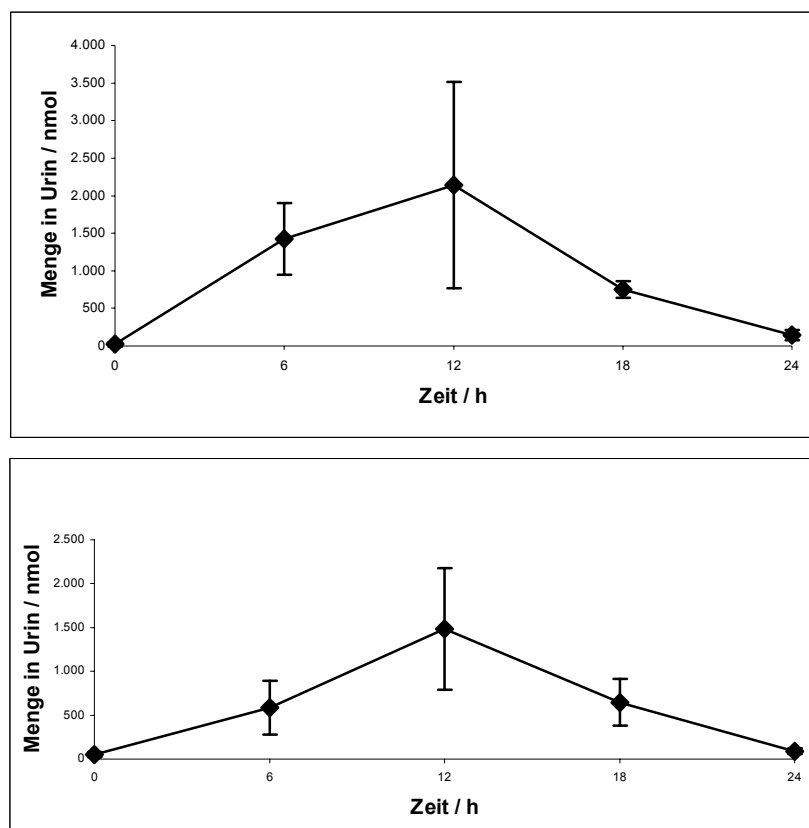


Abb. 5.12: Elimination von Daidzein-Glucuronid mit dem Urin von jeweils vier Ratten nach oraler Gabe. Die obere Kurve zeigt die Elimination in weiblichen Ratten, die untere in männlichen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Man erkennt, daß die maximale Konzentration an Daidzein-Glucuronid im Vergleich zu freiem Daidzein etwas später erreicht wurde. Die Elimination mit dem Urin verlief ebenfalls schnell mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 3,1 \pm 1,1$ h in weiblichen Ratten bzw. 3 ± 1 h in männlichen Ratten; nach spätestens 24 h wurde die Nachweisgrenze erreicht. Die Summe der mit dem Urin ausgeschiedenen Menge an Daidzein-Glucuronid betrug $6,7 \pm 2,7$ % der gegebenen Dosis in weiblichen und $2,5 \pm 0,8$ % in männlichen Ratten. Im Urin der Ratten vor der Exposition sowie in Proben, die später als 24 h nach Gabe von Daidzein genommen wurden, konnte kein Daidzein-Glucuronid nachgewiesen werden.

Ausscheidung von Daidzein-Sulfat

Hauptmetabolit in der männlichen Ratte war das Sulfatkonjugat von Daidzein. In der weiblichen Ratte konnte dieses Konjugat nicht nachgewiesen werden.

Die Ausscheidung von Daidzein-Sulfat mit dem Urin ist in Abbildung 5.13 graphisch dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte der ausgeschiedenen Mengen \pm der Standardabweichungen.

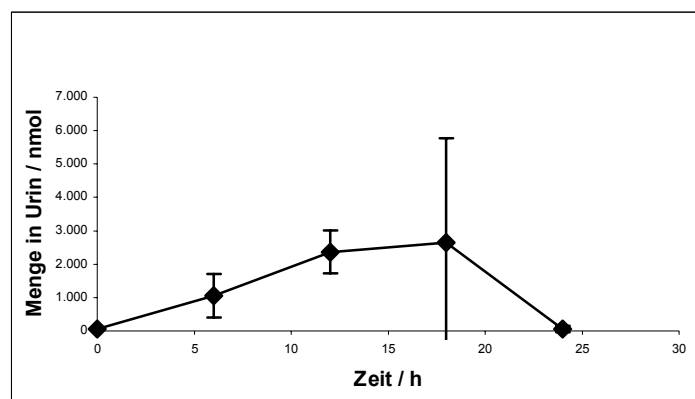


Abb. 5.13: Elimination von Daidzein-Sulfat mit dem Urin von vier männlichen Ratten nach oraler Gabe. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Man erkennt, daß die maximale Konzentration an Daidzein-Sulfat im Vergleich zu freiem Daidzein ebenfalls später erreicht wurde. Die Elimination mit dem Urin verlief ebenfalls schnell mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 1,2 \pm 0,8$ h; nach spätestens 24 h wurde die Nachweisgrenze erreicht. Die Summe der mit dem Urin ausgeschiedenen Menge an Daidzein-Sulfat betrug $5,5 \pm 2,7$ % der gegebenen Dosis. Im Urin der Ratten vor der Exposition sowie in Proben, die später als 24 h nach Gabe von Daidzein genommen wurden, konnte kein Daidzein-Sulfat nachgewiesen werden.

5.4.2 Faeces

Der größte Teil der applizierten Dosis wurde wie bereits im ersten Versuch vermutet in den Faeces wiedergefunden. Auch die Ausscheidung über die Faeces verlief schnell; in allen Faecesproben die 36 h nach Gabe und später genommen wurden, lagen die Daidzeinkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze.

Wie in Kapitel 5.3 beschrieben, wurde Daidzein in der Darmflora der Ratte in geringem Ausmaß zu Equol und *O*-Desmethylangolensin reduziert. Wegen der geringen gefundenen Mengen (< 1 % der applizierten Dosis an Daidzein) und dem großen Arbeitsaufwand für die Probenvorbereitung wurden diese jedoch nur qualitativ in den Proben identifiziert, auf eine quantitative Auswertung wurde verzichtet.

Die Ausscheidung von Daidzein über die Faeces ist in Abbildung 5.14 nach Geschlechtern getrennt graphisch dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte der ausgeschiedenen Mengen mit den entsprechenden Standardabweichungen.

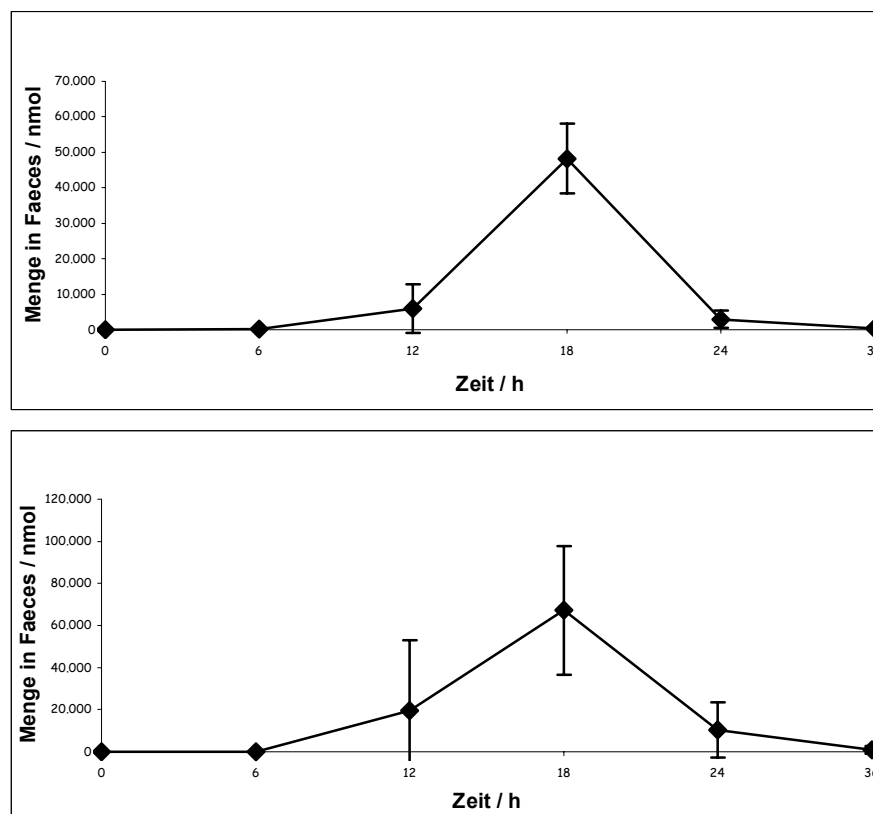


Abb. 5.14: Elimination von Daidzein über die Faeces von jeweils vier Ratten nach oraler Gabe. Die obere Kurve zeigt die Elimination in weiblichen Ratten, die untere in männlichen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Man erkennt, daß die maximale Konzentration an Daidzein in den Faeces nach 18 Stunden erreicht wurde. Die Elimination über die Faeces verlief schnell mit einer „scheinbaren“ Halbwertszeit von $t_{1/2} = 2,7 \pm 0,2$ h in weiblichen Ratten bzw. $3,2 \pm 0,4$ h in männlichen Ratten; spätestens nach 24 h wurde die Nachweisgrenze erreicht. Die Summe der über die Faeces ausgeschiedenen Menge an Daidzein betrug $94,2 \pm 16,3$ % der gegebenen Dosis in weiblichen und 95 ± 18 % in männlichen Ratten. In Faecesproben der Ratten vor der Exposition sowie in Proben, die später als 24 h nach Gabe von Daidzein genommen wurden, konnte kein Daidzein nachgewiesen werden.

5.4.3 Gesamtausscheidung - Übersicht

Im folgenden wird noch einmal die Ausscheidung von Daidzein und seinen Konjugaten über die verschiedenen Wege quantitativ zusammengefaßt. In beiden Geschlechtern wurde nur eine geringe Menge an freiem Daidzein mit dem Urin ausgeschieden. Der Hauptmetabolit im Urin bei der weiblichen Ratte war das Monoglucuronid, in der männlichen Ratte wurde zusätzlich in noch größerem Ausmaße das Sulfat-Konjugat gefunden. In beiden Geschlechtern wird der größte Anteil der gegebenen Dosis in den Faeces wiedergefunden. Die Ausscheidung erfolgt in beiden Geschlechtern ebenfalls sehr schnell, nach 30 (Urin) bis 36 (Faeces) Stunden wurde die Nachweisgrenze erreicht.

Tabelle 5.1 gibt einen Überblick über die mit dem Urin und über die Faeces ausgeschiedenen Gesamtmengen an Daidzein und seinen Konjugaten, die während der Sammelperiode ausgeschieden wurden, sowie über die Halbwertszeiten der Elimination der entsprechenden Verbindungen.

Tab. 5.1: Übersicht über die Gesamtmenge an Daidzein und der quantifizierten Metabolite im Urin von Ratten, des jeweiligen Anteils an der gegebenen Dosis und der Halbwertszeiten der Ausscheidung der jeweiligen Verbindungen.

männliche Ratten	Mittelwert in % der Dosis	Halbwertszeit $t_{1/2}$ / h
Summe Daidzein	0,73 ± 0,31	3,70 ± 0,77
Glucuronid	2,51 ± 0,76	2,96 ± 0,95
Sulfat	5,49 ± 2,74	1,17 ± 0,84
% der Gabe in Urin	8,8 ± 3,1	
% der Gabe in Faeces	86,2 ± 20,2	
% der Gabe gesamt	95,0 ± 18	

weibliche Ratten	Mittelwert in % der Dosis	Halbwertszeit $t_{1/2}$ / h
Summe Daidzein	1,19 ± 0,6	4,34 ± 0,59
Glucuronid	6,72 ± 2,69	3,11 ± 1,12
% der Gabe in Urin	7,9 ± 2,8	
% der Gabe in Faeces	86,3 ± 14	
% der Gabe gesamt	94,2 ± 16,3	

5.5 Biotransformation und Toxikokinetik von Daidzein im Menschen

Basierend auf den Ergebnissen der Studien zur Biotransformation und Ausscheidung von Daidzein in der Ratte wurde sechs Freiwilligen gegen acht Uhr morgens je 5 mg Daidzein in einer Hartgelatine kapsel auf nüchternen Magen verabreicht. Die Freiwilligen verzichteten für drei Tage vor der Applikation von Daidzein auf Nahrungsmittel auf Sojabasis, für die ein höherer Gehalt an Daidzein bekannt ist. Nach der oralen Gabe wurden Blut- und Urinproben in regelmäßigen Abständen genommen und der Gehalt an Daidzein und seinen Konjugaten gemessen.

5.5.1 Plasma

Wegen der geringen Wasserlöslichkeit von Daidzein sowie anhand der durch den Tierversuch erworbenen Kenntnisse zu Daidzein war zu erwarten, daß die Konzentrationen an freiem Daidzein sehr gering sein würden und die Substanz daher vor allem in Form ihrer Konjugate im Plasma vorliegen sollte. Daher wurde in Plasma der Gehalt an Gesamt-Daidzein nach enzymatischer Spaltung per GC/MS-EI bestimmt. Die Elimination von Daidzein aus dem Plasma der Probanden ist in Abbildung 5.15 dargestellt, angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Plasmakonzentrationen. Im Plasma der Probanden vor Beginn der Exposition konnte kein Daidzein nachgewiesen werden, die Nachweisgrenze in Plasma wurde 48 h nach Expositionsbeginn erreicht.

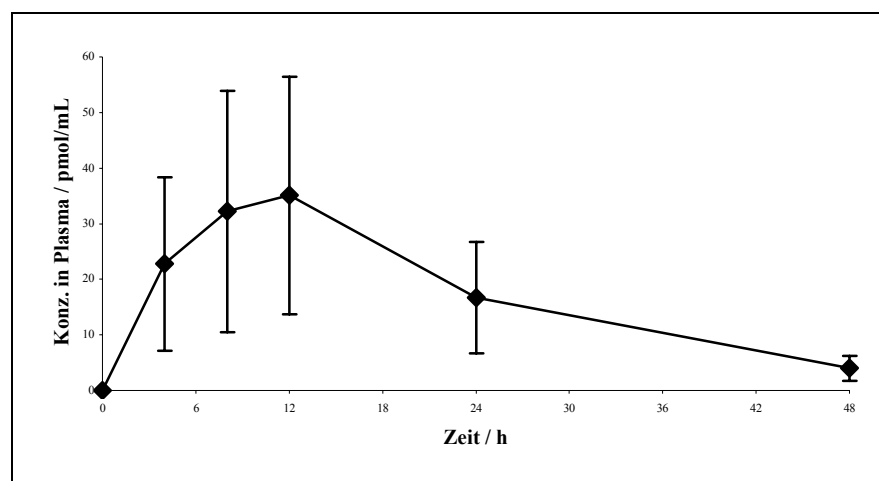


Abb. 5.15: Konzentrations-Zeitverlauf von Daidzein im Plasma von sechs Probanden nach oraler Gabe von 5 mg Daidzein. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Man erkennt, daß der Anstieg der Daidzein-Konzentration in Plasma sehr langsam verlief und die höchste Plasmakonzentration im Schnitt 12 Stunden nach Gabe gemessen werden konnte. Danach fiel die Konzentration langsam ab. Die durchschnittliche maximale Plasmakonzentration betrug $c_{\max} = 44,9 \pm 11,2$ pmol/mL, die Halbwertszeit der Ausscheidung betrug $t_{1/2} = 9,5 \pm 3,6$ h. In den Konzentrations-Zeit-Verläufen kam es zu starken individuellen Schwankungen. So wurde die maximale Plasmakonzentration bei zwei Probanden bereits nach 4 Stunden beobachtet. Die in Abbildung 5.16 gezeigte Auftragung verdeutlicht einmal am Beispiel von drei Probanden diese großen inter-individuellen Unterschiede in c_{\max} und $t_{1/2}$.

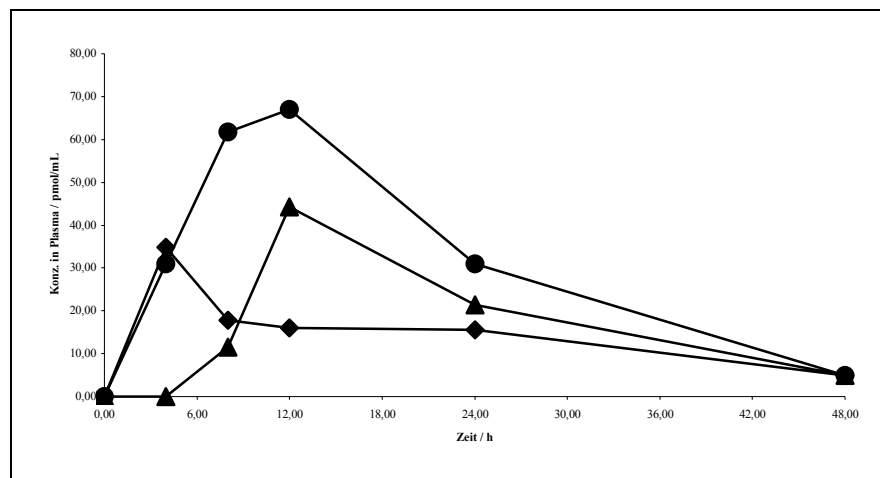


Abb. 5.16: Konzentrations-Zeitverlauf von Daidzein im Plasma von drei Probanden nach oraler Gabe von 5 mg Daidzein bei individueller Auftragung.

Weder in den Halbwertszeiten der Elimination noch in der Höhe der maximalen Plasmakonzentrationen konnten Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Probanden festgestellt werden.

5.5.2 Urin

Zur Messung per HPLC/UV wurde das als Hauptmetabolit vorhandene Daidzein-Glucuronid enzymatisch zu freiem Daidzein gespalten und der Gesamtgehalt an Daidzein in den Urinproben bestimmt. Untersuchungen mit HPLC/UV ohne Glucuronidasespaltung zeigten, daß aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von Daidzein nur ein sehr geringer Anteil von weniger als 1 % der gegebenen Dosis als freie Verbindung im Urin vorlag, der Hauptanteil wurde in Form von Daidzein-Glucuronid ausgeschieden (s. Abb. 5.17 und 5.18).

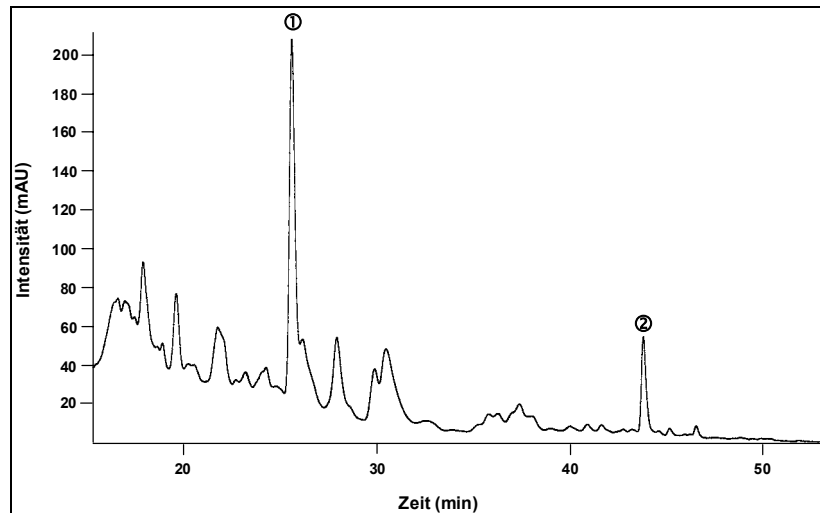


Abb. 5.17: HPLC-Trennung einer 10-Stunden Urinprobe eines männlichen Freiwilligen, der zum Zeitpunkt $t = 0$, oral 5 mg Daidzein aufgenommen hatte. ① = Daidzein-Glucuronid (RT = 25,9 min), ② = Flavon.

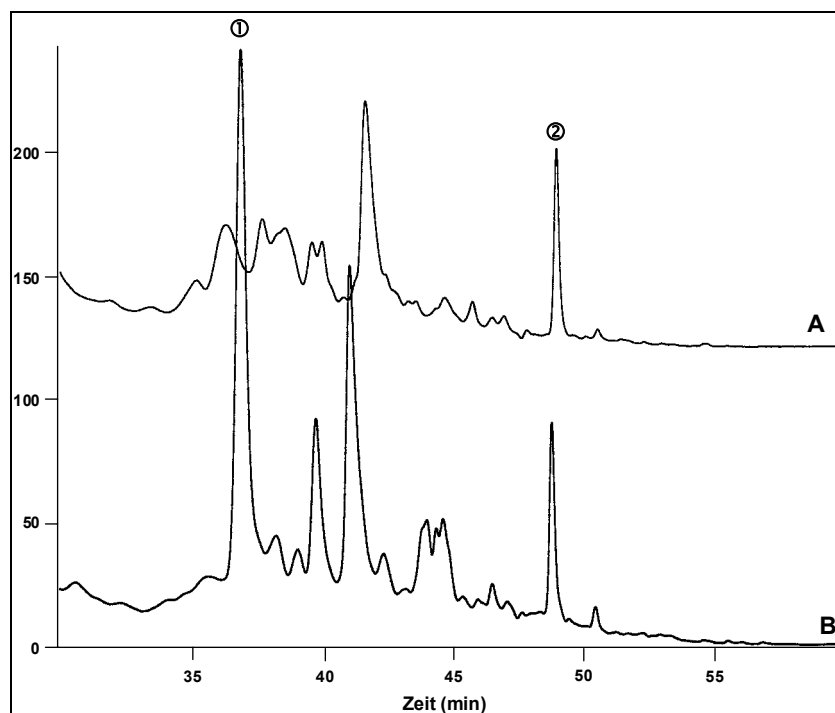


Abb. 5.18: HPLC-Trennung einer 5-Stunden Urinprobe eines männlichen Freiwilligen, der zum Zeitpunkt $t = 0$, oral 5 mg Daidzein aufgenommen hatte. Jeweils 50 μ l der aufgereinigten Urinprobe wurden mittels HPLC getrennt. Chromatogramm A zeigt die Probe ohne Konjugatspaltung, Chromatogramm B der Probe nach Konjugatspaltung. ① = Daidzein (RT = 37 min), ② = Flavon.

Die Ausscheidung von Daidzein mit dem Urin der Probanden ist in Abbildung 5.19 graphisch dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte der ausgeschiedenen Mengen \pm der Standardabweichungen. Man erkennt, daß die maximale Ausscheidung von Daidzein in Urin zehn Stunden nach oraler Applikation erreicht wurde. Die Elimination mit dem Urin verlief im Vergleich zur Ratte etwas langsamer mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 4,7 \pm 1,9$ h, die Nachweisgrenze wurde nach spätestens 46 h erreicht. Die Summe der mit dem Urin ausgeschiedenen Menge an Daidzein betrug $39,9 \pm 19,1$ % der gegebenen Dosis in weiblichen und $37,9 \pm 12,3$ % in männlichen Probanden. Im Urin der Probanden vor der Exposition sowie in Proben, die 46 h und später nach Gabe von Daidzein genommen wurden, konnte kein Daidzein nachgewiesen werden.

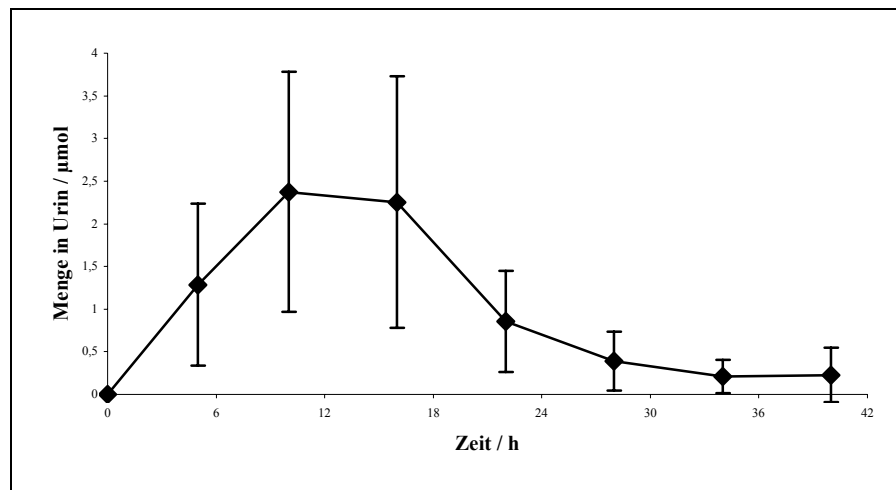


Abb. 5.19: Elimination von Gesamt-Daidzein mit dem Urin von sechs Probanden nach oraler Gabe von 5 mg Daidzein. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

In Tab. 5.2 sind die Summen der ausgeschiedenen Mengen an Gesamt-Daidzein nach enzymatischer Spaltung aus dem Urin der Probanden aufgeführt. Eine Aufsummierung der in den einzelnen Urinproben gemessenen Mengen an Gesamt-Daidzein ergab eine Wiederfindung von $38,6 \pm 12,8$ % der applizierten Menge im Urin.

Tab. 5.2: Übersicht über die mit dem Urin ausgeschiedenen Gesamtmengen an Daidzein, dessen Anteil an der applizierten Dosis und die Eliminationshalbwertszeiten

Proband	Gesamtmenge / μmol	Prozent der Dosis / %	Halbwertszeit / h
H	5,19	26,35	2,65
I	10,51	53,41	5,16
F	9,79	49,74	5,35
G	5,13	26,07	3,04
K	9,29	47,20	7,82
L	5,66	28,73	4,11
Mittelwerte	7,60 \pm 2,52	38,58 \pm 12,82	4,69 \pm 1,88

Die geringe Wiederfindung in Urin ist in guter Übereinstimmung mit Watanabe, S. *et al.*, 1998, die nach Gabe von umgerechnet 25 mg Daidzein (in Form von Sojabohnenpulver) eine Wiederfindung in Urin von $35,8 \pm 13,5$ % der applizierten Dosis errechneten. Zudem hat die Untersuchung der Elimination von Daidzein in Ratten gezeigt, daß ein großer Teil der Dosis unverändert über die Faeces ausgeschieden wurde. Ob dies auch im Menschen zutrifft, wurde in der Humanstudie jedoch nicht überprüft.

Die ermittelten kinetischen Daten von Daidzein in Urin unterschieden sich nicht zwischen weiblichen und männlichen Probanden.

5.6 „in vitro-Metabolismus“ von BPA - Inkubationen

Um eventuell in der Leber entstehende oxidative Metabolite zu bestimmen, wurde Bisphenol A *in vitro* mit Nager-Lebermikrosomen inkubiert. Auf eine gesonderte Positivkontrolle wurde verzichtet, da eine Überprüfung derselben Charge von Mikrosomen im Rahmen eines anderen Versuches am gleichen Tag die ordnungsgemäße Funktion belegte. Dabei konnten nach Proteinabtrennung bei der Reaktionskontrolle per HPLC/UV keine Metaboliten nachgewiesen werden; als einzige Verbindung wurde durch Vergleich mit Standardsubstanz unverändertes Bisphenol A identifiziert. Diese *in vitro*-Untersuchung lieferte also keinen Hinweis auf eine ausgeprägte oxidative Metabolisierung von Bisphenol A in Ratten.

5.7 Biotransformation von Bisphenol A in der Ratte

Zur Aufklärung der Biotransformation von Bisphenol A *in vivo* wurde Bisphenol A einmalig in einer Dosis von 600 mg/kg KG an eine männliche Fischer F344-Ratte per Schlundsonde verabreicht. Urin wurde nach 24 h und 48 h gesammelt. Die gesammelten Proben wurden per HPLC/UV analysiert. Abbildung 5.20 zeigt den Vergleich zweier Chromatogramme zum Zeitpunkt $t = 0$ h und zum Zeitpunkt $t = 24$ h. Man erkennt neben unverändertem Bisphenol A ($rt = 35,5$ min) zwei neue Verbindungen bei $rt = 31$ min und bei $rt = 31,8$ min. Über den Vergleich der UV-Spektren mit Verbindungen in Kontrollurin konnte sichergestellt werden, daß es sich tatsächlich um Metaboliten handelte. Diese Substanzen stellten Konjugate dar: Nach Behandlung mit Glucuronidase und Sulfatase bei 37°C verschwanden die Signale bei gleichzeitiger Zunahme des Signals für Bisphenol A.

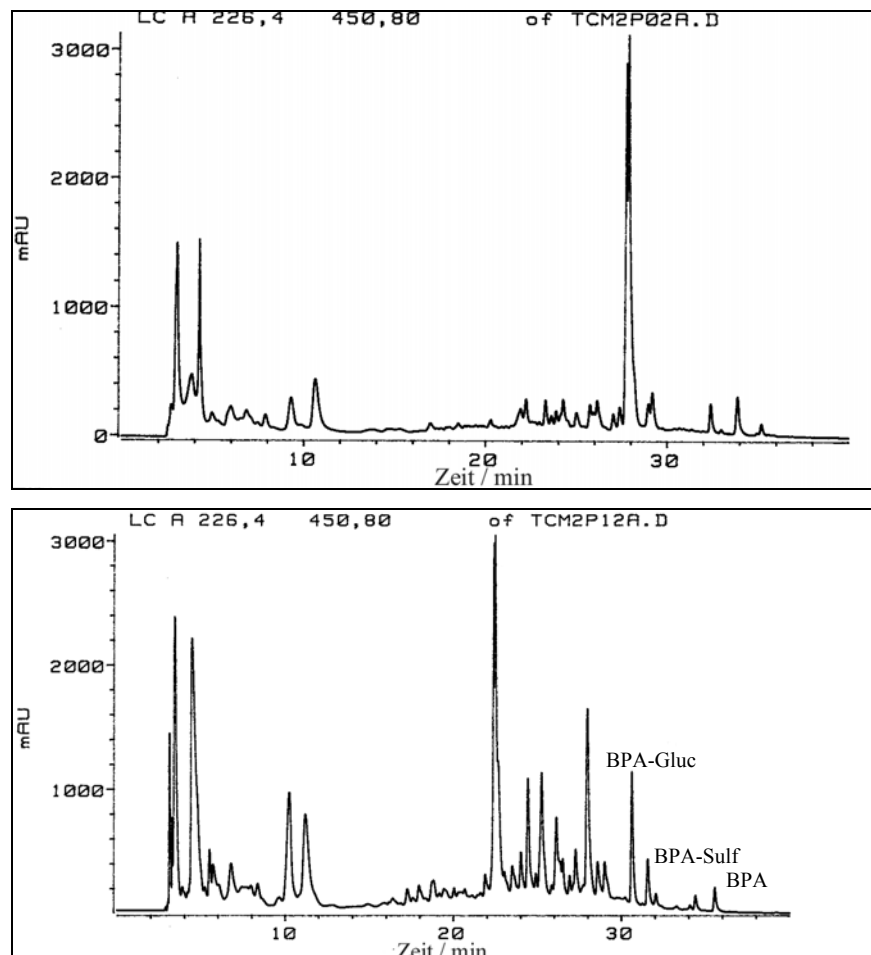


Abb. 5.20: HPLC-Chromatogramme (UV-Detektion) von Kontrollurin (A) und Urin einer mit Bisphenol A (600 mg/kg KG) behandelten Ratte (B) gesammelt über die ersten 24 Stunden nach oraler Gabe von Bisphenol A. Bei dem großen Signal bei $rt = 28$ min im Kontrollurin handelte es sich um eine endogene Verbindung, die von den Tieren in stark schwankenden Mengen ausgeschieden wurde.

Diese Identifizierung konnte weiterhin durch Aufnahme von LC/MS/MS-Spektren bestätigt werden. Dazu wurden die Verbindungen durch halb-präparative HPLC wie unter Kapitel 4.2 beschrieben isoliert und mittels GC/MS und LC/MS/MS untersucht. Flüchtige Derivate des bei $t_r = 31$ min eluierenden Hauptmetaboliten konnten nicht erhalten werden, in der LC/MS zeigte die Verbindung, wie in Abbildung 5.21 dargestellt, ein intensives Signal für ein Molekülion bei m/z 403, sowie kleinere Signale bei m/z 425 und m/z 441. Diese beiden Massenfragmente entsprachen jeweils einem Natrium- bzw. Kaliumcluster des Molekülions bei m/z 403.

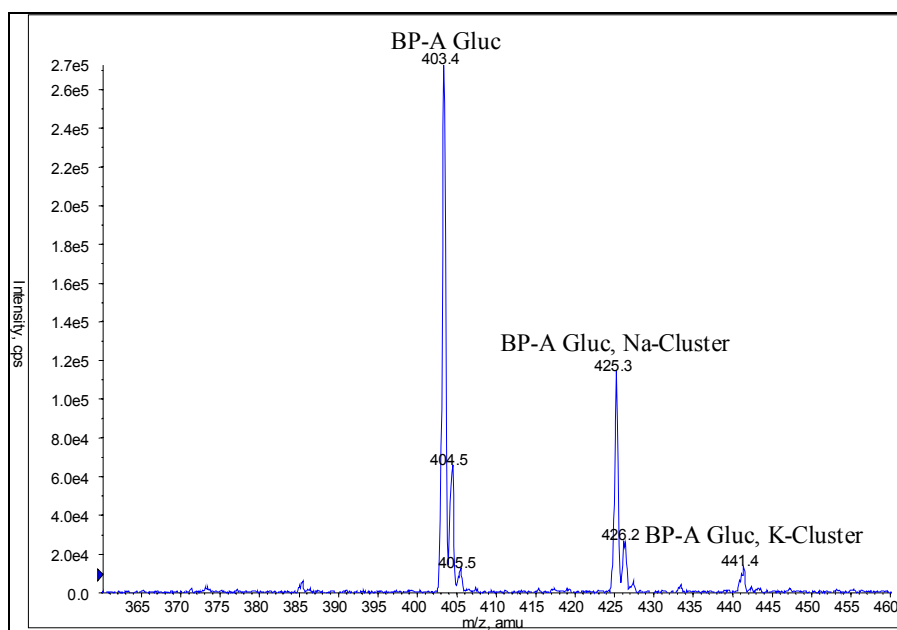


Abb. 5.21: ESI-Massenspektrum des in Abb. 5.23 nach 31 Minuten eluierenden Bisphenol A-Hauptmetaboliten. Das Molekülion bei m/z 403 wurde durch weitere Fragmentierung als Bisphenol A-Glucuronid identifiziert. Bei den beiden Signalen m/z 425 ($[M+Gluc]^-Na^+$) und m/z 441 ($[M+Gluc]^-K^+$) handelt es sich um die Natrium- bzw. Kaliumcluster dieses Glucuronids.

Mit Kollisionsenergien von 24 eV wurde aus dem Molekülion m/z 403 ein Fragment von m/z 227 (Bisphenol A, $[M-H]^-$) gebildet (s. Abb. 5.23). Diese Fragmentierung deutete darauf hin, daß der Metabolit ein Glucuronid von Bisphenol A darstellte (die Differenz von 176 Masseneinheiten entspricht der Glucuronsäuregruppe). Im MS/MS zeigte sich weiterhin als intensivstes Fragment m/z 113, so daß die Verbindung über den spezifischen MRM-Übergang 403/113 charakterisiert wurde. Das Fragment m/z 113 entspricht dabei dem Ammoniumcluster (aus dem verwendeten Puffer) des in Abbildung 5.22 dargestellten

Fragmentes. Zusätzlich war die Verbindung durch Glucuronidase enzymatisch spaltbar. Diese Ergebnisse beweisen, daß dieser Metabolit ein Glucuronid des Bisphenol A darstellt.

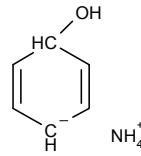


Abb. 5.22: Struktur des Fragmentes m/z 113, das bei einer Kollisionsenergie von 24 eV aus Bisphenol A-Glucuronid entsteht.

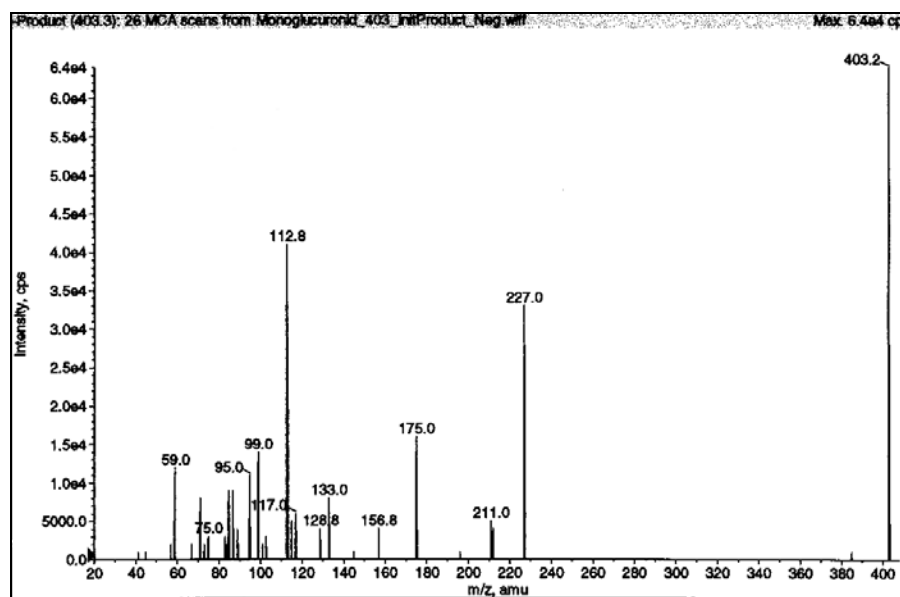


Abb. 5.23: MS/MS-Fragmentierung des in Abb. 5.23 nach 31 Minuten eluierenden Bisphenol A-Hauptmetaboliten, der als BPA-Glucuronid identifiziert wurde. m/z 403 entspricht dem Glucuronid $[M+Gluc]^-$, m/z 227 entspricht Bisphenol A $[M-H]^-$ und m/z 113 entspricht $[C_6H_7O-NH_4]^-$.

LC/MS/MS-Untersuchungen der bei Retentionszeit 31,8 min eluierenden Verbindung zeigten, daß es sich um ein Sulfat von BPA handelte. Intensivstes Fragment im MS war hierbei m/z 307, charakterisiert wurde die Verbindung durch den MRM-Übergang 307/80. Das entstehende Produkt m/z 80 entsprach dabei der Sulfatgruppe. Bisphenol A selbst war in der MS/MS durch den Übergang 227/133 gekennzeichnet. Abbildung 5.24 zeigt den Nachweis von Bisphenol A und seinen beiden Konjugaten anhand ihrer spezifischen MRM-Übergänge nebeneinander in Urinproben einer Ratte vor bzw. 12 Stunden nach oraler Exposition gegen 200 mg/kg KG Bisphenol A.

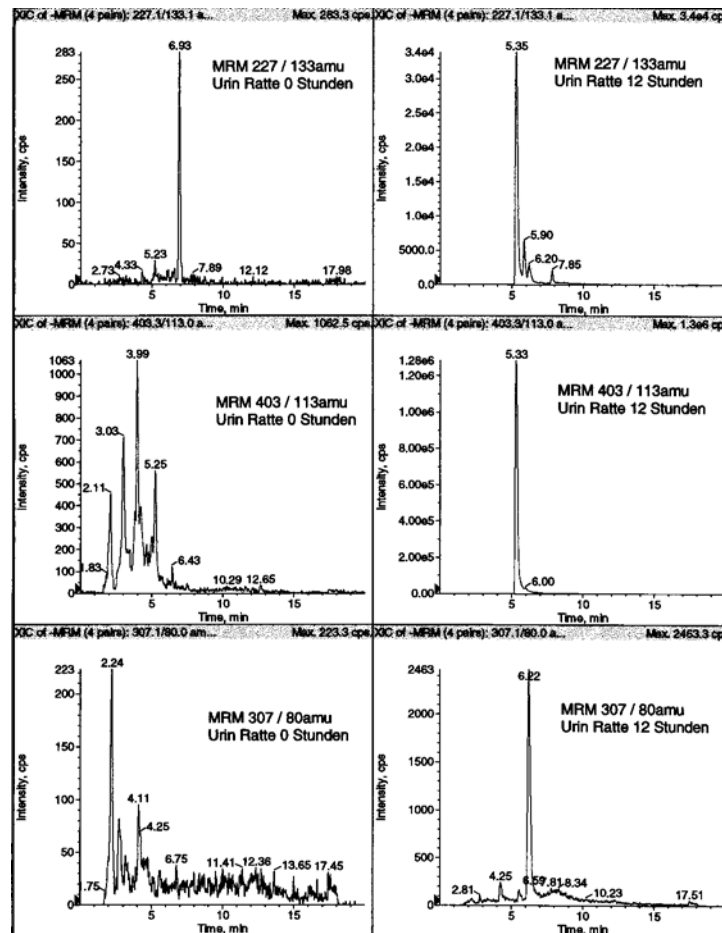


Abb. 5.24: LC/MS/MS-Chromatogramme von Kontrollurin (linke Spalte) und Urin einer mit Bisphenol A (200 mg/kg KG) behandelten Ratte (rechte Spalte) gesammelt über die ersten 12 Stunden nach oraler Gabe von Bisphenol A. Man beachte die unterschiedlichen Intensitäten der Signale.

Nach Extraktion der getrockneten Faeces-Proben wurden diese sowohl per HPLC/UV als auch per GC/MS analysiert. Neben unverändertem Bisphenol A konnten keine weiteren Metabolite identifiziert werden.

5.8 Synthesen

Da in der Literatur wiederholt über das Vorhandensein eines hydroxylierten Bisphenol A Derivates spekuliert worden war, wurde auf verschiedenen Wegen versucht, eine solche Verbindung synthetisch herzustellen (s. Kapitel 4.6.2 und 4.6.3). Dazu wurde einerseits eine Kondensationsreaktion mit Phenol, Aceton und - entsprechend dem gewünschten Produkt - Resorcin oder Katechol durchgeführt. Andererseits wurde versucht, Bisphenol A in einer Fentons Reaktion direkt zu oxidieren. Das Ziel war, anhand der erhaltenen UV-Spektren in

den Urin- und Faecesproben gezielt nach dem Vorhandensein der Verbindungen suchen zu können. Daher wurde zunächst auf die Abtrennung einer bestimmten Verbindung aus den erhaltenen Isomergemischen verzichtet. Ein Vergleich der Retentionszeiten und Spektren der erhaltenen Verbindungen mit biologischen Proben zeigte jedoch keinerlei Übereinstimmung, so daß eine weitere Auftrennung nicht vorgenommen wurde. Das Ergebnis der *in vitro*-Inkubation mit Lebermikrosomen sowie die gezielte Suche nach hydroxylierten Bisphenol A-Derivaten in Urinproben zusammen mit den in der Ratte gewonnenen Daten zur Biotransformation von Bisphenol A zeigten, daß außer Phase II-Konjugation keine weitere Metabolisierung zu erwarten war.

5.9 Toxikokinetik von Bisphenol A in Ratten

Zur Untersuchung der Toxikokinetik von Bisphenol A in Ratten wurden sechs Fischer F344-Ratten mit 200 mg/kg KG BPA peroral exponiert. Die Tiere wurden einzeln in Stoffwechsellkäfige gesetzt, in regelmäßigen Intervallen wurden Urin und Faeces gesammelt.

5.9.1 Urin

Nur ein geringer Anteil der applizierten Dosis konnte als unveränderte Substanz im Urin wiedergefunden werden. Hauptmetabolit im Urin war das Glucuronid von Bisphenol A, in geringem Umfang wurde zudem das Sulfatkonjugat von BPA ausgeschieden. Die Ausscheidung von Bisphenol A und BPA-Glucuronid mit dem Urin erfolgte langsam; die Konzentrationen an Bisphenol A und seinem Konjugat lagen in Urinproben, die 96 h nach Exposition genommen wurden, noch deutlich über der Nachweisgrenze. Im Urin ließen sich hauptsächlich Phase II-Konjugate nachweisen; die geringen Mengen an unkonjugierter Substanz ließen sich auf die geringe Wasserlöslichkeit von BPA zurückführen. Im nachfolgenden werden die toxikokinetischen Daten für Bisphenol A und dessen Glucuronid in Urin zusammengefaßt.

Ausscheidung von Bisphenol A

Die Ausscheidung von freiem Bisphenol A mit dem Urin ist in Abbildung 5.25 nach Geschlechtern getrennt graphisch dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte der ausgeschiedenen Mengen \pm der Standardabweichungen.

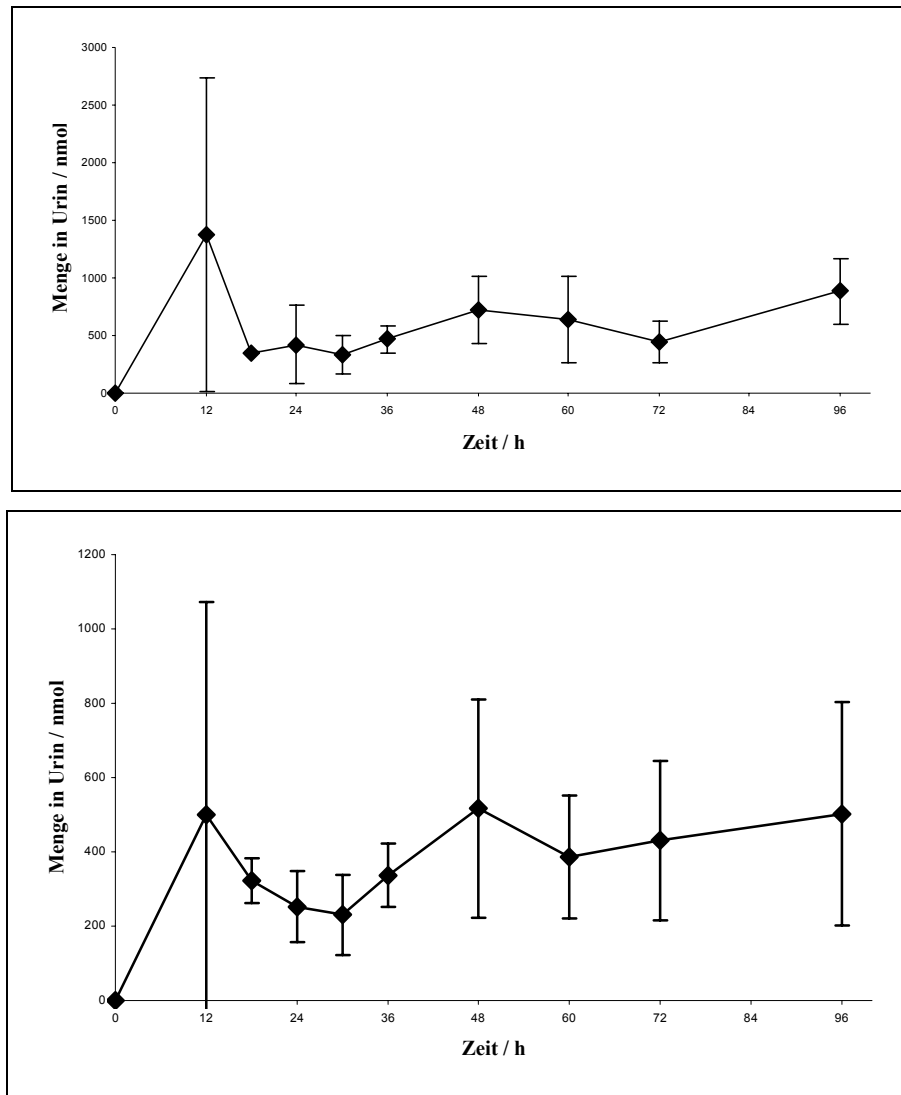


Abb. 5.25: Elimination von Bisphenol A mit dem Urin von jeweils drei Ratten nach oraler Gabe. Die obere Abbildung zeigt die Elimination in weiblichen Ratten, die untere in männlichen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Man erkennt, daß die maximale Konzentration an Bisphenol A bereits nach zwölf Stunden erreicht wurde. Der weitere Verlauf der Kurve zeigt ein wiederholtes Absinken und dann erneutes Ansteigen der mit dem Urin ausgeschiedenen Menge an Bisphenol A. Dies deutet auf einen ausgeprägten enterohepatischen Kreislauf der Substanz hin, in dessen Verlauf vorhandene Konjugate aus der Leber in die Gallenflüssigkeit ausgeschieden, durch Darmbakterien dekonjugiert und nach Rückresorption erneut in der Leber konjugiert werden. Die Elimination mit dem Urin verlief sehr langsam. Da die Ausscheidung einer Kinetik erster Ordnung nicht folgte, ließ sich keine Halbwertszeit bestimmen. Nach 96 h war Bisphenol A im Urin noch deutlich nachweisbar.

Die Summe der mit dem Urin ausgeschiedenen Menge an BPA betrug $2,9 \pm 1,3$ % der gegebenen Dosis in weiblichen und $1,6 \pm 0,6$ % in männlichen Ratten.

Ausscheidung von Bisphenol A-Glucuronid

Als Hauptmetabolit im Urin wurde das Glucuronid identifiziert. Die Ausscheidung von Bisphenol A-Glucuronid mit dem Urin ist in Abbildung 5.26 nach Geschlechtern getrennt graphisch dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte der ausgeschiedenen Mengen \pm der Standardabweichungen.

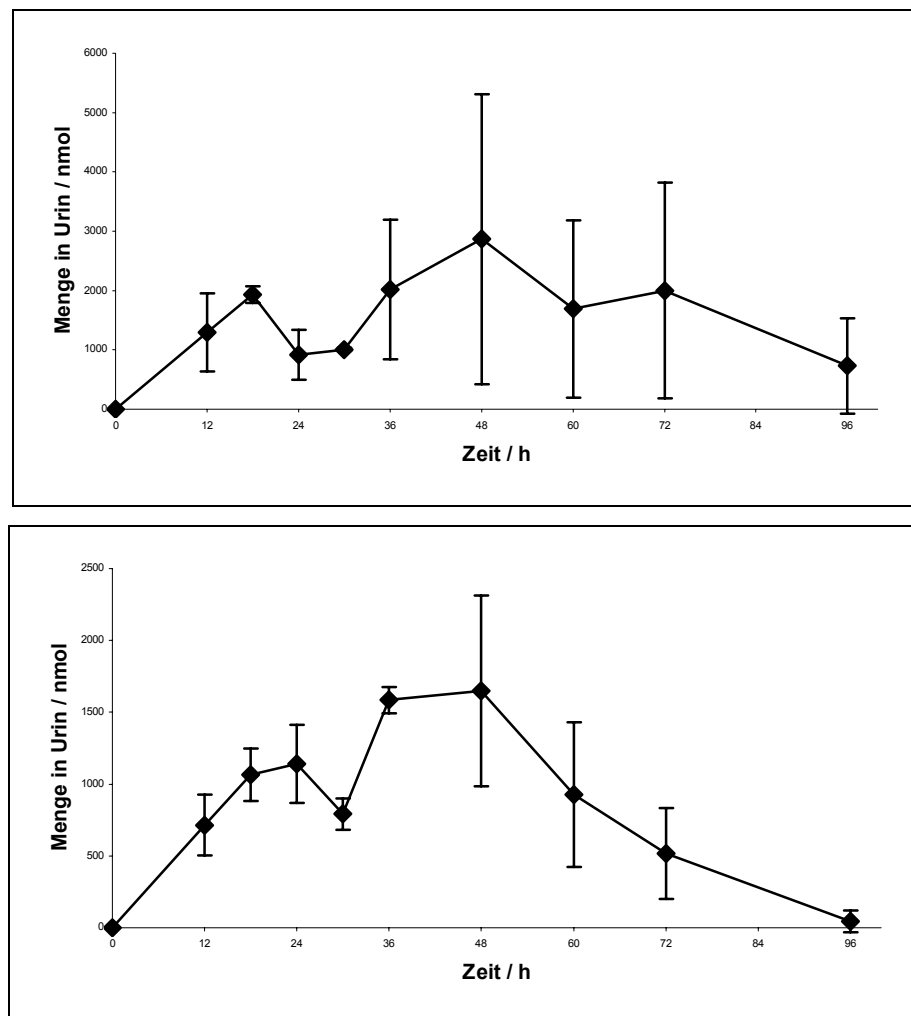


Abb. 5.26: Elimination von Bisphenol A-Glucuronid mit dem Urin von jeweils drei Ratten nach oraler Gabe. Die obere Kurve zeigt die Elimination in weiblichen Ratten, die untere in männlichen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Man erkennt, daß die maximale Konzentration an BPA-Glucuronid im Vergleich zu freiem Bisphenol A deutlich später erreicht wurde. Auch bei der Ausscheidung des Glucuronids fällt der mehrgipflige Verlauf der Kurve auf, der auf einen ausgeprägten enterohepatischen Kreislauf von Bisphenol A hinweist.

Die Elimination mit dem Urin verlief ähnlich langsam wie die Ausscheidung von freiem Bisphenol A. Da die Ausscheidung ebenfalls einer Kinetik erster Ordnung nicht folgte, ließ sich keine Halbwertszeit bestimmen.

Die Summe der mit dem Urin ausgeschiedenen Menge an BPA-Glucuronid betrug $7,7 \pm 4,4$ % der gegebenen Dosis in weiblichen und $3,9 \pm 0,5$ % in männlichen Ratten. Wie schon bei der Ausscheidung von freiem BPA fällt auch hier wieder die fast doppelt so hohe Wiederfindung in weiblichen verglichen mit männlichen Ratten auf.

Ausscheidung von Bisphenol A-Sulfat

In geringem Umfang ließ sich im Urin von Ratten qualitativ per LC/MS/MS ein weiteres Konjugat nachweisen, das als Bisphenol A-Sulfat identifiziert werden konnte. Da die Untersuchung zur Toxikokinetik von Bisphenol A im Vergleich zur Biotransformationsuntersuchung jedoch mit deutlich geringerer Dosis durchgeführt wurde (200 mg/kg KG vs. 600 mg/kg KG), konnte das Sulfat aufgrund der geringen Konzentration in den Urinproben mit der verwendeten HPLC/UV-Methode nicht quantifiziert werden. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, daß der Anteil des Sulfats nach oraler Gabe von 100 mg/kg KG ^{14}C -markierten BPA's an F344-Ratten etwa 5 % der ausgeschiedenen Menge an Glucuronid in der weiblichen und etwa 3 % in der männlichen Ratte beträgt (Pottenger, L. H. *et al.*, 2000).

5.9.2 Faeces

Ein Großteil der applizierten Menge an Bisphenol A wurde in Form von unveränderter Ausgangssubstanz innerhalb des Sammelzeitraums über die Faeces ausgeschieden. In bis 48 h nach Gabe von BPA gesammelten Faecesproben konnten $12,7 \pm 2$ % der gegebenen Dosis in weiblichen und $17,7 \pm 3,7$ % in männlichen Ratten wiedergefunden werden. Dieser Befund ist in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten, die nach oraler Gabe von 100 mg/kg KG ^{14}C -markierten BPA's an weibliche F344-Ratten lediglich etwa 10 % der Dosis innerhalb von 48 h in den Faeces wiederfanden, weitere 60 % der Dosis wurden innerhalb der folgenden 96 h nach Gabe in den Faeces gefunden (Snyder, R. W. *et al.*, 2000).

5.9.3 Gesamtausscheidung - Übersicht

Tabelle 5.3 gibt eine Übersicht über die mit dem Urin und über die Faeces ausgeschiedenen Mengen an Bisphenol A bzw. seines Glucuronids. Der Gesamtanteil an im Urin

ausgeschiedener Substanz (BPA + Glucuronid) betrug in der weiblichen Ratte $10,6 \pm 5,7$ % und in der männlichen $5,4 \pm 1,2$ % der applizierten Dosis innerhalb von 96 h. Zusammen mit der über die Faeces ausgeschiedenen Menge ließ sich eine in den Proben eine Gesamt-Wiederfindung von $23,3 \pm 7,6$ % in weiblichen und $23,1 \pm 4,8$ % der applizierten Menge in männlichen Ratten errechnen. Abgesehen von den deutlichen Unterschieden im Ausmaß der Ausscheidung über den Urin, konnten, was Gesamtmenge der Ausscheidung und Verlauf der Eliminationskurven angeht, keine weiteren Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren beobachtet werden.

Tab. 5.3: Wiederfindung von Bisphenol A und BPA-Glucuronid in Urin und Faeces von F-344 Ratten nach oraler Gabe von 200 mg/kg Bisphenol A

Verbindung	weibliche Ratten	männliche Ratten
	% der Dosis Halbwertszeit	% der Dosis Halbwertszeit
Bisphenol A in Urin (96 h)	$2,9 \pm 1,3$ n.b.	$1,6 \pm 0,6$ n.b.
BPA-Glucuronid in Urin (96 h)	$7,7 \pm 4,4$ n.b.	$3,9 \pm 0,5$ n.b.
BPA in Faeces (48 h)	$12,7 \pm 2$ -	$17,7 \pm 3,7$ -

n.b. = nicht bestimmbar

5.10 Toxikokinetik von Bisphenol A in Mäusen

Zur Untersuchung der Toxikokinetik von Bisphenol A in Mäusen wurden jeweils acht weibliche und männliche B6C3F1-Mäuse einmal mit 2 mg/kg KG und einmal mit 20 mg/kg KG Bisphenol A peroral exponiert. Die Tiere wurden getrennt nach Geschlechtern paarweise in Stoffwechsellkäfige gesetzt, über einen Zeitraum von 96 h wurden in regelmäßigen Intervallen Urin und Faeces gesammelt.

Aufgrund der geringen applizierten Menge (zwischen 40 und 600 µg je nach Dosisgruppe und Geschlecht) ließ sich die Ausscheidung nicht per HPLC/UV verfolgen. Die Detektion von Bisphenol A mußte daher per GC/MS-NCI erfolgen. Da es mit dieser Methode nicht möglich war, BPA und BPA-Glucuronid getrennt voneinander zu bestimmen, wurde der Gesamtgehalt

an Bisphenol A in den Urinproben nach vorhergehender enzymatischer Spaltung des Glucuronids bestimmt. Eine Bestimmung von Bisphenol A ohne vorhergehende Spaltung war nicht möglich, da sich das ebenfalls in den Urinproben vorhandene Glucuronid im heißen Einspritzblock des Gaschromatographen thermisch zersetzte und somit eine exakte Quantifizierung verhinderte.

Weiterhin wurde die Quantifizierung durch den schon in Kapitel 5.1 angesprochenen Hintergrund durch ubiquitär vorhandenes Bisphenol A erschwert. So ließ sich dieses bereits in Urinproben vor Gabe der Substanz sowie in Leerproben ohne Matrix in geringen Mengen nachweisen. Daher lag die Bestimmungsgrenze (ermittelt über die siebenfache Standardabweichung der Leerprobe) für die Quantifizierung von Bisphenol A per GC/MS-NCI nach enzymatischer Spaltung in Mausurin bei 200 pmol/mL.

5.10.1 Orale Exposition mit 2 mg/kg KG Bisphenol A

Die Ausscheidung von Gesamt-Bisphenol A mit dem Urin ist in Abbildung 5.27 nach Geschlechtern getrennt graphisch dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte der ausgeschiedenen Mengen \pm der Standardabweichungen pro Käfig, d.h. für jeweils zwei Mäuse.

Man erkennt, daß die maximale Konzentration an Bisphenol A bereits nach zwölf Stunden erreicht wurde. Der weitere Verlauf der Kurve zeigt ein schnelles Absinken der mit dem Urin ausgeschiedenen Menge an Bisphenol A. Die Elimination mit dem Urin verlief recht schnell mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 2,8 \pm 0,5$ h in weiblichen Mäusen bzw. $3,2 \pm 1$ h in männlichen Mäusen. Nach 36 h wurde die Nachweisgrenze erreicht.

Die Summe der mit dem Urin ausgeschiedenen Menge an Gesamt-BPA betrug $14,7 \pm 8,8$ % der gegebenen Dosis in weiblichen und $3,6 \pm 1$ % in männlichen Mäusen.

In den untersuchten Faecesproben konnte per HPLC/UV bei einer Nachweisgrenze von 150 nmol/g Trockenfaeces kein Bisphenol A nachgewiesen werden.

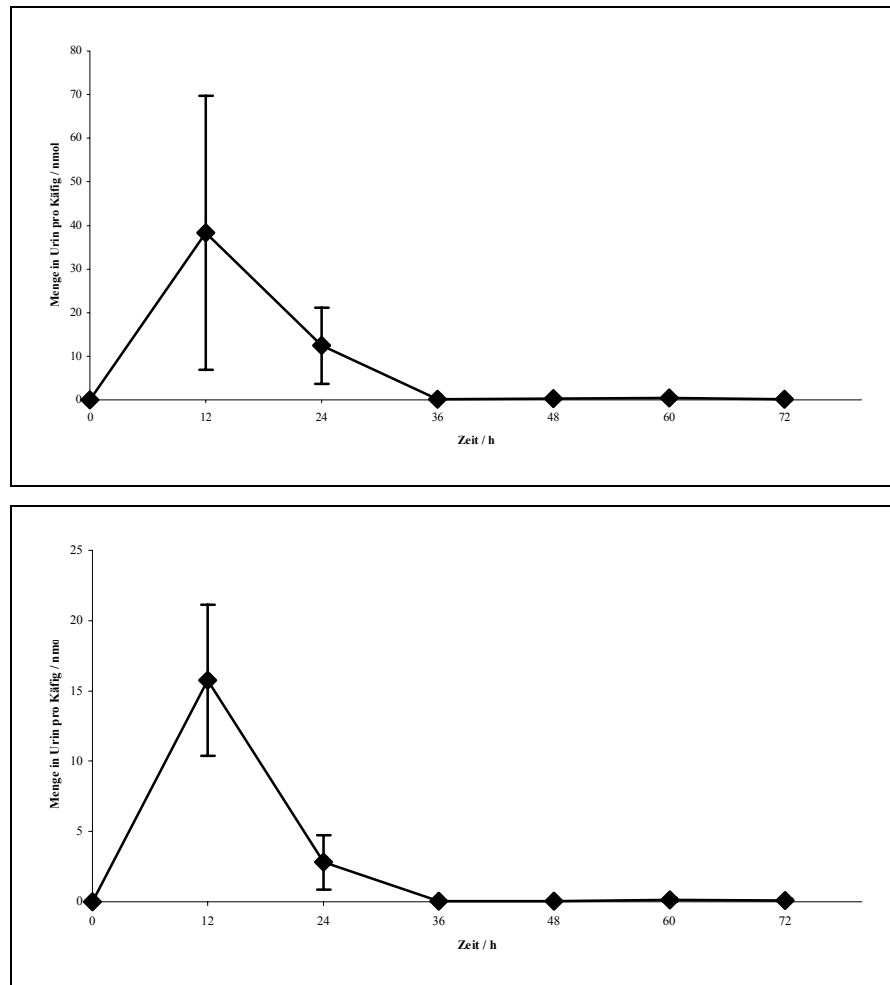


Abb. 5.27: Elimination von Gesamt-Bisphenol A mit dem Urin von jeweils acht Mäusen nach oraler Gabe. Die obere Abbildung zeigt die Elimination in weiblichen Mäusen, die untere in männlichen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung für die Ausscheidung pro Käfig.

5.10.2 Orale Exposition mit 20 mg/kg KG Bisphenol A

Um herauszufinden, ob die Ausscheidung von BPA einer Dosisabhängigkeit unterliegt, wurde eine zu dem vorhergehenden Versuch analoge Studie mit einer höheren Dosis durchgeführt. Die Ausscheidung von Gesamt-Bisphenol A mit dem Urin ist in Abbildung 5.28 nach Geschlechtern getrennt graphisch dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte der ausgeschiedenen Mengen \pm der Standardabweichungen pro Käfig, d.h. für jeweils zwei Mäuse.

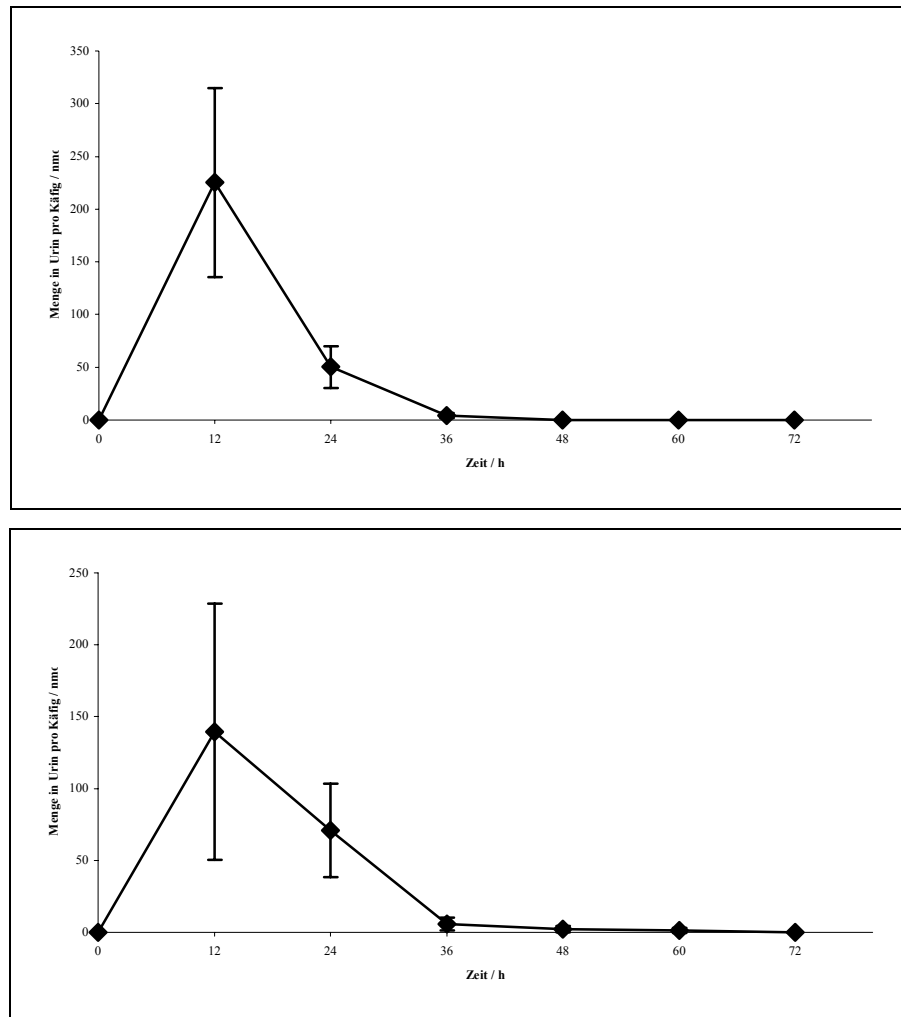


Abb. 5.28: Elimination von Bisphenol A mit dem Urin von jeweils acht Mäusen nach oraler Gabe. Die obere Abbildung zeigt die Elimination in weiblichen Mäusen, die untere in männlichen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung für die Ausscheidung pro Käfig.

Man erkennt, daß die maximale Konzentration an Bisphenol A ebenfalls bereits nach zwölf Stunden erreicht wurde. Der weitere Verlauf der Kurve zeigt wiederum ein schnelles Absinken der mit dem Urin ausgeschiedenen Menge an Bisphenol A. Die Elimination mit dem Urin verlief im Vergleich zur geringeren Dosis etwas langsamer mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 4,4 \pm 1,4$ h in weiblichen Mäusen bzw. 5 ± 1 h in männlichen Mäusen. Nach 60 h wurde die Nachweisgrenze erreicht.

Die Summe der mit dem Urin ausgeschiedenen Menge an Gesamt-BPA betrug $4,7 \pm 3,1$ % der gegebenen Dosis in weiblichen und $4,2 \pm 1,9$ % in männlichen Mäusen. Dies ist deutlich weniger als in der Niedrigdosisgruppe und deutet auf eine Sättigung der Phase II-Reaktionswege hin.

In den untersuchten Faecesproben konnte per HPLC/UV bei einer Nachweisgrenze von 150 nmol/g Trockenfaeces kein Bisphenol A nachgewiesen werden.

5.11 Biotransformation und Toxikokinetik von d₁₆-BPA im Menschen

Basierend auf den Ergebnissen der Studien zur Biotransformation und Ausscheidung von Bisphenol A in der Ratte wurde sechs freiwilligen Probanden gegen acht Uhr morgens je 5 mg d₁₆-Bisphenol A in einer Hartgelatine kapsel auf nüchternen Magen verabreicht. Nach der oralen Gabe wurden Blut- und Urinproben in regelmäßigen Abständen genommen und der Gehalt an d₁₆-BPA und seinen Konjugaten gemessen.

5.11.1 Anmerkungen zur Wahl von d₁₆-BPA für die Humanstudie

Wie in Kapitel 5.1 ausführlich dargelegt und beim Nachweis von BPA in Mausurinen ebenfalls angesprochen, wird der sensitive Nachweis von Bisphenol A in der Massenspektrometrie durch schon in Millipore-Wasser, Pufferlösungen und Kontrollproben detektierbare Mengen an BPA erschwert. Exakte Quantifizierungen im für die Humanstudie zu erwartenden niedrigen Konzentrationsbereich waren daher nicht mit hinreichender Sicherheit gewährleistet. Daher wurden die Untersuchungen zu Biotransformation und Toxikokinetik im Menschen nach Gabe des vollständig deuterierten Bisphenol A, d₁₆-BPA, durchgeführt. Für diese Verbindung konnten keine störenden Hintergrundkonzentrationen bestimmt werden.

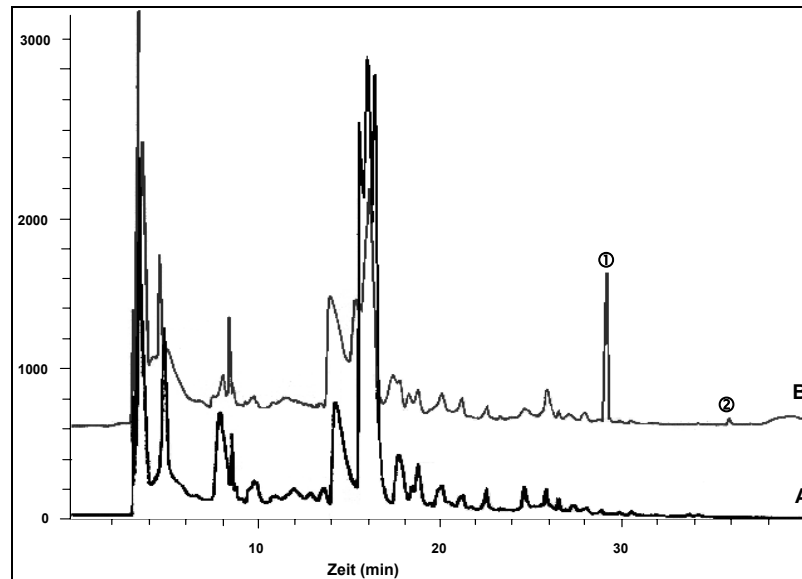


Abb. 5.29: HPLC-Trennung von Urinproben einer Ratte nach Gabe von d_{16} -Bisphenol A. ① = d_{16} -Bisphenol A Glucuronid; ② = freies d_{16} -Bisphenol A; A = Kontrollurin; B = Urin gesammelt über 6 Stunden nach Gabe von 200 mg/kg d_{16} -Bisphenol A.

Um zu überprüfen, ob die Deuterierung Einfluß auf den Metabolismus der Verbindung in der Ratte hatte, wurde eine männliche Fischer F344-Ratte mit 200 mg/kg KG d_{16} -BPA per Schlundsonde exponiert. Abbildung 5.29 zeigt, daß die Verstoffwechslung der deuterierten Verbindung analog zur nicht deuterierten verlief. Als Hauptmetabolit wurde auch nach Gabe der deuterierten Verbindung im Urin das Glucuronid gefunden, nur geringe Mengen nicht konjugierter Substanz waren im Urin nachweisbar.

5.11.2 Plasma

Zur Quantifizierung der Gehalte an d_{16} -Bisphenol A in Plasmaproben wurde GC/MS-NCI verwendet. Dazu wurde das als Hauptmetabolit vorhandene d_{16} -BPA-Glucuronid vor der Messung enzymatisch gespalten und der Gesamtgehalt an d_{16} -BPA bestimmt. Ohne vorhergehende Glucuronid-Spaltung konnten per GC/MS-NCI erhebliche Mengen an d_{16} -BPA gefunden werden. Diese Konzentrationen lagen jedoch weit über den Konzentrationen an freiem d_{16} -BPA, die in einem alternativen Versuch per HPLC/FLD (s. unten) bestimmt werden konnten, aber weit unter den Konzentrationen, die nach enzymatischer Spaltung und Derivatisierung gemessen wurden. Dies kann man dadurch erklären, daß es bereits bei der Derivatisierung oder bei der Messung im heißen Injektorblock des Gaschromatographen zu einer teilweisen thermischen Zersetzung des Glucuronids kam und dieses dann fälschlicherweise als d_{16} -BPA bestimmt wurde.

Zur Bestimmung der Gehalte an d_{16} -Bisphenol A und seines Glucuronids wurde zunächst der Gesamtgehalt an d_{16} -BPA nach Glucuronidase/Sulfatase Behandlung wegen der höheren Empfindlichkeit, Spezifität und Präzision per GC/MS-NCI bestimmt (s. Abb. 5.30). Der Nachweis von freiem, unkonjugiertem d_{16} -Bisphenol A wurde per HPLC/FLD geführt, dabei war die Fluoreszenzquantenausbeute für d_{16} -BPA etwa siebenmal höher als für das Konjugat. Mit dieser Methode konnte d_{16} -Bisphenol A mit hoher Empfindlichkeit bestimmt werden; in keiner der analysierten Plasmaproben konnte mit HPLC/FLD bei einer Nachweisgrenze von 300 fmol/ μ L Injektionsvolumen freies Bisphenol A nachgewiesen werden. Daraus ließ sich schließen, daß d_{16} -Bisphenol A im Plasma von menschlichen Probanden ausschließlich in Form seines Glucuronidkonjugates vorlag.

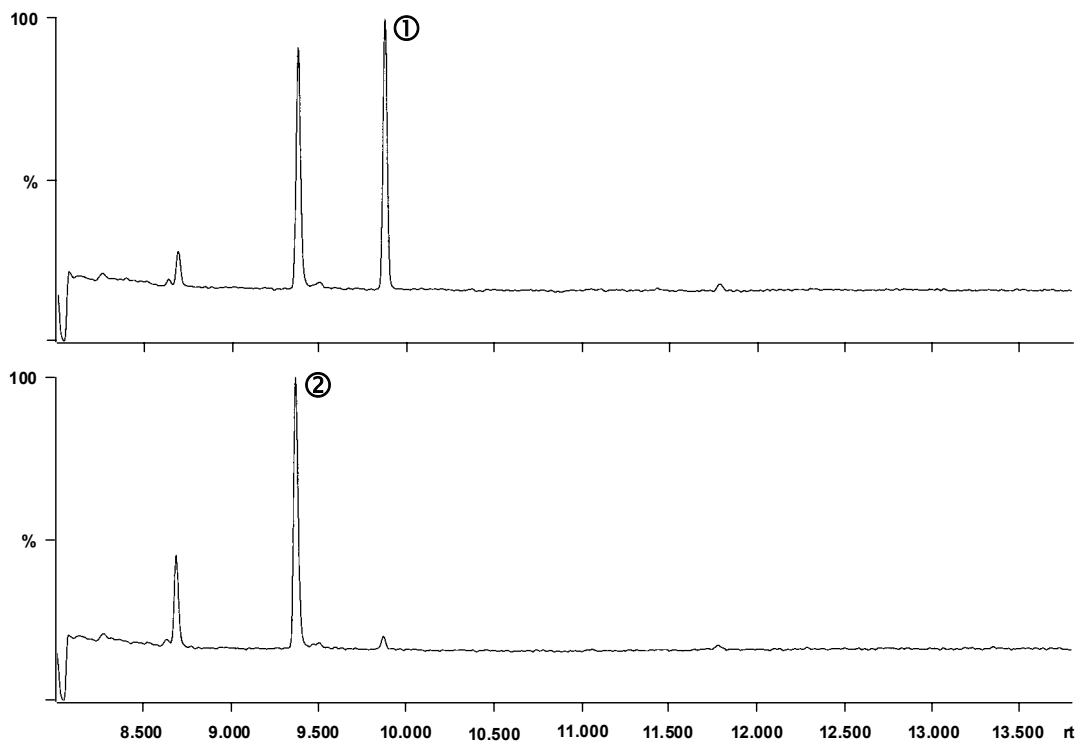


Abb. 5.30: Chromatogramme zur Quantifizierung von d_{16} -Bisphenol A im Plasma eines Freiwilligen nach Exposition gegen 5 mg d_{16} -Bisphenol A nach enzymatischer Spaltung und Derivatisierung. Das obere Chromatogramm zeigt m/z 337 (charakteristisch für d_{16} -Bisphenol A, peak ①), das untere Chromatogramm m/z 295 für den internen Standard, peak ②.

Die Elimination von Gesamt- d_{16} -Bisphenol A aus dem Plasma der Probanden ist in Abbildung 5.31 nach Geschlechtern getrennt dargestellt, angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Plasmakonzentrationen für jeweils drei Probanden. Im Plasma der

Probanden vor Beginn der Exposition konnte kein d_{16} -BPA nachgewiesen werden, die Nachweisgrenze in Plasma wurde 32 h nach Exposition erreicht.

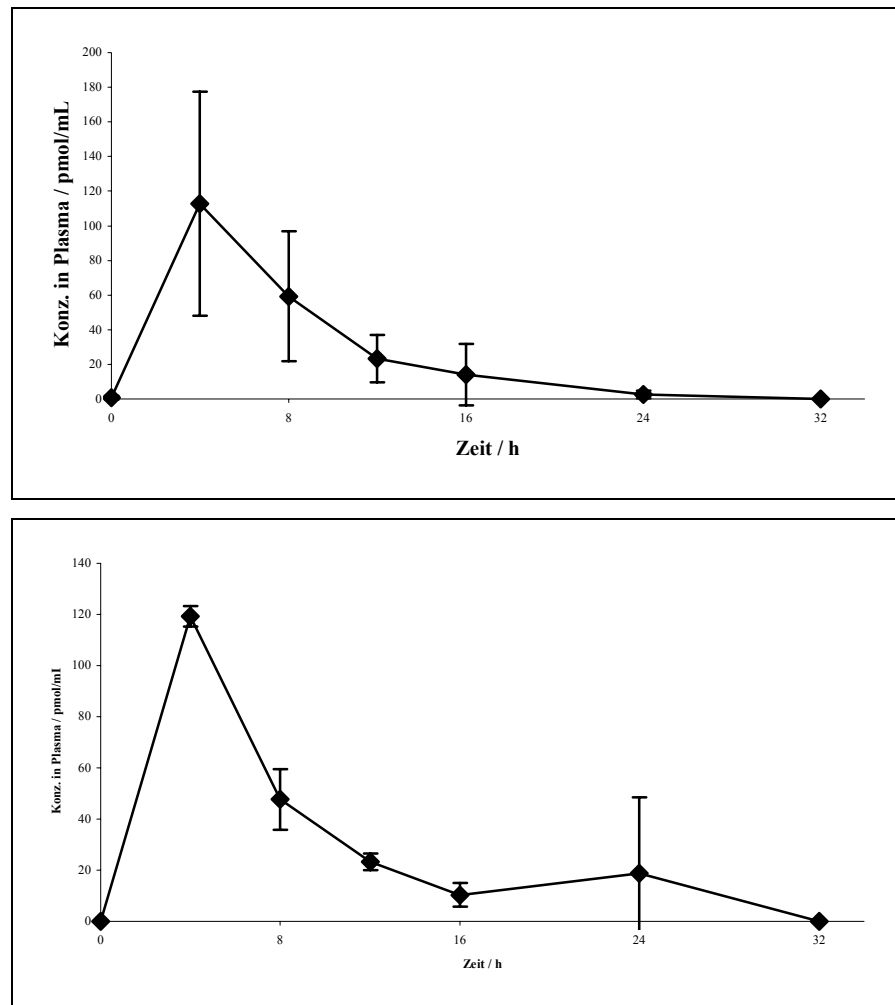


Abb. 5.31: Konzentrations-Zeitverlauf von d_{16} -Bisphenol A nach enzymatischer Spaltung im Plasma von jeweils drei Probanden nach oraler Gabe von 5 mg. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (oben: weibliche Probanden, unten: männliche).

Man erkennt, daß die maximale Plasmakonzentration schon nach vier Stunden erreicht wurde und die Ausscheidung anschließend einer Kinetik erster Ordnung folgte. Die durchschnittliche maximale Plasmakonzentration betrug $c_{\max} = 112,7 \pm 64,6$ pmol/mL in weiblichen Probanden und $c_{\max} = 119,3 \pm 4,0$ pmol/mL in männlichen, die Halbwertszeit der Ausscheidung betrug $t_{1/2} = 3,6 \pm 0,2$ h.

Weder in den Halbwertszeiten der Elimination noch in der Höhe der maximalen Plasmakonzentrationen konnten Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Probanden beobachtet werden.

5.11.3 Urin

Zur Messung per GC/MS-NCI wurde das als Hauptmetabolit vorhandene d_{16} -Bisphenol A-Glucuronid analog zu der Bestimmung in Plasmaproben enzymatisch gespalten und der Gesamtgehalt an d_{16} -BPA bestimmt (s. Abb. 5.32).

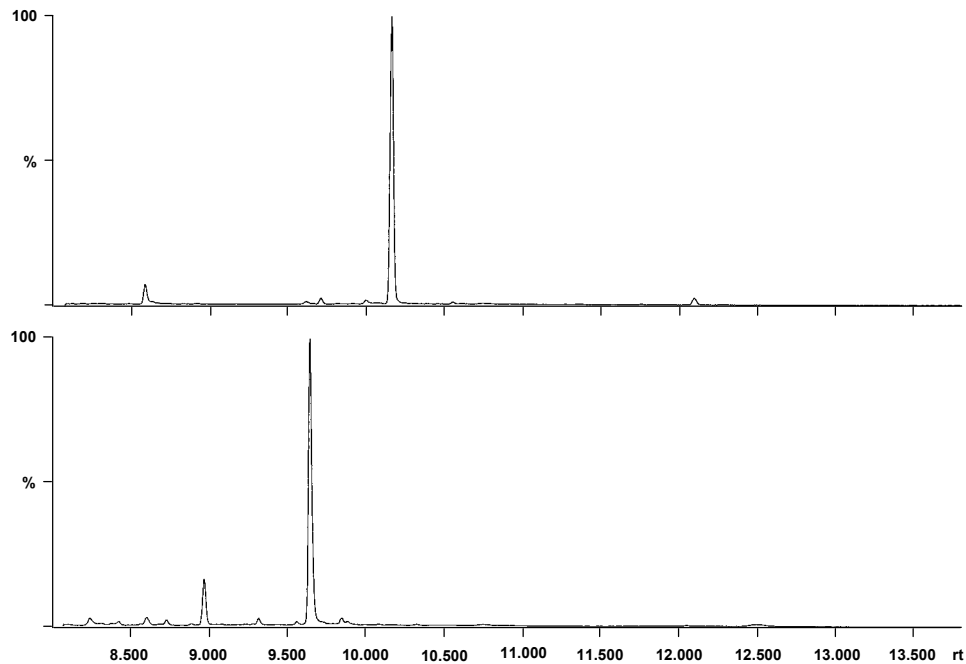


Abb. 5.32: Chromatogramme zur Quantifizierung von d_{16} -Bisphenol A im Urin eines Freiwilligen nach Exposition gegen 5 mg d_{16} -Bisphenol A, nach enzymatischer Spaltung und Derivatisierung. Das obere Chromatogramm zeigt m/z 337 (charakteristisch für d_{16} -Bisphenol A, $rt = 10,2$ min), das untere Chromatogramm m/z 295 für den internen Standard ($rt = 9,7$ min). Aufgetragen ist die „relative abundance“ gegen die Zeit.

Eine Auftrennung der Urinproben per HPLC zur parallelen Detektion von freiem d_{16} -BPA und seinem Glucuronid zeigten, daß bei UV-Detektion nur d_{16} -BPA-Glucuronid in den Proben nachweisbar war. Bei Verwendung des weitaus empfindlicheren Fluoreszenzdetektors konnte bestimmt werden, daß die Konzentration an freiem d_{16} -Bisphenol A in den Urinproben weniger als 0,4 % der jeweiligen Konzentration des Glucuronids betrug. Daraus ließ sich schließen, daß d_{16} -Bisphenol A auch im Urin von menschlichen Probanden fast ausschließlich in Form seines Glucuronidkonjugates vorlag (s. Abbildungen 5.33 und 5.34).

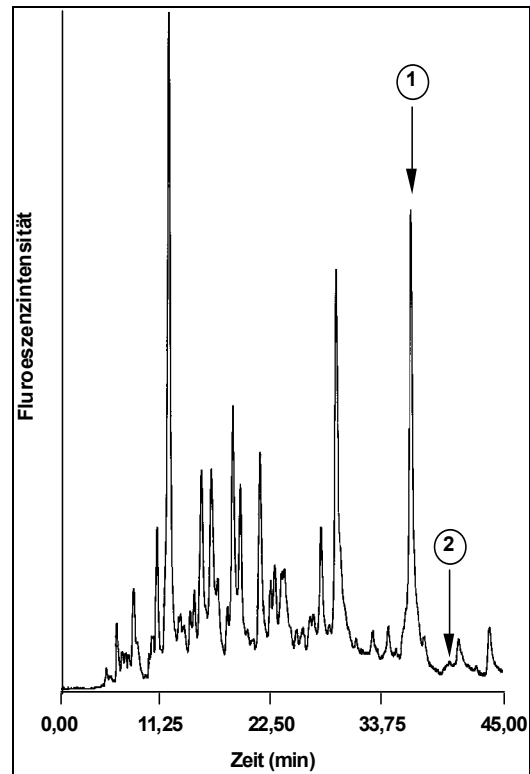


Abb. 5.33: HPLC-Trennung einer 5-Stunden Urinprobe eines männlichen Freiwilligen, der zum Zeitpunkt $t = 0$ oral 5 mg d_{16} -Bisphenol A aufgenommen hatte. Ein Aliquot von 20 μl des Urins wurde mittels HPLC getrennt und d_{16} -Bisphenol A Glucuronid ① mittels Fluoreszenzdetektor quantifiziert. Die Konzentration an freiem d_{16} -Bisphenol A in den Proben lag unter 5 pmol/20 μl ; ② Retentionszeit von Bisphenol A.

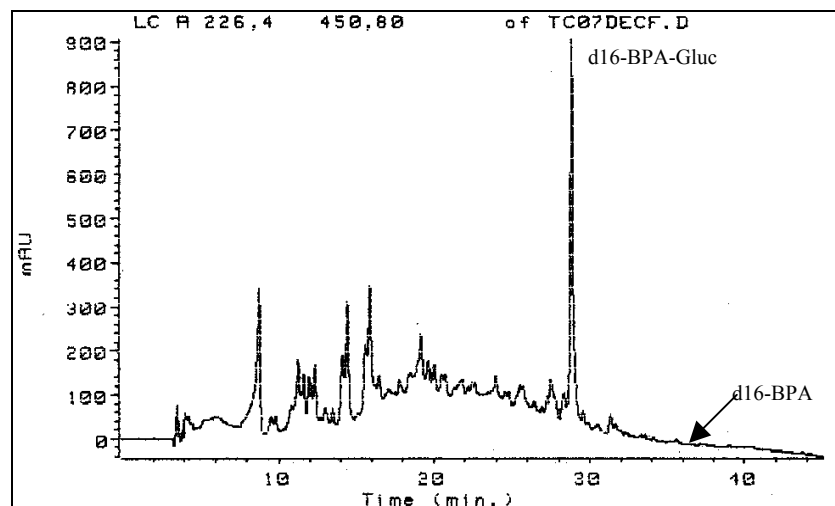


Abb. 5.34: HPLC-Trennung einer 5-Stunden Urinprobe eines männlichen Freiwilligen, der zum Zeitpunkt $t = 0$ oral 5 mg d_{16} -Bisphenol A aufgenommen hatte. Die Urinprobe wurde mittels HPLC getrennt und d_{16} -Bisphenol A Glucuronid per UV-Detektion bestimmt. Freies d_{16} -Bisphenol A war nicht nachzuweisen.

Die Ausscheidung von d_{16} -Bisphenol A (nach enzymatischer Spaltung) der Konjugate mit dem Urin der Probanden ist in Abbildung 5.35 nach Geschlechtern getrennt graphisch dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte der ausgeschiedenen Mengen \pm der Standardabweichungen für jeweils drei Probanden. Man erkennt, daß die maximale Ausscheidung von d_{16} -Bisphenol A in der Form seines Glucuronides in Urin bereits fünf Stunden nach oraler Applikation erreicht wurde. Die Elimination mit dem Urin verlief sehr schnell mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 3,1 \pm 0,1$ h. Nach spätestens 34 h wurde die Nachweisgrenze erreicht. Die Summe der mit dem Urin ausgeschiedenen Menge an d_{16} -Bisphenol A betrug $110,8 \pm 5,2$ % der gegebenen Dosis in weiblichen und $113,3 \pm 28,9$ % in männlichen Probanden. Eine Analyse der Urinproben nach enzymatischer Spaltung mit HPLC/FLD bestätigte den Befund, daß die gegebene Dosis von 5 mg fast vollständig in der Glucuronid-Form im Urin wiedergefunden wurde.

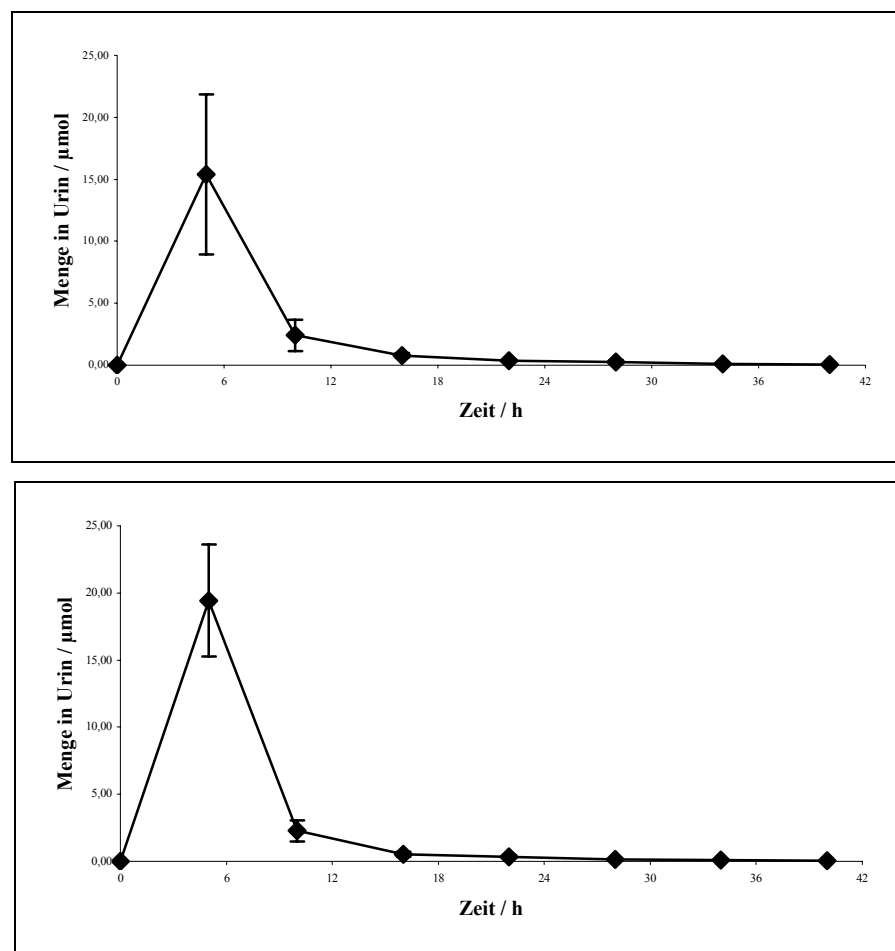


Abb. 5.35: Elimination von d_{16} -BPA (nach enzymatischer Spaltung) mit dem Urin von jeweils drei Probanden nach oraler Gabe von 5 mg. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Obere Kurve = weibliche Probanden, untere Kurve = männliche Probanden

Der größte Teil der wiedergefundenen Dosis wurde innerhalb von sechs Stunden nach Applikation ausgeschieden.

In Tab. 5.4 sind die Summen der ausgeschiedenen Mengen an Gesamt-d₁₆-BPA nach enzymatischer Spaltung aus dem Urin der Probanden aufgeführt. Eine Aufsummierung der in den einzelnen Urinproben gemessenen Mengen an d₁₆-Bisphenol A ergab eine über sechs Probanden gemittelte Wiederfindung von $112,1 \pm 18,6$ % der applizierten Menge im Urin.

Tab. 5.4: Übersicht über die mit dem Urin ausgeschiedenen Gesamtmengen an d₁₆-BPA, dessen Anteil an der applizierten Dosis und die Eliminationshalbwertszeiten

Proband	Gesamtmenge / μmol	Prozent der Dosis / %	Halbwertszeit / h
A	23,4	114,2	2,9
B	21,5	104,9	3,4
C	23,2	113,3	3,2
E	27,9	135,9	2,8
F	25,3	123,2	2,7
G	16,6	80,8	3,4
Mittelwerte	$23 \pm 3,8$	$112,1 \pm 18,6$	$3,1 \pm 0,3$

Es konnten keine Unterschiede in den Halbwertszeiten der Ausscheidung sowie der Gesamtmenge an d₁₆-BPA in Urin zwischen weiblichen und männlichen Probanden beobachtet werden.

5.12 Hintergrundbelastung des Menschen

In der jüngeren Vergangenheit wurde wiederholt über verschiedenste Expositionsquellen für Bisphenol A berichtet, über die die Allgemeinbevölkerung, z.B. durch Nahrungsmittel, Trinkwasser, Zahnfüllungen etc., mit BPA belastet werden könnte (s.a. Kapitel 2.5). In diesem Zusammenhang wurde auch über hohe Hintergrundwerte im nicht expliziert exponierten Menschen spekuliert. Da im Rahmen dieser Arbeit eine sehr sensitive Methode für den Nachweis von Bisphenol A in Plasma entwickelt worden war, wurde die Gelegenheit genutzt, einige „gepoolte“ humane Plasmaproben gesunder Probanden, die nicht gesondert gegenüber Bisphenol A exponiert worden waren, nach enzymatischer Spaltung per GC/MS-

NCI auf die Anwesenheit von Bisphenol A zu untersuchen. Um die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze von Bisphenol A zu ermitteln, wurde eine Blindprobe analysiert, bei der statt Plasma destilliertes Wasser eingesetzt wurde. Die restliche Probenaufbereitung (interner Standard, Extraktion, Derivatisierung) erfolgte analog zu den Plasmaproben. Für die Quantifizierung von Bisphenol A in Plasma (Abb. 5.36 zeigt die dazugehörige Eichgerade) konnte mit dieser Methode trotz des Hintergrundes durch ubiquitär vorhandenes BPA (dazu s.a. Kapitel 5.1) eine Bestimmungsgrenze (definiert über die siebenfache Standardabweichung der Blindprobe) von 27 ± 3 pmol/mL Plasma erreicht werden, bis zu der BPA sicher quantifizierbar war. BPA war in Eichproben auch noch darunter bis zu einer Nachweisgrenze (bestimmt über die dreifache Standardabweichung der Blindprobe) von 15 ± 5 pmol/ml Plasma nachweisbar. In vier von fünf untersuchten Plasmaproben konnte im Rahmen der Bestimmungsgrenze kein Bisphenol A quantifiziert werden, in einer weiteren Probe wurde ein Gehalt von $37 \pm 0,3$ pmol/mL Plasma gefunden. In allen Proben war ein Signal für Bisphenol A erkennbar, das sich aus dem angesprochenen Hintergrundrauschen ergab. Im Rahmen der oben genannten Definitionen für Nachweis- und Bestimmungsgrenze lagen diese Signale (mit der einen genannten Ausnahme) aber unter der definierten Nachweisgrenze.

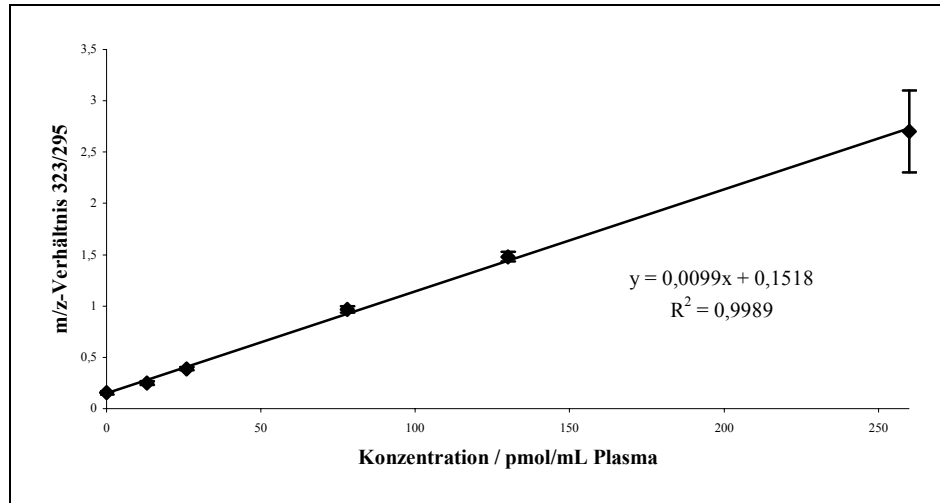


Abb. 5.35: Eichkurve zur Quantifizierung von Bisphenol A aus Human-Plasma per GC/MS.

Die doppelte GC/MS-Bestimmung zur Bestimmung von Wiederholbarkeit und Genauigkeit der Analysenmethode zur Quantifizierung von BPA in Plasmaproben ergab bei nominal 13 pmol/ml Plasma $9,7 \pm 1,8$ pmol/ml, bei 78 pmol/ml $82,1 \pm 3,2$ pmol/ml und bei nominal 130 pmol/ml $134,3 \pm 4,8$ pmol/ml (jeweils Mittelwerte \pm Standardabweichungen).

6 Diskussion

6.1 Vergleich und Bewertung der analytischen Methodik

Wie bereits in Kapitel 5.1 angesprochen, war die Entwicklung empfindlicher analytischer Methoden zur Bestimmung toxikokinetischer Parameter ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit. Bei der Untersuchung der mit hohen Dosen exponierten Ratten (100 bzw. 200 mg/kg KG) konnte auf eine einfache HPLC-Methode mit UV-Detektion (DAD) zurückgegriffen werden, die ohne Probenvorbereitung eine zuverlässige Bestimmung der Analyten bis zu einer Konzentration von 25 nmol Daidzein und 10 nmol Bisphenol A pro mL Urin erlaubte. Bei Verwendung eines Festwellenlängendetektors zur UV-Detektion konnte die Nachweisgrenze für Daidzein auf 3,5 nmol/mL Urin gesenkt werden.

Für die Humanexpositionen mit einer applizierten Gesamtdosis von nur 5 mg (entsprechend etwa 70 µg/kg KG bei einem 70 kg schweren Erwachsenen) mußten jedoch Methoden entwickelt werden, die den sicheren, reproduzierbaren und spezifischen Nachweis der Verbindungen auch in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich in biologischen Matrices erlaubten. Der empfindliche Nachweis von Bisphenol A in Plasma und Urin gelang mit einer GC/MS-Methode, die im SIM-Modus nach Derivatisierung mit MBTFA bei negativer chemischer Ionisation eine sichere Quantifizierung bis zu einer Konzentration von 20 fmol/µl Injektionsvolumen (entsprechend der Probenvorbereitung gleichbedeutend mit 10 pmol/mL Plasma) bei der Untersuchung von Plasma- und 300 fmol/µL Injektionsvolumen (entsprechend der Probenvorbereitung gleichbedeutend mit 1 nmol/mL Urin) bei der Untersuchung von Urinproben erlaubte. Zur Überprüfung der in Urinproben erhaltenen Werte stand mit einer HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion eine weitere sehr sensitive Methode zur Wahl, die den Nachweis von Bisphenol A ebenfalls bis zu einer Konzentration von 300 fmol/mL Injektionsvolumen (entsprechend der Probenvorbereitung gleichbedeutend mit 5 nmol/mL Urin) erlaubte.

Im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen stellt dies eine sehr gute Empfindlichkeit dar. Upmeier, A. *et al.*, 2000, konnten Bisphenol A in Blutplasma von Ratten mit einer GC/MS-Methode im EI-Modus bis zu einer Konzentration von 50 pmol/mL Plasma nachweisen. Bei der Untersuchung von in Dosen abgepackten Nahrungsmitteln berichteten Yoshida, T. *et al.*, 2001, von einer Nachweisgrenze von 20 pmol/mL Flüssigphase. Mit der nochmals um den Faktor zwei verbesserten Bestimmungsgrenze konnte in dieser Arbeit trotz der komplexen Matrix Plasma eine sehr gute Nachweisempfindlichkeit gewährleistet werden, die für die Beantwortung der toxikologischen Fragestellung damit gut geeignet war.

Für die Humanexposition mit BPA wurde die deuterierte Verbindung gegeben, da sich trotz äußerster Sorgfalt bei der Probenvorbereitung und dem weitgehenden Verzicht auf Kunststoffmaterialien ein Hintergrundwert von BPA von < 10 pmol/mL, der damit aber noch unter der Bestimmungsgrenze lag, nicht vermeiden ließ. Solche Hintergrundbelastungen wurden auch von Kuch, H. M. und Ballschmiter, K., 2001, bei der Analyse von Wasserproben mit einer empfindlichen GC/MS-NCI-Methode unter Pentafluorbenzoylchloridderivatisierung in ihren Kontrollproben und in Millipore-Wasser gefunden. Bei der Untersuchung von Serumproben per HPLC gekoppelt mit einem elektrochemischen Detektor (ECD) konnten ebenfalls Hintergrundwerte im Bereich von 40-80 fmol/mL Millipore-Wasser detektiert werden (Inoue, K. *et al.*, 2000). Dies deutet darauf hin, daß unabhängig von der Ursache der Verunreinigung (sei sie gerätetechnisch bedingt, wie beispielsweise durch das Bluten des GC-Septums, oder durch die Art der Probenvorbereitung verursacht, wie z.B. BPA aus SPE-Säulchen oder aus mit Millipore-Wasser angesetzten Pufferlösungen) Bisphenol A bei Verwendung einer empfindlichen Methodik ubiquitär nachweisbar ist.

Im Vergleich zur Quantifizierung von Bisphenol A war der Nachweis von Daidzein in humanen Plasma- und Urinproben nur mit deutlich geringerer Empfindlichkeit möglich. So lag die Nachweisgrenze für Daidzein in Plasma bei Verwendung einer GC/MS-EI-Methode nach Silylierung bei 120 fmol/ μ L Injektionsvolumen (entsprechend der Probenvorbereitung gleichbedeutend mit 30 pmol/mL Plasma), in Urinproben bei Verwendung einer HPLC/UV-Methode bei 5 pmol/ μ L Injektionsvolumen (entsprechend der Probenvorbereitung gleichbedeutend mit 0,5 nmol/mL Urin).

Diese vergleichsweise schlechte Nachweisbarkeit von Daidzein in biologischen Matrices spricht auch aus den Nachweisgrenzen anderer Arbeitsgruppen. Beispielsweise fanden Janning, P. *et al.*, 2000, ebenfalls eine gegenüber Bisphenol A verschlechterte Nachweisgrenze und wiesen Daidzein in Plasma mit einer HPLC/UV-Methode bis zu 100 pmol/mL nach. Tekel, J. *et al.*, 1999, weisen Daidzein in Humanurin mit einer GC/MS-Methode bis zu einer Konzentration von 10 pmol/mL nach. Um diese Nachweisgrenze zu erreichen, setzen die Autoren jedoch 20 mL Urin ein (in dieser Arbeit wurden 2 mL Urin eingesetzt) und schalten nach den ersten Extraktionsschritt noch eine weitere Aufreinigung über eine Extraktionssäule. Für die routinemäßige Untersuchung großer Mengen an Proben, wie sie in dieser Arbeit anfielen, war dieses Verfahren daher ungeeignet. Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit die Nachweisgrenze von Daidzein in humanen Proben im Vergleich zur

Analyse von Rattenurinen verbessert werden und eine Empfindlichkeit erreicht werden, die die Quantifizierung der Proben der Humanstudie erlaubt.

6.2 Biotransformation und Toxikokinetik von Daidzein

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Biotransformation und Kinetik der Ausscheidung von Daidzein untersucht, um einen Beitrag zur Extrapolation toxikologischer Daten zur hormonellen Wirkung, die in *in vitro*-Testsystemen ermittelt wurden, auf den Menschen zu leisten. Dazu wurde Daidzein zunächst *in vitro* mit Lebermikrosomen inkubiert, um eventuelle oxidative Metabolite zu identifizieren. Danach wurde die Biotransformation und Kinetik in Fischer F344-Ratten nach oraler Gabe von Daidzein bestimmt. Anhand der im Tierversuch gewonnenen Daten wurde abschließend die Disposition und Ausscheidung von Daidzein in freiwilligen Probanden nach kontrollierter oraler Exposition untersucht.

6.2.1 Biotransformation *in vitro*

In Inkubationen von Daidzein mit unbehandelten Lebermikrosomen konnten auch nach Variation der Inkubationsdauer und der eingesetzten Proteinmenge keine oxidativen Metabolite nachgewiesen werden; in den Lösungen war nur Daidzein selbst nachweisbar. Im Widerspruch zu diesem Ergebnis wurde von der Arbeitsgruppe um Metzler (Kulling, S. E. *et al.*, 2000) nach Inkubation mit Lebermikrosomen der Ratte über die Identifizierung von neun oxidativen Daidzein-Metaboliten (mono- bis trihydroxylierte Derivate) berichtet. Die für die Präparation der Mikrosomen verwendeten Wistar-Ratten waren jedoch im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendeten Tiere zuvor mit Aroclor 1254 induziert worden; bei der Inkubation der strukturell sehr ähnlichen Flavonoide einerseits mit durch Aroclor 1254 induzierten Rattenlebermikrosomen und andererseits mit nicht induzierten Mikrosomen wurde von Nielsen, S. E. *et al.*, 1998, festgestellt, daß es nach Induktion der Ratten zu einem extensiven *in vitro* Metabolismus kam, während die Inkubation mit nicht induzierten Mikrosomen nur zu geringen Umsätzen führte. Diese Abhängigkeit der metabolischen Leistung von der Vorbehandlung der Mikrosomen deutet auf die Beteiligung der durch Aroclor 1254 induzierbaren Cytochrom P450-Isozyme, vor allem CYP1A1 hin. Dieses Isozym ist in der nicht-induzierten Leber zahlreicher Spezies, einschließlich der des Menschen, jedoch praktisch nicht vorhanden (Oesch, F., 1997). Zudem nimmt die Belastung des Menschen mit polychlorierten Biphenylen, die zu einer Induktion von CYP1A1 in der

Lage sind, kontinuierlich ab. Aus diesem Grunde ist eine ausgeprägte oxidative Metabolisierung, wie sie nach Aroclor-Induktion gefunden wurde, *in vivo* nicht zu erwarten.

6.2.2 Biotransformation *in vivo* und Toxikokinetik in der Ratte

In den durchgeführten Tierstudien konnte im Urin der Ratten nur ein geringer Teil der applizierten Dosis an Daidzein als freie Substanz (ca. 1 % der Dosis) oder in Form von Glucuronid- oder Sulfatkonjugaten (ca. 8 % der Dosis) wiedergefunden werden. Die Untersuchung der Urinproben lieferte keine Hinweise auf oxidative Phase I-Metaboliten, das Vorhandensein der funktionellen (Hydroxy-)Gruppen erlaubte die Konjugierung von Daidzein zu den gut wasserlöslichen Konjugaten. Die Molekulargewichte der möglichen Daidzein-Konjugate (429 Da für Glucuronide, 333 Da für Sulfate, 604 Da für Diglucuronide, 412 Da für Disulfate, 508 Da für Dikonjugat-Mischformen) liegen alle deutlich über dem Wert von 300 Da, bis zu dem bei Ratten die renale Exkretion dominiert (Nau, H., 1997), wodurch sich die geringe Wiederfindung in Urin erklärt. Die exakte Regiochemie der in der Ratte auftretenden Konjugate wurde von Yasuda, T. *et al.*, 1994, aufgeklärt, danach koppelt die Glucuronsäuregruppe bevorzugt an das Sauerstoffatom in Position 7 zu dem 7-O- β -D-Glucuronid von Daidzein während die Sulfatgruppe an das Sauerstoffatom in Position 4' koppelt zu 4'-O-Sulfat (s. Abbildung 6.1).

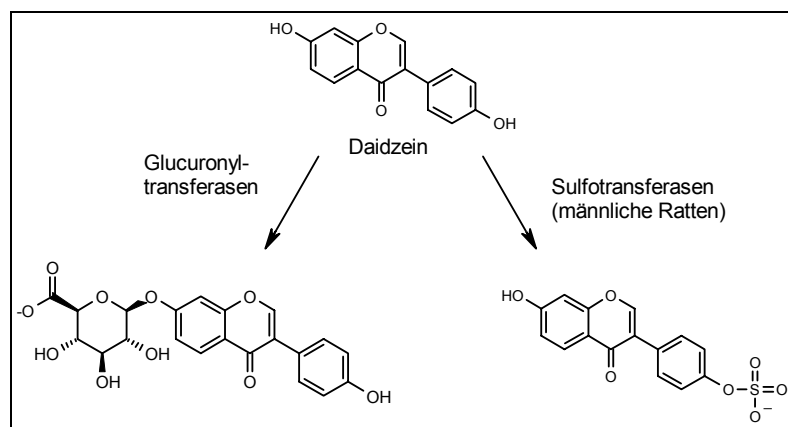


Abb. 6.1: Konjugation von Daidzein an die Glucuronsäure- (links) bzw. Sulfatgruppe.

Bei der Bildung des Sulfates war ein deutlicher Geschlechtsunterschied zu beobachten, das Sulfatkonjugat wurde in quantifizierbaren Mengen nur von männlichen Ratten ausgeschieden und stellte bei diesen den Hauptmetaboliten im Urin dar. Dies läßt sich über Geschlechtsunterschiede in der Expression spezifischer Sulfotransferasen in der Leber

männlicher Ratten erklären. Phenol-Sulfotransferase beispielsweise ist in der männlichen Ratte in viel höherer Aktivität vorhanden als in der weiblichen (Falany, C. N. und Wilborn, T. W., 1994). Basierend auf Substrateigenschaften und Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen Substraten für Sulfotransferasen kann man schließen, daß die für die männliche Ratte spezifische Phenol-Sulfotransferase einen Hauptbeitrag zur Bildung von Daidzeinsulfat in männlichen Ratten lieferte.

Die hohe Wiederfindung von Daidzein in den Faeces könnte entweder auf eine ineffiziente Resorption der Verbindung aus dem Magen-Darm-Trakt hinweisen oder für eine intensive Konjugation von Daidzein in der Leber, gefolgt von einem enterohepatischen Kreislauf der gebildeten Konjugate mit nachgeschalteter Spaltung der Konjugate durch Glucuronidase- bzw. Sulfataseaktivität der Darmbakterien sprechen. Dies würde ebenfalls zu einer hohen Ausscheidung von Daidzein über die Faeces führen. Wahrscheinlich ist jedoch hauptsächlich die unvollständige Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt für den hohen Anteil der verabreichten Dosis, der über die Faeces ausgeschieden wurde, verantwortlich. Wenn man annimmt, daß das sehr gut wasserlösliche Daidzeinsulfat aus der Leber über das Blut in den Urin eliminiert wird, sollten sich die Unterschiede in dem Ausmaß der Sulfatbildung in weiblichen und männlichen Ratten daher in Unterschieden in der Ausscheidung von Daidzein über die Faeces bemerkbar machen und zu einer im Vergleich zu weiblichen Ratten geringeren Wiederfindung in männlichen Ratten führen. Da in der Ausscheidung über die Faeces jedoch keine Geschlechtsunterschiede zu beobachten waren, steht zu vermuten, daß die enterohepatische Zirkulation der Daidzeinkonjugate keinen großen Einfluß auf die Disposition von Daidzein hatte. Darüberhinaus lieferte die schnelle Ausscheidung von Daidzein über die Faeces und von freiem Daidzein und seinen Konjugaten mit dem Urin keinerlei Hinweise auf einen enterohepatischen Kreislauf.

Ein geringer Teil der applizierten Dosis wurde von den Ratten im Magen-Darm-Trakt wahrscheinlich durch Darmbakterien zu *O*-Desmethylangolensin und Equol reduziert (siehe Abb. 6.2). Diese beiden Verbindungen konnten nur in Faecesproben nachgewiesen werden.

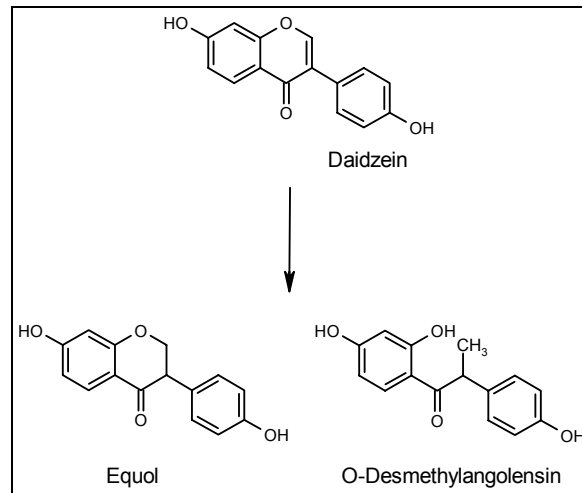


Abb. 6.2: Abbau von Daidzein im Darm von Ratten zu Equol und *O*-DMA.

Eine weitergehende Spaltung des Ringsystems von Daidzein konnte nicht beobachtet werden. Insgesamt konnte gezeigt werden, daß Daidzein nur unvollständig aus dem Magen-Darm-Trakt von Ratten resorbiert wurde und aufgenommene Mengen an Daidzein effizient in einem Phase II-Metabolismus konjugiert und ausgeschieden wurden. Dies resultierte in einer sehr geringen oralen Bioverfügbarkeit der freien Substanz von etwa einem Prozent. Daidzein und seine Konjugate wurden schnell ausgeschieden, wobei die Halbwertszeiten der Eliminationsphase zwischen 4 und 7 h lagen.

6.2.3 Toxikokinetik im Menschen

Basierend auf den Ergebnissen der Tierstudie wurde die Biotransformation und Toxikokinetik von Daidzein ebenfalls in freiwilligen Probanden untersucht. Die erhaltenen Daten zeigen, daß Daidzein im Menschen im Vergleich zur Ratte besser resorbiert wurde. Im Urin wurden etwa 39 % der applizierten Dosis überwiegend in konjugierter Form wiedergefunden. Die Konzentrationen an freiem Daidzein in Urin betragen weniger als drei Prozent der Konjugate. Die Molekulargewichte der möglichen Daidzein-Konjugate (429 Da für Glucuronide, 333 Da für Sulfate, 604 Da für Diglucuronide, 412 Da für Disulfate, 508 Da für Dikonjugat-Mischformen) liegen im Gegensatz zur Ratte mehrheitlich deutlich unter dem Wert von 475 Da, bis zu dem im Menschen die renale Exkretion dominiert (Nau, H., 1997). Dies erklärt, weshalb im Vergleich zur Ratte im Menschen deutlich mehr Glucuronid gemessen werden konnte. Als Hauptmetabolit konnte in dieser Arbeit Daidzein-Glucuronid identifiziert werden. Neben dem schon bei der Ratte beschriebenen 7-O- β -D-Glucuronid wurde von Doerge, D. R. *et al.*, 2000, per LC/MS im Menschen zusätzlich auch das an Position 4 glucuronidierte Konjugat identifiziert. Die Ausscheidung mit dem Urin verlief im Vergleich

mit der Ratte langsamer, die maximale Ausscheidung über den Harn wurde erst zehn Stunden nach Applikation beobachtet. Auch die durchschnittliche Halbwertszeit der Elimination lag etwa eine Stunde höher als bei der Ratte. Die Elimination aus dem Blut verlief parallel dazu mit der gleichen Halbwertszeit. Weitere Metabolite, wie die in verschiedenen Studien in Humanurin nachgewiesenen Daidzein-Metaboliten Equol und *O*-DMA (Watanabe, S. *et al.*, 1998; Adlercreutz, H. *et al.*, 1991) konnten mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht nachgewiesen werden. Aus diesen Studien ist bekannt, daß die Menge dieser beiden Metabolite maximal zehn Prozent der ausgeschiedenen Menge an Daidzein beträgt, der Nachweis gelang zudem nur nach Gabe eines Vielfachen der von uns verwendeten Dosis an Daidzein, appliziert in Form von Sojaprodukten, die immer ein Gemisch aus verschiedenen Isoflavonen enthalten (Watanabe *et al.* beispielsweise gaben 60 g eines Kinako genannten Sojaproduktes, das umgerechnet etwa 26 mg Daidzein enthielt).

Die unvollständige Wiederfindung in Urin ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Watanabe, S. *et al.*, 1998, die nach Gabe von Daidzein (in Form von Sojabohnenpulver) eine Wiederfindung in Urin von $35,8 \pm 13,46$ % der applizierten Dosis errechneten. Die Untersuchung der Elimination von Daidzein in Ratten hatte bereits gezeigt, daß die Resorption von Daidzein aus dem Magen-Darm-Trakt nicht vollständig war. Setchell, K. D., 1998, berichtet, daß übereinstimmend in mehreren Studien nur etwa 30 - 40 % der jeweils verabreichten Dosis an Daidzein in Urin und Plasma wiedergefunden werden konnte. Da die Wiederfindung in Faeces beim Menschen sehr gering ist (Xu, X. *et al.*, 1994) und auch Abbauprodukte von Daidzein wie Equol und *O*-DMA im Urin weniger als zehn Prozent der als Daidzein ausgeschiedenen Mengen ausmachen, läßt sich der Verbleib eines Großteils der applizierten Dosis bisher nicht erklären.

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß Daidzein nur unvollständig resorbiert wurde und die aufgenommenen Mengen an Daidzein effizient in einem Phase II-Metabolismus konjugiert und ausgeschieden wurden. Dies resultierte in einer sehr geringen oralen Bioverfügbarkeit der freien Verbindung von weniger als 1 % der applizierten Dosis. Daidzein und seine Konjugate wurden schnell ausgeschieden, wobei die Halbwertszeiten der Elimination aus Urin und Plasma zwischen vier und fünf Stunden lagen. Tabelle 6.1 gibt noch einmal einen Überblick über die wichtigsten gemessenen toxikokinetischen Parameter nach Konjugatspaltung.

Tab. 6.1: Überblick über die wichtigsten toxikokinetischen Parameter, die nach einmaliger oraler Gabe von 5 mg Daidzein an freiwillige Probanden ermittelt wurden. Die Werte gelten für Gesamt-Daidzein nach Konjugatspaltung.

	c_{\max}	t_{\max}	$t_{1/2}$	% der Dosis
Urin	6,9 ± 2,2 nmol/ml	11,2 ± 4,2 h	4,7 ± 1,9 h	38,6 ± 12,8 %
Plasma	44,9 ± 11,2 pmol/ml	7,2 ± 3,3 h	9,5 ± 3,6 h	-

6.2.4 Bedeutung der Ergebnisse im Hinblick auf eine unerwünschte endokrine Wirkung

Wie gezeigt werden konnte, liegt Daidzein auch im Menschen hauptsächlich in Form seiner gut wasserlöslichen Konjugate vor. Nur ein geringer Anteil der Dosis (ca. 1 %) lag als freies Daidzein vor. Untersuchungen zur östrogenen Potenz von Daidzein-Glucuronid haben gezeigt, daß das Glucuronid im Vergleich zu Daidzein etwa zehnmal weniger wirksam ist (Zhang, Y. *et al.*, 1999). Die geringe biologische Wirksamkeit der Glucuronide und die geringe Resorption von Daidzein lassen erwarten, daß Daidzein in den in westlichen Ländern aufgenommenen Mengen (s. Kapitel 6.4) trotz relativ hoher Affinität für den Östrogenrezeptor im Menschen nur zu schwachen östrogenen Effekten führen sollte. Hormonelle Wirkungen, die für den Menschen beschrieben sind, lassen sich auf die Gabe hoher therapeutischer Dosen (z.B. in der Behandlung von Osteoporose) oder veränderte Ernährungsgewohnheiten (z.B. Vegetarier, Bevölkerung asiatischer Länder) zurückführen (Bennetau-Pelissero, C. *et al.*, 2000).

Dies zeigt, daß Daten zur Biotransformation und Toxikokinetik einen wichtigen Beitrag zur Abschätzung östrogenen Wirkungen von Umwelthormonen leisten.

6.3 Biotransformation und Toxikokinetik von Bisphenol A und d₁₆-Bisphenol A

Im Rahmen dieser Arbeit wurde weiterhin die Biotransformation und Kinetik der Ausscheidung von Bisphenol A untersucht, um einen Beitrag zur Extrapolation toxikologischer Daten zur hormonellen Wirkung, die in *in vitro*-Testsystemen ermittelt wurden, auf den Menschen zu leisten. Dazu wurde BPA zunächst *in vitro* mit Lebermikrosomen inkubiert, um eventuelle oxidative Metabolite zu identifizieren. Danach wurde die Biotransformation und Kinetik in Fischer F344-Ratten nach oraler Gabe von BPA bestimmt. Anhand der im Tierversuch gewonnenen Daten wurde abschließend die Disposition und Ausscheidung von d₁₆-Bisphenol A in freiwilligen Probanden nach kontrollierter oraler Exposition untersucht.

6.3.1 Biotransformation *in vitro*

In Inkubationen von Bisphenol A mit unbehandelten Lebermikrosomen konnten in dieser Arbeit keine oxidativen Metabolite nachgewiesen werden; in den Lösungen war nur BPA selbst nachweisbar. Bei der Inkubation von Bisphenol A mit Rattenhepatocyten konnte neben dem Hauptmetaboliten Bisphenol A-Glucuronid per LC/MS auch ein in geringem Umfang gebildeter oxidativer Metabolit, der als 5-OH-BPA identifiziert wurde, nachgewiesen werden (Nakagawa, Y. und Suzuki, T., 2001; Elsbey, R. *et al.*, 2001).

6.3.2 Biotransformation *in vivo* und Toxikokinetik in der Ratte

In den durchgeführten Tierstudien konnte im Urin der Ratten nur ein geringer Teil der applizierten Dosis an Bisphenol A als freie Substanz (ca. 2-3 % der Dosis) oder in Form des als Hauptmetaboliten gefundenen Glucuronidkonjugates (ca. 4-8 % der Dosis) wiedergefunden werden. In geringen Mengen konnte weiterhin qualitativ ein Sulfatkonjugat nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Urinproben lieferte keine Hinweise auf oxidative Phase I-Metaboliten, das Vorhandensein der funktionellen (Hydroxy-)Gruppen erlaubte die Konjugierung von BPA zu den gut wasserlöslichen Konjugaten. Die Molekulargewichte der möglichen Bisphenol A-Konjugate (403 Da für Glucuronide, 307 Da für Sulfate, 578 Da für Diglucuronide, 386 Da für Disulfate, 482 Da für Dikonjugat-Mischformen) liegen alle über dem Wert von 300 Da, bis zu dem bei Ratten die renale Exkretion dominiert (Nau, H., 1997), wodurch sich die geringe Wiederfindung in Urin erklärt.

Bei der Bildung des Glucuronides war ein deutlicher Geschlechtsunterschied zu beobachten. Die weibliche Ratte schied in etwa die doppelte Menge Bisphenol A-Glucuronid aus wie die männliche, was in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen steht (Pottenger, L. H. *et al.*, 2000). Eine mögliche Erklärung dafür sind Geschlechtsunterschiede in der Konjugationsfähigkeit, wie sie von anderen Verbindungen bekannt sind (Mulder, G. J., 1986). Ein Beispiel dafür ist die im Vergleich zur männlichen Ratte größere Aktivität in der β -Glucuronidierung von 17β -Östradiol (Zhu, B. T. *et al.*, 1996). Eine andere mögliche Erklärung der gefundenen Unterschiede könnten Geschlechtsunterschiede bei der extrahepatischen Glucuronidierung, entweder im Darm oder in der Niere, sein, wie sie ebenfalls schon beobachtet wurden (Rush, G. F. *et al.*, 1983).

Der auffällige, mehrgipflige Verlauf der Bisphenol A-Eliminationskurven nach oraler Gabe deuten auf eine extensive enterohepatische Zirkulation von Bisphenol A hin. Ein solcher Kreislauf ist bei der Disposition von natürlichen und synthetischen steroidalen Östrogenen wohlbekannt (Loffler, S. und Bolt, H. M., 1980). Bei der Untersuchung der Toxikokinetik von Bisphenol A in DA/Han-Ratten konnten auch in Plasma Hinweise auf einen solchen enterohepatischen Kreislauf gefunden werden (Upmeier, A. *et al.*, 2000).

Die in den Faeces bestimmte geringe Wiederfindung von Bisphenol A während des Sammelzeitraumes von 48 h deutet auf eine extrem langsame Ausscheidung von BPA hin. Die Untersuchung einer amerikanischen Gruppe zur Ausscheidung von BPA in weiblichen F344-Ratten nach oraler Gabe einer Dosis von 100 mg/kg KG zeigte, daß innerhalb der ersten 24 h nur etwa 10 % der applizierten Dosis in den Faeces wiedergefunden werden konnten. Der Hauptanteil der über die Faeces ausgeschiedenen Menge wurde über die nächsten 100 h verteilt gefunden (Snyder, R. W. *et al.*, 2000). Auch dies spricht für einen ausgeprägten enterohepatischen Kreislauf von Bisphenol A, in dessen Verlauf vorhandene Konjugate aus der Leber über die Gallenflüssigkeit wieder in den Darm ausgeschieden, durch Darmbakterien dekonjugiert und nach Rückresorption erneut in der Leber konjugiert werden.

Eine frühe Untersuchung zur Biotransformation von Bisphenol A in Ratten berichtete über das Auftreten eines hydroxylierten Metaboliten in den Faeces (Knaak, J. B. und Sullivan, L. J., 1966). Ein solcher konnte in der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert werden. Bei der zitierten Untersuchung wurde Bisphenol A in einer Dosis von 800 mg/kg KG appliziert, wohingegen in der vorliegenden Studie eine Dosis von 200 mg/kg KG gewählt wurde. Möglicherweise kam es in der zitierten Arbeit nur aufgrund der Erschöpfung anderer metabolischer Wege zur Bildung des Hydroxy-BPA's. So wurde berichtet, daß es aufgrund des Fehlens einer Typ I-Bindung von Bisphenol A in Rattenmikrosomen bei Konzentrationen

bis zu 20 nM offensichtlich nicht zu einer Bindung an oxidatives Cytochrom P450 kommt und daher bei geringen Dosen höchstens ein minimaler oxidativer BPA-Metabolismus auftreten sollte (Pfeiffer, E. und Metzler, M., 1998). Unterstützt wird diese Hypothese auch von dem Befund, daß BPA-Sulfate und 5-OH-BPA-Sulfat *in vitro* in Rattenhepatozyten nur bei höheren Substratkonzentrationen gebildet wurden, nachdem wahrscheinlich der Glucuronidierungspfad gesättigt war (Elsby, R. *et al.*, 2001). Auch eine weitere *in vivo* Untersuchung zur Biotransformation von BPA in Fischer-Ratten konnte kein hydroxyliertes Derivat von Bisphenol A finden (Pottenger, L. H. *et al.*, 2000).

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß Bisphenol A in Urin hauptsächlich in Form von Phase II-Konjugaten vorlag und der überwiegende Teil der Dosis mit den Faeces ausgeschieden wurde. Dies resultierte in einer relativ geringen oralen Bioverfügbarkeit der freien Substanz von weniger als drei Prozent. Bisphenol A und seine Konjugate wurden sehr langsam ausgeschieden, am Ende der Beobachtungsperiode von 96 h war noch immer Bisphenol A im Urin der Ratten nachweisbar.

6.3.3 Toxikokinetik in der Maus

Aufgrund der geringen applizierten Dosen an Bisphenol A ließ sich die Ausscheidung nur als Gesamt-Bisphenol A nach enzymatischer Spaltung bestimmen. In beiden Dosisgruppen wurde die maximale Urin-Konzentration bereits zwölf Stunden nach Exposition gemessen. Die weitere Ausscheidung verlief schnell und ohne einen Hinweis auf einen enterohepatischen Kreislauf, wie er bei der Ratte beobachtet worden war.

In der niedrigen Dosisgruppe konnte wiederum ein deutlicher Unterschied in der Ausscheidung von Bisphenol A zwischen weiblichen und männlichen Tieren beobachtet werden. Die erhöhte Ausscheidung in weiblichen Mäusen läßt sich wahrscheinlich über ähnliche Geschlechtsunterschiede in der Konjugationsfähigkeit der Tiere erklären, wie das oben für die Ratte dargestellt wurde.

Auffallend ist, daß der Prozentsatz der ausgeschiedenen Menge an Gesamt-BPA bei der höheren Dosisgruppe in der weiblichen Maus zurückgeht (5 % gegenüber 15 %). Dies könnte auf eine Sättigung der Phase II-Reaktionswege schon bei einer Dosis von 20 mg/kg KG hindeuten. Weitere toxikokinetische Untersuchungen zu Bisphenol A in der Maus wurden bisher noch nicht durchgeführt. Aus dem Fehlen einer östrogenen Wirkung im uterotrophen Test bei noch nicht geschlechtsreifen Mäusen nach der oralen Verabreichung einer Dosis von

300 mg/kg KG wurde jedoch auf eine noch geringere Bioverfügbarkeit von Bisphenol A im Vergleich zur Ratte geschlossen (Tinwell, H. *et al.*, 2000).

6.3.4 Toxikokinetik im Menschen

Basierend auf den Ergebnissen der Tierstudie wurde die Biotransformation und Toxikokinetik von Bisphenol A ebenfalls in freiwilligen Probanden untersucht. Da bisher noch keine Untersuchungen zur Disposition von Bisphenol A im Menschen durchgeführt worden waren, sollte diese Arbeit wichtige Erkenntnisse zur Risikoabschätzung beitragen. Da die zur Detektion der niedrigen Konzentrationen in menschlichen Proben benötigten sehr sensitiven analytischen Methoden einen ubiquitären Hintergrund an BPA zeigten, wurde den Probanden die vollständig deuterierte Verbindung verabreicht. In einem Vorversuch in der Ratte wurde festgestellt, daß die Art und das Ausmaß der Metabolisierung durch die Deuterierung im Vergleich zum nicht-deuterten Bisphenol A nicht beeinflußt wurden.

Die erhaltenen Daten zeigen, daß d_{16} -Bisphenol A im Menschen im Vergleich zur Ratte und zur Maus weitaus besser resorbiert wurde. Im Urin wurden >95 % der applizierten Dosis fast vollständig in konjugierter Form wiedergefunden. Als Hauptmetabolit konnte in dieser Arbeit sowohl in Plasma als auch in Urin d_{16} -Bisphenol A-Glucuronid identifiziert werden. Der Anteil an freiem d_{16} -Bisphenol A betrug weniger als ein Prozent des Konjugats. Die Molekulargewichte der möglichen d_{16} -Bisphenol A-Konjugate (418 Da für Glucuronide, 322 Da für Sulfate, 592 Da für Diglucuronide, 400 Da für Disulfate, 496 Da für Dikonjugat-Mischformen) liegen im Gegensatz zur Ratte fast alle deutlich unter dem Wert von 475 Da, bis zu dem im Menschen die renale Exkretion dominiert (Nau, H., 1997). Dies erklärt, weshalb im Vergleich zur Ratte im Menschen deutlich mehr Glucuronid im Urin gemessen werden konnte. Die Ausscheidung mit dem Urin und aus dem Plasma verlief sehr schnell mit Halbwertszeiten um die 3 h. Weitere Metabolite konnten mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht nachgewiesen werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß d_{16} -Bisphenol A vollständig resorbiert wurde und die aufgenommenen Mengen an d_{16} -Bisphenol A effizient und so gut wie quantitativ durch Phase II-Metabolismus konjugiert und ausgeschieden wurden. Dies resultierte in einer sehr geringen oralen Bioverfügbarkeit der freien, nicht konjugierten Verbindung von weniger als 1 % der applizierten Dosis. d_{16} -Bisphenol A und seine Konjugate wurden schnell ausgeschieden, wobei die Halbwertszeiten der Elimination aus Urin und Plasma bei drei Stunden lagen. Ein enterohepatischer Kreislauf, wie er in der Ratte stattfand, konnte nicht beobachtet werden.

Anhand der nach Gabe der deuterierten Verbindung gewonnenen Erkenntnisse läßt sich schließen, daß Bisphenol A im Menschen effizient glucuronidiert wird. Dies eröffnet die Möglichkeit, das Glucuronid als Biomarker für die Exposition des Menschen gegen Bisphenol A einzusetzen. Die im Ergebnisteil ausführlich beschriebenen Schwierigkeiten des sensitiven Nachweises von Bisphenol A (diese wurden in der Humanstudie durch Gabe von d_{16} -BPA, das problemlos zu messen war, umgangen) sowie die Unmöglichkeit, mittels GC/MS Bisphenol A und BPA-Glucuronid parallel zu bestimmen, schränken die Nachweismöglichkeiten jedoch etwas ein. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, daß mit LC/MS/MS eine sehr einfache und sensitive Methode zum Nachweis des Glucuronids, für das keine meßtechnische Hintergrundbelastung vorhanden ist, existiert. Damit sollte es in Zukunft möglich sein, genaue Erkenntnisse zur Belastung des Menschen durch „alltägliches“ Bisphenol A zu erlangen.

Tabelle 6.2 gibt noch einmal einen Überblick über die wichtigsten gemessenen toxikokinetischen Parameter nach Konjugatspaltung.

Tab. 6.2: Überblick über die wichtigsten toxikokinetischen Parameter, die nach einmaliger oraler Gabe von 5 mg d_{16} -BPA an freiwillige Probanden ermittelt wurden. Die Werte gelten für Gesamt- d_{16} -BPA nach enzymatischer Spaltung.

	c_{max}	t_{max}	$t_{1/2}$	% der Dosis
Urin	71,7 ± 55,4 nmol/ml	5 h	3,1 ± 0,3 h	112,1 ± 18,6 %
Plasma	116,0 ± 41,1 pmol/ml	4 h	3,6 ± 0,2 h	-

6.3.5 Bedeutung der Ergebnisse im Hinblick auf eine unerwünschte endokrine Wirkung

Wie gezeigt werden konnte, liegt d_{16} -Bisphenol A im Menschen sowohl in Plasma als auch in Urin fast ausschließlich in Form des gut wasserlöslichen Glucuronids vor. Nur ein geringer Anteil der Dosis (< 1 %) lag als freies d_{16} -Bisphenol A vor. Untersuchungen zur östrogenen Aktivität von BPA-Glucuronid haben gezeigt, daß das Glucuronid weder *in vitro* an einen der beiden Östrogenrezeptoren ER α und ER β bindet noch eine östrogene Aktivität in einem Reporter-Zelltest aufweist (Matthews, J. B. *et al.*, 2001). Auch in menschlichen Hep2G-Zellen, die mit den beiden Östrogenrezeptoren transfiziert worden waren, zeigte Bisphenol A-Glucuronid keine östrogene Aktivität (Snyder, R. W. *et al.*, 2000). Die mangelnde östrogene

Potenz des Glucuronids und die geringe Bioverfügbarkeit von unkonjugiertem Bisphenol A im Menschen lassen erwarten, daß BPA im gesunden Erwachsenen zu keinerlei ausgeprägten östrogenen Effekten führen sollte.

Die Toxikokinetik von Bisphenol A spricht für die Hypothese einer schnellen Elimination über die Leber ("first pass"-Effekt) und einer effizienten metabolischen Clearance. Erst bei sehr hohen Dosen dürfte es zur Bioakkumulation kommen, wenn die Detoxifizierungswege (Phase II-Reaktionen) gesättigt sind. Beim Menschen ist dies bei den geringen Dosen durch Exposition gegenüber Bisphenol A nicht zu befürchten. Weiterhin zeigte sich, daß Bisphenol A im etablierten uterotrophen Testsystem nach oraler Gabe bis zu einer Dosis von 100 mg/kg KG keine typischen östrogenen Effekte wie Uteruswachstum verursachte (Cagen, S. Z. *et al.*, 1999). Solche Dosen liegen weit oberhalb der Mengen, die der Mensch aufnimmt ($< 1 \mu\text{g}/\text{kg KG}$; s. unten).

Wie in den einleitenden Kapiteln bereits erwähnt, wurde in den letzten Jahren über die Effekte von Bisphenol A im niedrigen, umweltrelevanten Bereich diskutiert. Die von vom Saal, F. S. *et al.*, 1997 präsentierten Ergebnisse zum Einfluß von Bisphenol A im Dosisbereich von 2 bis 20 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ (appliziert an schwangere Ratten) auf die Prostatagewichte männlicher Nachkommen konnten von mehreren anderen Arbeitsgruppen nicht reproduziert werden (Kwon, S. *et al.*, 2000; Ashby, J. *et al.*, 1999). Als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse wurde auch die Verwendung verschiedener Futtermittel diskutiert. Wie auch in dieser Arbeit festgestellt, enthalten Standard-Futtermittel für Labornager große Mengen an Isoflavonen (Boettger-Tong, H. *et al.*, 1998), die ebenfalls endokrin wirksam sind.

6.4 Toxikologische Bewertung der Datenlage und Risikoabschätzung

6.4.1 Belastung durch Nahrungsmittel - äußere Exposition

Um eine Abschätzung des für Menschen bestehenden Risikos leisten zu können, ist es wichtig, neben Daten zu Wirkungspotential eines Fremdstoffes (entweder *in vitro* oder *in vivo*), Anhaltspunkte über die äußere Exposition (z.B. über die Nahrung, aus der Atemluft etc.) der Bevölkerung zu erhalten. Erst wenn man diese Daten zur äußeren Belastung mit den toxikokinetischen Daten der Substanz in Relation setzt, kann man Aussagen über die innere Belastung des Menschen und damit über das Risiko einer unerwünschten Wirkung treffen.

Zur Aufnahme von Daidzein (in der Form des Glycosids Daidzin) über die Nahrung gibt es verschiedene Untersuchungen. de Kleijn, M. J. *et al.*, 2001, errechnet nach den Angaben eines Fragebogens zu Ernährungsgewohnheiten über die bekannten Gehalte an Daidzein in den angegebenen Lebensmitteln einen durchschnittlichen Wert für die tägliche Aufnahme von Daidzein bei Frauen in den USA von 39 µg (Medianwert, Intervall: 24-57 µg). Die Gesamtaufnahme an Isoflavonen beträgt pro Tag etwa 154 µg. Auch wenn es keine Untersuchung zur Daidzein-Aufnahme in Europa gibt, dürften sich die Werte für Deutschland in etwa gleichem Rahmen bewegen. In Babynahrung, die auf Sojabasis hergestellt wird, wurden 40 µg/g Isoflavon (Genistein + Daidzein) gemessen (Irvine, C. H. *et al.*, 1998). Nach vorschriftsmäßiger Verdünnung beträgt die Konzentration 20 µg/g Babynahrung. Dies zeigt, daß Babies und Kleinkinder einer weit höheren Exposition ausgesetzt sind, als der Erwachsene.

Eine Belastung des Menschen durch Bisphenol A ergibt sich hauptsächlich aus der Kontamination von Nahrungsmitteln durch Polycarbonat-Utensilien und Dosenbeschichtungen. Zahlreiche Untersuchungen lieferten Erkenntnisse zur Belastung von in Plastikflaschen abgefülltem Wasser, Dosen-Nahrungsmitteln und Babynahrung. McNeal, T. P. *et al.*, 2000, fanden Bisphenol A-Werte in in Plastikflaschen abgefülltem Wasser von 0,1 ng/mL nach einer Lagerzeit von 3 Wochen und bis zu 4,7 ng/mL nach einer Lagerzeit von 39 Wochen. Kuch, H. M. und Ballschmiter, K., 2001, fanden BPA in Trinkwasser in Konzentrationen von 500 pg/L bis zu 2 ng/L. Die Autoren schätzen anhand ihrer Ergebnisse, daß man mehrere tausend Liter Trinkwasser trinken müßte, um ähnliche östrogene Äquivalente, wie sie z.B. in der Anti-Baby-Pille enthalten sind, aufzunehmen. Die tägliche Aufnahme von Bisphenol A über das Trinkwasser sei vernachlässigbar im Vergleich mit der Aufnahme über die Nahrung.

Die Untersuchung von in Konservenbüchsen abgepackten Gemüse- und Früchtenahrung konnte bei einer Nachweisgrenze von 5 ng/mL kein BPA im flüssigen Anteil der Proben und bis zu 95 ng/g BPA im festen Anteil finden (Yoshida, T. *et al.*, 2001). Eine breit angelegte Untersuchung der britischen Food Standards Agency (FSA) von 62 Dosen-Nahrungsmitteln konnte Bisphenol A in 37 Proben (komplett homogenisiert) in einem Bereich von bis zu maximal 0,07 mg/kg und in einer Probe im Bereich von 0,35-0,42 mg/kg nachweisen (Food Standards Agency UK, 2001). In den restlichen Proben konnte kein Bisphenol A nachgewiesen werden. Die Autoren schätzten anhand ihrer Daten die täglich über die Nahrung aufgenommenen Dosis von BPA auf etwa 0,36 to 0,38 µg/kg KG für Erwachsene und auf 0,83 to 0,87 µg/kg KG für Kleinkinder. In einem *Draft Report* zur Risikoabschätzung

für Bisphenol A errechnet die Europäische Union dagegen Werte für die tägliche Aufnahme von Bisphenol A über die Nahrung von 7-13 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ für Erwachsene und 7-17 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ für Kleinkinder (EU, 2000).

In Babynahrung wurde ein Gehalt von 0,1 - 13,2 ng/mL an Bisphenol A bestimmt. Da es sich bei den untersuchten Nahrungsmitteln um Konzentrate handelte, schließen die Autoren auf eine maximale tägliche Aufnahme von 6,6 ng/mL . (McNeal, T. P. *et al.*, 2000).

6.4.2 Vergleich von innerer Belastung, wirksamen Dosen und Grenzwerten

Neben den Daten zur äußeren Belastung ist es auch interessant, Werte zur inneren Belastung, d.h. zu den Hintergrundwerten in Blut, zu kennen. Anhand dieser Werte kann man über einen Vergleich der im Tierversuch effektiven Dosis zu einer Abschätzung gelangen, ob ein Effekt im Menschen zu erwarten ist.

- Innere Belastung

Eine Forschungsgruppe untersuchte die Plasmaspiegel in gesunden männlichen Probanden aus verschiedenen europäischen Ländern, die sich normal ernährten (d.h. keine Vegetarier). Die Werte für Daidzein lagen je nach Herkunftsland zwischen 0,6 und 8,2 pmol/mL Plasma, mit dem niedrigsten Wert für Finnland und dem höchsten für Großbritannien (Whitten, P. L. und Patisaul, H. B., 2001).

Was die innere Belastung mit Bisphenol A betrifft, konnte in den in dieser Arbeit untersuchten gepoolten Plasmaproben bei einer Quantifizierungsgrenze von 27 ± 3 pmol/mL Plasma kein Bisphenol A nachgewiesen werden. Die in einer Probe gefundene Präsenz von Bisphenol A lag nur knapp über dieser Bestimmungsgrenze. Wegen des meßtechnischen Hintergrundes und der Tatsache, daß die gepoolten Plasmaproben schon längere Zeit in Kunststoffröhrchen lagerten und einem mehrmaligen Auftauen und Wiedereinfrieren unterworfen worden waren, ist die Aussagekraft dieser einen Probe sehr begrenzt. Zur Vermeidung des Hintergrundes sollte unter Berücksichtigung der toxikokinetischen Erkenntnisse bevorzugt Bisphenol A-Glucuronid als Biomarker für eine Exposition des Menschen eingesetzt werden. Ein empfindlicher Nachweis dieses Glucuronids war mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht möglich. Allerdings deuteten die ersten Ergebnisse der LC/MS/MS-Untersuchungen darauf hin, daß diese Methode für die gewünschten Screening-Untersuchungen sehr gut geeignet sein könnte.

Zwei japanischer Arbeitsgruppen fanden mittels HPLC/ECD bzw. HPLC/MS in humanen Serumproben eine Hintergrundbelastung von 1,3 pmol/mL (Inoue, K. *et al.*, 2000) bzw. 0 bis 7 pmol/mL Serum (Sajiki, J. *et al.*, 1999).

- Wirksame Dosen

Eine biologische Aktivität für mit der Nahrung aufgenommenes Isoflavon konnte bei Dosen zwischen 0,4-10 mg/kg/Tag nachgewiesen werden. Dieser Wert liegt Größenordnungen über den von de Kleijn, M. J. *et al.*, 2001 errechneten 39 µg Daidzein, die über die Nahrung aufgenommen werden.

Die östrogene Wirkung von Bisphenol A wurde in uterotrophen Testsystemen sowohl in der ovariectomisierten Ratte (Ashby, J. *et al.*, 2000) als auch in der noch nicht geschlechtsreifen Ratte untersucht (Ashby, J. und Tinwell, H., 1998; Laws, S. C. *et al.*, 2000). Basierend auf den Ergebnissen dieser Studien wurde der „No Observed Adverse Effect Level“ (NOAEL) für Bisphenol A nach oraler oder subkutaner Applikation auf etwa 200-300 mg/kg KG geschätzt. Diese Dosis liegt mehrere hunderttausend-fach höher als die durchschnittliche Aufnahme von Bisphenol A über die Nahrung (etwa 0,4 µg/kg KG, s.o.). Einige bereits erwähnte Studien, die eine Wirkung schon bei sehr niedrigen Dosen sahen, konnten von anderen Gruppen nicht reproduziert werden. Aber selbst wenn man diese Ergebnisse als valide erachtet und die gemessenen Endpunkte als biologisch relevant ansieht, liegen die täglich über die Nahrung aufgenommenen Mengen an Bisphenol A noch unter den in diesen Studien wirksamen Dosen.

- Bewertung

Daß Daidzein und Bisphenol A endokrine Aktivitäten besitzen, ist in mehreren Testsystemen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zweifelsfrei nachgewiesen worden (s. Einleitung). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Humanstudien zeigten in beiden Fällen jedoch eine schnelle Elimination der Substanzen aus dem Blut, es kam zu einem extensiven Phase II-Metabolismus, der in einer äußerst geringen oralen Bioverfügbarkeit der unkonjugierten Verbindungen resultierte. Im Falle von Bisphenol A wurden annähernd 100 % der applizierten Dosis in Form des Glucuronides im Urin wiedergefunden.

Über die Möglichkeit, daß geringe Mengen Bisphenol A im Körper bioakkumulieren könnten, wurde wiederholt von interessierter Seite spekuliert (z.B. WWF und Lyons, G., 2000). Jedoch konnten weder in dieser Arbeit noch in der vorliegenden wissenschaftlichen Literatur überzeugende Hinweise auf ein solches Verhalten gefunden werden.

Die zur Belastung des Menschen mit den untersuchten Substanzen ermittelten Zahlen zeigen, daß die äußere Exposition um Größenordnungen unter den *in vivo* minimal wirksamen Dosen liegt. Zudem ist eine Sättigung der Phase II-Reaktionswege bei den geringen Umwelt-Dosen äußerst unwahrscheinlich, so daß die aufgenommenen Mengen weitestgehend konjugiert werden sollten und nur ein Bruchteil dieser aufgenommenen Menge dem Körper als unkonjugierte Verbindung zur Verfügung stehen würde. Daraus läßt sich schließen, daß die Gefährdung für den gesunden, sich normal ernährenden Erwachsenen durch eine Exposition mit Daidzein oder Bisphenol A als vernachlässigbar gering zu erachten ist.

Zu demselben Ergebnis kommt die Europäische Union in ihrer Risikobewertung für Bisphenol A (EU, 2000), für die noch keine toxikokinetischen Daten im Menschen verfügbar waren. Dabei vergleicht sie Werte für die zu erwartende Exposition des Menschen mit Bisphenol A mit im Tierversuch ermittelten NOAEL-Werten und errechnet daraus durch Division einen Sicherheitsabstand (im englischen „Margin of Safety“ (MOS) - Konzept genannt). Unter Verwendung der oben genannten Zahlen zur Exposition des Verbrauchers und einem LOAEL-Wert („Lowest Observed Adverse Effect Level“) von 300 mg/kg/Tag für reproduktionstoxikologische Effekte berechnet die EU Sicherheitsabstände von 17600 (Kleinkinder) bis 47000 (Erwachsene). Diese Sicherheitsabstände von mindestens vier Größenordnungen geben laut EU keinen Anlaß zur Besorgnis.

Zur besseren Einschätzung des Einflusses industrieller Umwelthormone wie Bisphenol A auf den Menschen ist es weiterhin notwendig, das Vorhandensein natürlicher, östrogen wirksamer Verbindungen in der menschlichen Nahrung zu berücksichtigen (Safe, S. H., 1995), da die Aufnahme natürlicher Umwelthormone die von Industriechemikalien deutlich übertrifft. Ein Vergleich der Expositionsszenarien für industrielle Verbindungen und für Umwelthormone natürlichen Ursprungs unter Berücksichtigung der jeweiligen relativen Wirkstärken führt zu dem von Bolt, H. M. *et al.*, 2001 eingeführten HB MOS-Konzept (aus dem englischen, „Hygiene-Based Margins of Safety“). Dazu werden die relativen Wirkstärken *in vivo* in uterotrophen Tests ermittelt und Daidzein als Referenzsubstanz mit dem Wert 1 gleichgesetzt (die relative Wirkstärke der Positivkontrolle Ethinylöstradiol betrug 40000). Setzt man die Werte für die tägliche Aufnahme der natürlichen, endokrin wirksamen Substanz ins Verhältnis zu denen für die tägliche Aufnahme der industriellen Verbindung und gewichtet man dieses Verhältnis durch die relativen Wirkstärken der beiden Verbindungen, erhält man einen Wert für den HB MOS-Sicherheitsabstand. Ein Wert größer eins zeigt an, daß keine östrogenen Effekte zu erwarten sind, ein Wert kleiner als eins dagegen sagt aus, daß hormonelle Effekte auftreten sollten. Ein HB MOS-Wert von eins steht für die natürliche

Hintergrundbelastung mit hormonell wirksamen Substanzen aus der Nahrung (bezogen auf Daidzein), bei der erste Effekte auf das Hormonsystem auftreten. Für Bisphenol A ergibt sich so, unter Verwendung einer relativen Wirkstärke für BPA von ebenfalls eins, einer täglichen Aufnahme von 1 µg/kg KG Bisphenol A bzw. 1 mg/kg KG Daidzein, ein HB MOS-Wert von 1000 (Bolt, H. M. *et al.*, 2001).

Während das HB MOS-Konzept zur Bewertung endokrin wirksamer Substanzen eine deutliche Verbesserung zur von der EU verwendeten MOS-Methode bedeutet, da der Einfluß von über die Nahrung aufgenommenen hormonellen Verbindungen berücksichtigt wird und relative Wirkstärken aus *in vivo* Daten abgeleitet werden, ist beiden Konzepten gemein, daß sie keine toxikokinetischen Daten berücksichtigen. Dennoch wird aus beiden Ansätzen deutlich, daß das Risiko einer unerwünschten, endokrinen Wirkung durch Bisphenol A zu vernachlässigen ist. Weiterhin läßt das HB MOS-Konzept erahnen, daß die Belastung (und damit das Risiko einer endokrinen Wirkung) mit natürlich vorkommenden Umwelthormonen die Exposition mit Industriechemikalien wie BPA deutlich übertrifft.

6.4.3 Problematik der „Sensitiven Sub-Populationen“

Obwohl das Risikopotential durch die Exposition aus der Nahrung im gesunden, erwachsenen Menschen als vernachlässigbar anzusehen ist, kann sich das Gefährdungsszenario unter bestimmten Voraussetzungen anders darstellen. Insbesondere können Polymorphismen entscheidend zu verringerten Phase II-Aktivitäten und damit zu erhöhten Blutspiegeln an unkonjugierter Verbindung führen.

Yokota, H. *et al.*, 1999, untersuchten die Glucuronidierung von Bisphenol A *in vitro* in Rattenlebermikrosomen. Die Ergebnisse dieser Gruppe sprechen für eine Glucuronidierung über die UGT-Isoform UGT2B1 (UDP-Glucuronosyltransferase). Dieses Isozym teilt eine ähnliche Sequenz-Homologie zu den menschlichen Isoformen UGT2B7 und UGT2B17 (Belanger, A. *et al.*, 1998; Carrier, J. S. *et al.*, 2000). Beide Isozyme werden in der Leber exprimiert, aber im Gegensatz zu UGT2B1 auch in mehreren anderen Geweben wie Hirn, Uterus oder Hoden (Belanger, A. *et al.*, 1998; King, C. D. *et al.*, 1999). Dieser Sachverhalt könnte als eine Art lokale Schutzwirkung des Körpers gegen Bisphenol A interpretiert werden, wird aber weiter kompliziert durch mögliche interindividuelle Variationen als Konsequenz eines Polymorphismus im UGT2B7-Gen (Lampe, J. W. *et al.*, 2000). Dieser Polymorphismus könnte zu starken Schwankungen in der Glucuronidierungsleistung zwischen verschiedenen Individuen führen.

Eine Exposition des Menschen gegenüber BPA wird den größten Einfluß auf das Hormonsystem wahrscheinlich während kritischer Phasen der Entwicklung haben, wie im Foetus oder dem Neugeborenen (Howdeshell, K. L. *et al.*, 1999). Erschwerend hinzu kommt, daß in foetalem humanen Lebergewebe eine nur begrenzte Fähigkeit, Fremdstoffe zu glucuronidieren, nachgewiesen werden konnte (Ring, J. A. *et al.*, 1999). Die Mehrheit der UGT-Isozyme wird erst nach der Geburt exprimiert, wobei es bis zum dritten Lebensmonat dauert, bis das Komplement, wenn auch mit reduzierten Leistungsfähigkeit im Vergleich zum Erwachsenen, voll ausgebildet ist (Coughtrie, M. W. *et al.*, 1988). Insbesondere UGT2B7 wird in 20 Wochen altem menschlichem foetalem Lebergewebe signifikant niedriger exprimiert. Dies könnte andeuten, daß der menschliche Foetus nach maternaler Exposition gegenüber Bisphenol A dieses nicht effizient glucuronidieren kann. Andererseits könnten im Foetus - im Gegensatz zum Erwachsenen - alternative Phase II-Reaktionswege dominieren. So konnte *in vitro* gezeigt werden, daß ein foetales Phenol-Sulfotransferase-Isozym Umwelthormone wie Bisphenol A sulfatieren kann (Suiko, M. *et al.*, 2000). Daher ist es möglich, daß foetale Leber die Möglichkeit hat, BPA effektiv über eine Sulfatierung zu entfernen. In welchem Ausmaß Bisphenol A nach effektiver Glucuronidierung durch den Körper der Mutter überhaupt in der Lage ist, die Plazentaschranke zu überwinden und in den Foetus zu gelangen, ist beim Menschen noch ungeklärt. Die plazentale Übertragung von Bisphenol A auf den Foetus wurde jedoch von Takahashi, O. und Oishi, S., 2000 in Ratten nachgewiesen.

In einem anderen Zusammenhang tritt noch ein weiterer interessanter Punkt auf. Die physiologische Antwort auf Östrogen wird, wie inzwischen bekannt ist, über mindestens zwei Östrogenrezeptoren vermittelt. Untersuchungen über die Gewebeverteilung dieser Rezeptoren deuten darauf hin, daß ER α weit verbreitet ist, während ER β lokal begrenzter auftritt. Hohe Werte findet man im Ovar, in der Prostata, Epididymis, Lunge und Hypothalamus (Kuiper, G. G. *et al.*, 1997; Couse, J. F. *et al.*, 1997). Sowohl Daidzein als auch Bisphenol A binden besser an ER β (Casanova, M. *et al.*, 1999; Matthews, J. B. *et al.*, 2001). Epidemiologische Untersuchungen zeigen, daß Daidzein und Genistein, ein weiteres Isoflavon, das Risiko für Brust- und Prostatakrebs reduzieren (s. a. Kapitel 2). Die Expression von ER β hauptsächlich in Brust- und Prostatagewebe und die bevorzugte Bindung von Daidzein an ER β könnten daher erklären, warum Isoflavone in diesen Geweben einen protektiven Effekt ausüben können.

Bisher enthält jedoch keiner der üblichen „Screeningtests“ auf östrogene Aktivität, wie z.B. der Ligandenaustauschtest, E-Screen oder der rekombinante Hefezelltest nennenswerte Mengen an ER β (Collins, B. M. *et al.*, 1997; Couse, J. F. *et al.*, 1997). Daher könnte die Wirkstärke der in diesen Systemen untersuchten Verbindungen möglicherweise falsch eingeschätzt werden. Entscheidend für eine Beurteilung möglicher adverser Effekte von Umwelthormonen werden daher auch weiterhin *in vivo*-Daten sein.

7 Zusammenfassung

Bei Daidzein und Bisphenol A handelt es sich um zwei Vertreter einer Klasse von Stoffen, die als „Umwelthormone“ (*engl.* endocrine disrupter) bezeichnet werden. Mit diesem Mitte der 1990er Jahre eingeführten Begriff werden sowohl natürlich vorkommende, hormonell aktive Verbindungen (z.B. in Pflanzen vorkommende Phytoöstrogene) als auch eine ganze Reihe von Umweltchemikalien wie synthetisch hergestellte Hormone oder eine Vielzahl an Industriechemikalien (auch Xenoöstrogene genannt) zusammengefaßt. Ein gemeinsames Kennzeichen dieser Verbindungen ist, daß sie in verschiedenen *in vitro*-Testsystemen Bindungsaffinitäten zu mindestens einem der beiden bekannten Östrogenrezeptoren zeigen. Daher wird darüber spekuliert, inwieweit solche Verbindungen in die hormonelle Regulation im Körper von Mensch und Tier eingreifen können.

Aus der Gruppe der Phytoöstrogene wurde Daidzein als wichtiger Vertreter, der in hohen Konzentrationen in vielen Nutzpflanzen und Nahrungsmitteln vorkommt, ausgewählt. Soja-Produkte, die den größten Beitrag einer menschlichen Exposition gegen Daidzein liefern, werden in zunehmendem Maße auch in westlichen Ländern konsumiert. Bisphenol A wurde als Vertreter der Xenoöstrogene gewählt, da es - was Weltjahresproduktion und Verwendung angeht - die wohl wichtigste Substanz dieser Gruppe darstellt. BPA dient überwiegend als Monomer zur Herstellung von Polycarbonat- und Epoxidharzen. Kunststoffe, die Bisphenol A enthalten, werden zur Verpackung von Lebensmitteln eingesetzt (z.B. Saugflaschen für Kleinkinder, Plastikdosen, Beschichtungen von Konservendosen) und finden auch in der Zahnbehandlung als Bestandteil amalgamfreier Zahnfüllungen Verwendung. Eine Belastung des Menschen durch diese ubiquitär vorkommende Substanz ist also kaum zu vermeiden. Dennoch wurden bisher noch keine toxikokinetischen Untersuchungen im Menschen durchgeführt.

Um eine Risikoabschätzung für den Menschen machen zu können, sind Informationen zur Toxikokinetik und zur Biotransformation unabdingbar. Ein positives Ergebnis in einem *in vitro* Östrogenitätstest alleine erlaubt keine abschließende Aussage zum Gefahrenpotential eines Umwelthormons. Vielmehr kommt es darauf an, Kenntnisse über die tatsächlichen Konzentrationen im Körper zu erlangen und diese in Relation zu den in der Literatur beschriebenen *in vitro* Ergebnissen zu setzen. Um weiterhin Tierversuchsdaten auf den

Menschen extrapolieren zu können, sind vergleichende Untersuchungen von Toxikokinetik und Metabolismus sehr wichtig.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Biotransformation und Toxikokinetik der beiden Verbindungen nach oraler Gabe in der Ratte aufgeklärt. Dazu wurden die gebildeten Metabolite in Urin und Faeces der Tiere per HPLC/UV, GC/MS und LC/MS/MS identifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, daß die orale Bioverfügbarkeit beider Substanzen in der Ratte sehr gering war. Maximal zehn Prozent der jeweils applizierten Dosis konnten im Urin der Tiere wiedergefunden werden. Als Hauptmetabolit wurden sowohl von Daidzein als auch von Bisphenol A das jeweilige Glucuronid-Konjugat gebildet. Bei Daidzein überwog in der männlichen Ratte zusätzlich das Sulfat-Konjugat. Der Anteil an freier, d.h. unkonjugierter Verbindung betrug im Urin der Tiere zwischen 1 und 3 % der Dosis. Außer den Phase II-Konjugaten, die aufgrund ihrer mangelnden östrogenen Wirksamkeit zu einer Detoxifizierung der beiden Verbindungen führte, konnten nach Gabe von Bisphenol A in der Ratte keine weiteren Metabolite identifiziert werden. Nach Exposition mit Daidzein konnten in den Faeces der Tiere in geringem Umfang die beiden reduktiven Metabolite Equol und *O*-DMA gefunden werden. Diese wurden wahrscheinlich im Magen-Darm-Trakt durch die Bakterien der Darmflora gebildet. Sowohl Daidzein als auch Bisphenol A wurden bei der Ratte nur unvollständig aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert; der Großteil der gegebenen Dosis wurde als unveränderte Substanz in den Faeces wiedergefunden. Bei Bisphenol A wurde die Ausscheidung zudem durch einen ausgeprägten enterohepatischen Kreislauf verzögert. Dieser erklärt auch, warum Bisphenol A und seine Konjugate nicht wie im Falle von Daidzein sehr schnell in einer Kinetik erster Ordnung ausgeschieden wurden, sondern einen auffälligen mehrgipfligen Verlauf der Konzentrations-Zeitkurven zeigten, mit deutlich meßbaren Konzentrationen am Ende der Beobachtungsperiode von 96 h.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden zunächst empfindliche GC/MS- und HPLC-Methoden zur Quantifizierung der Verbindungen in humanem Plasma und Urin entwickelt. Danach wurden freiwillige Probanden oral mit jeweils 5 mg Daidzein bzw. d_{16} -Bisphenol A exponiert, um Daten zur Biotransformation und Toxikokinetik der beiden Substanzen im Mensch zu erhalten. Wegen des deutlich meßbaren Hintergrundes an Bisphenol A, das in allen Kontrollproben nachweisbar war, wurde für die Humanstudie die deuterierte Verbindung gegeben, für die kein störender Hintergrund meßbar war. In einem Vorversuch wurde zuvor verifiziert, daß die Deuterierung keinen Einfluß auf den Metabolismus der Substanz hatte.

Die Bioverfügbarkeit der Gesamt-Substanz (freie Verbindung + Konjugate) im Menschen war in beiden Fällen deutlich höher als in der Ratte. Von Daidzein wurden 40 % (Ratte 10 %), von Bisphenol A > 95 % (Ratte 13 %) der applizierten Dosis im Urin der Probanden wiedergefunden. Dabei zeigte sich ein sehr effizienter Phase II-Metabolismus; weniger als 1 % der Glucuronid-Konjugatkonzentrationen wurden als unveränderte Substanz gefunden. Das Glucuronid stellte in beiden Fällen den einzigen nachweisbaren Metaboliten dar. Die Elimination von Daidzein und Bisphenol A verlief in den beiden Studien sehr schnell nach einer Kinetik erster Ordnung. Im Gegensatz zu der Ratte konnten auch bei Bisphenol A keine Auffälligkeiten in den Ausscheidungskurven beobachtet werden, Hinweise auf einen enterohepatischen Kreislauf im Menschen wurden nicht gefunden. Die Wiederfindung von Daidzein in Urin von ca. 40 % ist in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten, der Verbleib der restlichen Substanz ist bislang ungeklärt, da die Ausscheidung über die Faeces im Menschen zu vernachlässigen sei. Im Falle von Bisphenol A wurde fast die komplette applizierte Dosis (> 95 %) in Form des Glucuronides im Urin wiedergefunden.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte ein wichtiger Beitrag zu Risikoabschätzung der hormonellen Wirkung von Daidzein und Bisphenol A für den Menschen geliefert werden. Die erhaltenen Daten zur Toxikokinetik erlauben eine verbesserte Extrapolation der Daten aus *in vitro*- und Tierstudien auf den Menschen. Daß Daidzein und Bisphenol A endokrine Aktivitäten besitzen, ist in mehreren Testsystemen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zweifelsfrei nachgewiesen worden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Humanstudien zeigten in beiden Fällen jedoch eine schnelle Elimination der Substanzen aus dem Blut, es kam zu einem extensiven Phase II-Metabolismus, der in einer äußerst geringen oralen Bioverfügbarkeit der unkonjugierten Verbindungen resultierte. Im Falle von Bisphenol A wurden annähernd 100 % der applizierten Dosis in Form des Glucuronides im Urin wiedergefunden. Die zur Belastung des Menschen mit den untersuchten Substanzen ermittelten Zahlen zeigen, daß die äußere Exposition des Menschen um Größenordnungen unter den *in vivo* minimal wirksamen Dosen liegt. Zudem ist eine Sättigung der Phase II-Reaktionswege bei den geringen Umwelt-Dosen äußerst unwahrscheinlich, so daß die aufgenommenen Mengen weitestgehend konjugiert werden sollten und nur ein Bruchteil dieser aufgenommenen Menge dem Körper als unkonjugierte Verbindung zur Verfügung stehen würde. Daraus läßt sich schließen, daß die Gefährdung für den gesunden, sich normal ernährenden Erwachsenen durch eine Exposition mit Daidzein oder Bisphenol A als vernachlässigbar gering zu erachten ist.

8 Summary

Daidzein and bisphenol a are two representatives of a class of substances known as endocrine disrupters. This term has been introduced for endocrine active substances during the 1990's and comprises some natural (the so-called phytoestrogens) as well as a wide array of environmental chemicals like synthetic hormones or industrial chemicals (the so-called xenoestrogens). A common mark of these compounds is their affinity to at least one of two estrogen receptors *in vitro*. This leads to speculation on how such compounds may interfere with hormonal regulation in animals and humans.

As an important representative of the group of phytoestrogens daidzein has been chosen. Daidzein occurs in high concentrations in plants like soy, thus contributing to a human exposure via food. Bisphenol a has been chosen for this thesis because it probably is the most important industrial chemical suspected of endocrine activity, considering worldwide annual production numbers. BPA is commonly used in the production of polycarbonate and epoxy resins. Plastics containing BPA are used for the wrapping and packaging of food and for the production of dental materials. Thus, human exposure with this ubiquitous substance can hardly be avoided. Nevertheless, up to now, no toxicological investigation on the fate of this substance has been conducted in humans.

For a risk assessment of possible human health effects of these substances, information about biotransformation and toxicokinetics is indispensable. Positive *in vitro* results alone do not allow a final judgement on the risk posed by a substance. To allow this, further knowledge about the fate of a chemical in the body and the concentrations resulting in human fluids and tissues is most important. To be able to extrapolate results from animal tests to human beings, comparative studies are necessary.

In the first part of this thesis, biotransformation and kinetics of the two model substances, daidzein and bisphenol a, have been elucidated. To do this, metabolites in urine and feces of animals have been collected, isolated and identified by HPLC/UV, GC/MS and LC/MS/MS. The results showed that oral bioavailability of the two chemicals has been very low. Less than ten percent of the dose given could be recovered from urine of animals. The major metabolite in biotransformation of both daidzein and bisphenol a proved to be the glucuronide of the respective compound. Additionally, after application of daidzein to rats, daidzein sulfate

could be identified specifically in male animals only. The percentage of unconjugated parent compound in both studies has been shown to be between one and three percent of the dose given. No further metabolites could be found after oral administration of bpa to rats; after oral administration of daidzein to rats, equol and o-dma could be identified as minor metabolites in feces of animals. In both studies, the major part of the administered dose could be recovered as unchanged parent compound from feces. In the case of BPA, elimination was slowed by the occurrence of enterohepatic circulation. This explains why the elimination of BPA and its conjugates was slow and did not follow a first-order kinetics.

In the second part of this thesis, sensitive analytical methods (HPLC and GC/MS) were developed to allow quantification of low amounts of the two model compounds in human plasma and urine samples. To obtain information on the biotransformation and toxicokinetics in humans, volunteers were given 5 mg of either daidzein or d₁₆-bisphenol a. Because of a rather high background for bisphenol a in control samples, deuterated bisphenol a had been chosen for the human study. Prior tests had confirmed that deuteration did not influence the pathway of biotransformation.

Bioavailability of total substance (i.e. unconjugated + conjugated compound) in humans was markedly higher than in rats. After controlled exposure to daidzein 40 % (as compared to 10 % in rats) could be recovered from urine, in the case of d₁₆-bpa more than 95 % (as compared to 13 % in rats) could be recovered. Less than 1 % of the concentration of the conjugated compound could be found as unchanged parent compound. In both cases, the glucuronide has been identified as sole metabolite in human volunteers. Elimination of both substances was quick and followed a first order kinetics. No indication for enterohepatic circulation could be found. The recovery of less than 50 % of the dose given in the case of daidzein is in good agreement with literature data, the fate of the remainder of the dose remains unsolved up to now. In the case of d₁₆-bisphenol a, all of the given dose could be recovered from urine.

This thesis can offer an important contribution to the risk assessment of endocrine activity of daidzein and bpa in humans. The toxicokinetic data presented in this work allow an improved extrapolation of data gained *in vitro* to humans. Endocrine activity of daidzein and bpa has been proved without a doubt in several *in vitro* and *in vivo* tests. But, the human data presented in this work show extensive phase II metabolism in both cases, leading to an exceedingly low bioavailability of unconjugated substance in humans. In the case of bpa, the

complete dose given could be recovered from urine. Human exposure with the two substances and mainly the uptake of these compounds via the oral route (i.e. in food) lie well below the doses inducing effects in animal models. Moreover, a saturation of phase II pathways seems extremely unlikely considering the low doses taken up via the oral route. Thus, the major part of the compounds taken up should be conjugated to the respective glucuronides, which have been proved to be not or at least less estrogenic by far than the unconjugated parent compounds. This leads to the conclusion that the risk posed by exposure to these compounds seems to be very low for an average healthy adult.

9 Literaturverzeichnis

Adams, N. R. (1981). A changed responsiveness to oestrogen in ewes with clover disease. *J.Reprod.Fertil.Suppl* **30**, 223-30.

Adlercreutz, H. (1990). Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand.J.Clin.Lab Invest Suppl* **201**, 3-23.

Adlercreutz, H. (1995). Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ.Health Perspect.* **103 Suppl 7**, 103-12.

Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wahala, K., Makela, T., Brunow, G., Hase, T., Arosemena, P. J., Kellis, J. T., Jr. und Vickery, L. E. (1993a). Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **44** (2), 147-53.

Adlercreutz, H., Fotsis, T., Bannwart, C., Wahala, K., Makela, T., Brunow, G. und Hase, T. (1986). Determination of urinary lignans and phytoestrogen metabolites, potential antiestrogens and anticarcinogens, in urine of women on various habitual diets. *J.Steroid Biochem.* **25** (5B), 791-97.

Adlercreutz, H., Honjo, H., Higashi, A., Fotsis, T., Hamalainen, E., Hasegawa, T. und Okada, H. (1991). Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am.J.Clin.Nutr.* **54** (6), 1093-100.

Adlercreutz, H., Markkanen, H. und Watanabe, S. (1993b). Plasma concentrations of phytoestrogens in Japanese men. *Lancet* **342** (8881), 1209-10.

Ahlborg, U. G., Lipworth, L., Titus-Ernstoff, L., Hsieh, C. C., Hanberg, A., Baron, J., Trichopoulos, D. und Adami, H. O. (1995). Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: an assessment of the biological and epidemiological evidence. *Crit Rev.Toxicol.* **25** (6), 463-531.

Ahmed, S. A. (2000). The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. *Toxicology* **150** (1-3), 191-206.

Allen, E. und Doisy, E. A. (1923). An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and purification, and action in test animals. *JAMA* **81**, 819-21.

Ashby, J., Odum, J., Paton, D., Lefevre, P. A., Beresford, N. und Sumpter, J. P. (2000). Re-evaluation of the first synthetic estrogen, 1-keto-1,2,3, 4- tetrahydrophenanthrene, and bisphenol A, using both the ovariectomised rat model used in 1933 and additional assays. *Toxicol.Lett.* **115** (3), 231-38.

Ashby, J. und Tinwell, H. (1998). Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature rat. *Environ.Health Perspect.* **106** (11), 719-20.

Ashby, J., Tinwell, H. und Haseman, J. (1999). Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed in utero. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* **30** (2 Pt 1), 156-66.

Auger, J., Kunstmann, J. M., Czyglik, F. und Jouannet, P. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N.Engl.J.Med.* **332** (5), 281-85.

Axelson, M., Sjobvall, J., Gustafsson, B. E. und Setchell, K. D. (1984). Soya--a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals. *J.Endocrinol.* **102** (1), 49-56.

Bannwart, C., Fotsis, T., Heikkinen, R. und Adlercreutz, H. (1984). Identification of the isoflavonic phytoestrogen daidzein in human urine. *Clin.Chim.Acta* **136** (2-3), 165-72.

Bartholomew, R. M. und Ryan, D. S. (1980). Lack of mutagenicity of some phytoestrogens in the salmonella/mammalian microsome assay. *Mutat.Res.* **78** (4), 317-21.

Bayer, T., Colnot, T. und Dekant, W. (2001). Disposition and biotransformation of the estrogenic isoflavone daidzein in rats. *Toxicol.Sci.* **62** (2), 205-11.

Belanger, A., Hum, D. W., Beaulieu, M., Levesque, E., Guillemette, C., Tchernof, A., Belanger, G., Turgeon, D. und Dubois, S. (1998). Characterization and regulation of UDP-glucuronosyltransferases in steroid target tissues. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **65** (1-6), 301-10.

Bennetau-Pelissero, C., Latonnelle, K., Séqueira, A. und Lamothe, V. (2000). Phytoestrogens, endocrine disrupters from food. *Analisis* **28** (9), 763-75.

Bennetts, H. W., Underwood, E. J. und Shier, F. L. (1946). A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust.Vet.J.* **22**, 2-12.

- Bingham, S. A., Atkinson, C., Liggins, J., Bluck, L. und Coward, A. (1998). Phyto-oestrogens: where are we now? *Br.J.Nutr.* **79** (5), 393-406.
- Bitman, J. und Cecil, H. (1970). Estrogenic Activity Of DDT Analogs And Polychlorinated Biphenyls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **18** (6).
- Black, L. J., Sato, M., Rowley, E. R., Magee, D. E., Bekele, A., Williams, D. C., Cullinan, G. J., Bendele, R., Kauffman, R. F., Bensch, W. R. und . (1994). Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J.Clin.Invest* **93** (1), 63-69.
- Boehme, C. (1998). Chemikalien mit östrogenem Potential in Lebensmitteln und kosmetischen Mitteln. *Bundesgesundhbl.* **8**, 340-43.
- Boettger-Tong, H., Murthy, L., Chiappetta, C., Kirkland, J. L., Goodwin, B., Adlercreutz, H., Stancel, G. M. und Makela, S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on in vivo responses to exogenously administered estrogens. *Environ.Health Perspect.* **106** (7), 369-73.
- Bolt, H. M., Janning, P., Michna, H. und Degen, G. H. (2001). Comparative assessment of endocrine modulators with oestrogenic activity: I. Definition of a hygiene-based margin of safety (HB MOS) for xeno-oestrogens against the background of European developments. *Arch.Toxicol.* **74** (11), 649-62.
- Bond, G. P., McGinnis, P. M., Cheever, K. L., Harris, S. J., Plotnick, H. B. und Niemeier, R. W. (1980). Reproductive effects of bisphenol a. *Soc.Toxicol.Abst.Pap.*, A23.
- Bradbury, R. B. und White, D. E. (1954). Estrogens and related substances in plants. *Vitamins Horm.* **12**, 207-33.
- Braquet, P., Senn, N., Robin, J. P., Esanu, A. und Garay, R. P. (1986). Endogenous lignans--a potential endogenous digitalis. *J.Hypertens.Suppl* **4** (5), S161-S164.
- Brotans, J. A., Olea-Serrano, M. F., Villalobos, M., Pedraza, V. und Olea, N. (1995). Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ.Health Perspect.* **103** (6), 608-12.
- Brouwer, A., Morse, D. C., Lans, M. C., Schuur, A. G., Murk, A. J., Klasson-Wehler, E., Bergman, A. und Visser, T. J. (1998). Interactions of persistent environmental

organohalogenen mit dem Schilddrüsenhormonsystem: Mechanismen und mögliche Konsequenzen für Tier- und Menschgesundheit. *Toxicol. Ind. Health* **14** (1-2), 59-84.

Burlington, H. und Lindemann, V. F. (1950). Effect of DDT on Testes and Secondary Sex Characters of White Leghorn Cockerels. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **74**, 48-51.

Burroughs, C. D., Mills, K. T. und Bern, H. A. (1990a). Long-term genital tract changes in female mice treated neonatally with coumestrol. *Reprod. Toxicol.* **4** (2), 127-35.

Burroughs, C. D., Mills, K. T. und Bern, H. A. (1990b). Reproductive abnormalities in female mice exposed neonatally to various doses of coumestrol. *J. Toxicol. Environ. Health* **30** (2), 105-22.

Cagen, S. Z., Waechter, J. M., Jr., Dimond, S. S., Breslin, W. J., Butala, J. H., Jekat, F. W., Joiner, R. L., Shiotsuka, R. N., Veenstra, G. E. und Harris, L. R. (1999). Normal reproductive organ development in Wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **30** (2 Pt 1), 130-39.

Campbell, D. R. und Kurzer, M. S. (1993). Flavonoid inhibition of aromatase enzyme activity in human preadipocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **46** (3), 381-88.

Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. und Skakkebaek, N. E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* **305** (6854), 609-13.

Carr, C. J. und Wilkinson, C. F. (1997). Assessing the Risks of Adverse Endocrine-Mediated Effects. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **26** (1), 7-8.

Carrier, J. S., Turgeon, D., Journault, K., Hum, D. W. und Belanger, A. (2000). Isolation and characterization of the human UGT2B7 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272** (2), 616-21.

Casanova, M., You, L., Gaido, K. W., Archibeque-Engle, S., Janszen, D. B. und Heck, H. A. (1999). Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicol. Sci.* **51** (2), 236-44.

Cassidy, A., Bingham, S. und Setchell, K. D. (1994b). Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* **60** (3), 333-40.

- Cassidy, A., Bingham, S. A. und Cummings, J. H. (1994a). Starch intake and colorectal cancer risk: an international comparison. *Br.J.Cancer* **69** (5), 937-42.
- Cattet, M. (1988). Abnormal Sexual Differentiation in Black Bears and Brown Bears. *J.Mamm.* **69** (4), 849-52.
- Chang, H. H., Robinson, A. R. und Common, R. H. (1975). Excretion of radioactive daidzein and equol as monosulfates and disulfates in the urine of the laying hen. *Can.J.Biochem.* **53** (2), 223-30.
- Chapin, R. E., Stevens, J. T., Hughes, C. L., Kelce, W. R., Hess, R. A. und Daston, G. P. (1996). Endocrine modulation of reproduction. *Fundam.Appl.Toxicol.* **29** (1), 1-17.
- Chryssikopoulos, A. (1997). The relationship between the immune and endocrine systems. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **816**, 83-93.
- Clevenger, S. (1964). *Sci.Am.* **210**, 84.
- Colborn, T. and Clement, C. (1992). Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife-Human Connection. In: *Advances in Modern Environmental Toxicology* Princeton Scientific Publishing, Princeton, New Jersey.
- Colborn, T., vom Saal, F. S. und Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ.Health Perspect.* **101** (5), 378-84.
- Colborn, T., Myers, J. P., und Dumanoski, D. (1996). *Our stolen future: are we threatening our fertility, intelligence, and survival? A scientific detective story*, Penguin Books, New York.
- Coldham, N. G., Dave, M., Sivapathasundaram, S., McDonnell, D. P., Connor, C. und Sauer, M. J. (1997). Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environ.Health Perspect.* **105** (7), 734-42.
- Collins, B. M., McLachlan, J. A. und Arnold, S. F. (1997). The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids* **62** (4), 365-72.

- Cook, J. C., Kaplan, A. M., Davis, L. G. und O'Connor, J. C. (1997). Development of a Tier I Screening Battery for Detecting Endocrine-Active Compounds (EACs). *Regul.Toxicol.Pharmacol.* **26** (1), 60-68.
- Coughtrie, M. W., Burchell, B., Leakey, J. E. und Hume, R. (1988). The inadequacy of perinatal glucuronidation: immunoblot analysis of the developmental expression of individual UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes in rat and human liver microsomes. *Mol.Pharmacol.* **34** (6), 729-35.
- Couse, J. F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J. A. und Korach, K. S. (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* **138** (11), 4613-21.
- Coward, L., Kirk, M., Albin, N. und Barnes, S. (1996). Analysis of plasma isoflavones by reversed-phase HPLC-multiple reaction ion monitoring-mass spectrometry. *Clin.Chim.Acta* **247** (1-2), 121-42.
- Daston, G. P., Gooch, J. W., Breslin, W. J., Shuey, D. L., Nikiforov, A. I., Fico, T. A. und Gorsuch, J. W. (1997). Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. *Reprod.Toxicol.* **11** (4), 465-81.
- Davis, D. L., Bradlow, H. L., Wolff, M., Woodruff, T., Hoel, D. G. und Anton-Culver, H. (1993). Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ.Health Perspect.* **101** (5), 372-77.
- de Kleijn, M. J., Der Schouw, Y. T., Wilson, P. W., Adlercreutz, H., Mazur, W., Grobbee, D. E. und Jacques, P. F. (2001). Intake of Dietary Phytoestrogens Is Low in Postmenopausal Women in the United States: The Framingham Study(1-4). *J.Nutr.* **131** (6), 1826-32.
- Degen, G. H. (1996). Exposure to, and activity of, estrogens: knowledge and experience gained with the synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES). In: Expert round on endocrinologically active chemicals in the environment, Konferenz, 09.03.1995, Umweltbundesamt, Berlin
- Depue, R. H., Pike, M. C. und Henderson, B. E. (1983). Estrogen exposure during gestation and risk of testicular cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* **71** (6), 1151-55.

Divi, R. L., Chang, H. C. und Doerge, D. R. (1997). Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action. *Biochem.Pharmacol.* **54** (10), 1087-96.

Dodds, E. C. und Lawson, W. (1936). Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* **137**, 996.

Dodds, E. C. und Lawson, W. (1938). Molecular Structure in Relation to Oestrogenic Activity. Compounds without a Phenanthrene Nucleus. *Proc.R.Soc.Lon.B* **125**, 222-32.

Doerge, D. R., Chang, H. C., Churchwell, M. I. und Holder, C. L. (2000). Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metab Dispos.* **28** (3), 298-307.

Dwyer, J. T., Goldin, B. R., Saul, N., Gualtieri, L., Barakat, S. und Adlercreutz, H. (1994). Tofu and soy drinks contain phytoestrogens. *J.Am.Diet.Assoc.* **94** (7), 739-43.

Elsby, R., Maggs, J. L., Ashby, J. und Park, B. K. (2001). Comparison of the modulatory effects of human and rat liver microsomal metabolism on the estrogenicity of bisphenol A: implications for extrapolation to humans. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **297** (1), 103-13.

EPA. Drinking water Criteria Document for Polychlorinated Biphenyls PCBs. 1988. Cincinnati, OH, Office of Research and Development,

EPA (1997), Integrated Risk Information System on-line, <http://www.epa.gov/iris/subst/index.html>

EU (2000). Draft risk assessment report of 2,2-bis-(4-hydroxyphenyl)-propane (bisphenol A) - human health effects.

Eur.Chem.News. European Chemical News (18-24th October), 22-22, 1999.

Facemire, C. F., Gross, T. S. und Guillette, L. J., Jr. (1995). Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture? *Environ.Health Perspect.* **103 Suppl 4**, 79-86.

Falany,C.N. and Wilborn,T.W. (1994). Biochemistry of cytosolic sulfotransferases involved in bioactivation. In: *Conjugation-dependent carcinogenicity and toxicity of foreign compounds* (M.W.Anders and W.Dekant, Eds.), pp. 329-330. Academic Press, San Diego.

Food Standards Agency UK. SURVEY OF BISPHENOLS IN CANNED FOODS. 2001.

Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H., Fleischmann, G., Hase, T., Montesano, R. und Schweigerer, L. (1993). Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90** (7), 2690-94.

Francis, C. M. und Hume, I. D. (1971). The relationship between lignification and flavonoid production in subterranean clover. *Aust.J.Biol.Sci.* **24**, 1-5.

Franke, A. A. und Custer, L. J. (1994). High-performance liquid chromatographic assay of isoflavonoids and coumestrol from human urine. *J.Chromatogr.B Biomed.Appl.* **662** (1), 47-60.

George, J. D., Price, C. J., Wolkowski-Tyl, R. und Kimmel, C. A. (1985b). Teratologic evaluation of bisphenol a (Cas no. 80-05-7) Administered to cd(R) Rats on gestational days 6 through 15. Report.(Ntp.-85.-089.):193.Pp.,1985.Tax.- Rattus., Cd (NTP-85-089:193 PP,1985 TAX - RATTUS)), CDD.

George, J. D., Price, C. J., Wolkowski-Tyl, R., Marr, M. und Kimmel, C. A. (1985a). Teratologic evaluation of bisphenol a (Cas no. 80-05-7) Administered to cd-1 mice on gestational days 6 through 15. Final report. Report.(Ntp.-85.-088.):251.Pp.,1985.Tax.- Mus., Cd1. (NTP-85-088:251 PP,1985 TAX - MUS)), CD11.

Giusti, R. M., Iwamoto, K. und Hatch, E. E. (1995). Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Ann.Intern.Med.* **122** (10), 778-88.

Golden, R. J., Noller, K. L., Titus-Ernstoff, L., Kaufman, R. H., Mittendorf, R., Stillman, R. und Reese, E. A. (1998). Environmental endocrine modulators and human health: an assessment of the biological evidence. *Crit Rev.Toxicol.* **28** (2), 109-227.

Greenberg, E. R., Barnes, A. B., Resseguie, L., Barrett, J. A., Burnside, S., Lanza, L. L., Neff, R. K., Stevens, M., Young, R. H. und Colton, T. (1984). Breast cancer in mothers given diethylstilbestrol in pregnancy. *N.Engl.J.Med.* **311** (22), 1393-98.

Greim, H. (1998). Hormonähnlich wirkende Stoffe in der Umwelt - Einführung und Sachstand. *Bundesgesundhbl.* **8**, 326-29.

Hardin, B. D., Bond, G. P., Sikov, M. R., Andrew, F. D., Beliles, R. P. und Niemeier, R. W. (1981). Testing of selected workplace chemicals for teratogenic potential. *Scand.J.Work Environ.Health* **7 Suppl 4**, 66-75.

- Henderson, B. E., Ross, R. K., Judd, H. L., Krailo, M. D. und Pike, M. C. (1985). Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer* **56** (5), 1206-08.
- Henderson, B. E., Ross, R. K. und Pike, M. C. (1993). Hormonal chemoprevention of cancer in women. *Science* **259** (5095), 633-38.
- Howdeshell, K. L., Hotchkiss, A. K., Thayer, K. A., Vandenberg, J. G. und vom Saal, F. S. (1999). Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* **401** (6755), 763-64.
- Howe, S. R. und Borodinsky, L. (1998). Potential exposure to bisphenol A from food-contact use of polycarbonate resins. *Food Addit.Contam* **15** (3), 370-75.
- HSDB (2000), 4,4'-Bisphenol A. Hazardous Substances Data Base, <http://toxnet.nlm.nih.gov/>
- Hughes, C. L., Jr. (1988). Phytochemical mimicry of reproductive hormones and modulation of herbivore fertility by phytoestrogens. *Environ.Health Perspect.* **78**, 171-74.
- Ingram, D., Sanders, K., Kolybaba, M. und Lopez, D. (1997). Case-control study of phytoestrogens and breast cancer. *Lancet* **350** (9083), 990-94.
- Inoue, K., Kato, K., Yoshimura, Y., Makino, T. und Nakazawa, H. (2000). Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* **749** (1), 17-23.
- Irvine, C. H., Fitzpatrick, M. G. und Alexander, S. L. (1998). Phytoestrogens in soy-based infant foods: concentrations, daily intake, and possible biological effects. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **217** (3), 247-53.
- Jacobson, J. L. und Jacobson, S. W. (1996). Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *N.Engl.J.Med.* **335** (11), 783-89.
- Janning, P., Schuhmacher, U. S., Upmeier, A., Diel, P., Michna, H., Degen, G. H. und Bolt, H. M. (2000). Toxicokinetics of the phytoestrogen daidzein in female DA/Han rats. *Arch.Toxicol.* **74** (8), 421-30.
- Joannou, G. E., Kelly, G. E., Reeder, A. Y., Waring, M. und Nelson, C. (1995). A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **54** (3-4), 167-84.

Jobling, S. (1998). Review of Suggested Testing methods for Endocrine-Disrupting Chemicals. *Pure & Appl.Chem.* **70** (9), 1805-27.

Kaldas, R. S. und Hughes, C. L., Jr. (1989). Reproductive and general metabolic effects of phytoestrogens in mammals. *Reprod.Toxicol.* **3** (2), 81-89.

Kawamura, Y., Koyama, Y., keda, Y. und amada, T. (1998). Migration of Bisphenol A from Polycarbonate Products. *Journal of Food Hygiene* **99**, 206-12.

Kelly, G. PCT/AU93/000230, 1993.

Kelly, G. E., Joannou, G. E., Reeder, A. Y., Nelson, C. und Waring, M. A. (1995). The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **208** (1), 40-43.

Kelly, G. E., Nelson, C., Waring, M. A., Joannou, G. E. und Reeder, A. Y. (1993). Metabolites of dietary (soya) isoflavones in human urine. *Clin.Chim.Acta* **223** (1-2), 9-22.

King, C. D., Rios, G. R., Assouline, J. A. und Tephly, T. R. (1999). Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Arch.Biochem.Biophys.* **365** (1), 156-62.

King, R. A., Broadbent, J. L. und Head, R. J. (1996). Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats. *J.Nutr.* **126** (1), 176-82.

King, R. A. und Bursill, D. B. (1998). Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *Am.J.Clin.Nutr.* **67** (5), 867-72.

Kirkman, L. M., Lampe, J. W., Campbell, D. R., Martini, M. C. und Slavin, J. L. (1995). Urinary lignan and isoflavonoid excretion in men and women consuming vegetable and soy diets. *Nutr.Cancer* **24** (1), 1-12.

Klein, K. O., Baron, J., Colli, M. J., McDonnell, D. P. und Cutler, G. B., Jr. (1994). Estrogen levels in childhood determined by an ultrasensitive recombinant cell bioassay. *J.Clin.Invest* **94** (6), 2475-80.

Knaak, J. B. und Sullivan, L. J. (1966). Metabolism of bisphenol A in the rat. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **8** (2), 175-84.

- Korenman, S. G. (1969). Comparative binding affinity of estrogens and its relation to estrogenic potency. *Steroids* **13** (2), 163-77.
- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S. F., Tokes, L. und Feldman, D. (1993). Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* **132** (6), 2279-86.
- Kuch, H. M. und Ballschmiter, K. (2001). Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ.Sci.Technol.* **35** (15), 3201-06.
- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. und Gustafsson, J. A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138** (3), 863-70.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der, B. B. und Gustafsson, J. A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139** (10), 4252-63.
- Kulling, S. E., Honig, D. M., Simat, T. J. und Metzler, M. (2000). Oxidative in vitro metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. *J.Agric.Food Chem.* **48** (10), 4963-72.
- Kwon, S., Stedman, D. B., Elswick, B. A., Cattley, R. C. und Welsch, F. (2000). Pubertal development and reproductive functions of Crl:CD BR Sprague- Dawley rats exposed to bisphenol A during prenatal and postnatal development. *Toxicol.Sci.* **55** (2), 399-406.
- Lampe, J. W., Bigler, J., Bush, A. C. und Potter, J. D. (2000). Prevalence of polymorphisms in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B family: UGT2B4(D458E), UGT2B7(H268Y), and UGT2B15(D85Y). *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **9** (3), 329-33.
- Lan, N. C. und Katzenellenbogen, B. S. (1976). Temporal relationships between hormone receptor binding and biological responses in the uterus: studies with s. *Endocrinology* **98** (1), 220-27.
- Laws, S. C., Carey, S. A., Ferrell, J. M., Bodman, G. J. und Cooper, R. L. (2000). Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol.Sci.* **54** (1), 154-67.

- LeBlanc, G. A. (1995). Are environmental sentinels signaling? *Environ.Health Perspect.* **103** (10), 888-90.
- Lock, M. (1986). Ambiguities of aging: Japanese experience and perceptions of menopause. *Cult.Med.Psychiatry* **10** (1), 23-46.
- Loewe, S., Lange, F. und Spohr, E. (1927). Über weibliche Sexualhormone (Thelytropine). *Biochem.Zeitschr.* **180**, 1-26.
- Loffler, S. und Bolt, H. M. (1980). [The enterohepatic circulation of estradiol and ethinylestradiol in the rat]. *Arzneimittelforschung.* **30** (5), 810-13.
- Matthews, J. B., Twomey, K. und Zacharewski, T. R. (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem.Res.Toxicol.* **14** (2), 149-57.
- McCaul, K. A., Luke, C. G. und Roder, D. M. (1995). Trends in prostate cancer incidence and mortality rates in South Australia, 1977-1993. *Med.J.Aust.* **162** (10), 520-22.
- McLachlan, J. A. und Korach, K. S. (1995). Symposium on estrogens in the environment, III. *Environ.Health Perspect.* **103 Suppl 7**, 3-4.
- McNeal, T.P., Biles, J.E., Begley, T.H., Craun, J.C., Hopper, M.L., and Sack, C.A. (2000). Determination of Suspected Endocrine Disruptors in Foods and Food Packaging. In: *Analysis of Environmental Endocrine Disruptors* (L.H.Keith, T.L.Jones, and L.L.Needham, Eds.), pp. 33-52. Oxford University Press.
- Melnick, S., Cole, P., Anderson, D. und Herbst, A. (1987). Rates and risks of diethylstilbestrol-related clear-cell adenocarcinoma of the vagina and cervix. An update. *N.Engl.J.Med.* **316** (9), 514-16.
- Messina, M. (1995). Modern applications for an ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. *J.Nutr.* **125** (3 Suppl), 567S-9S.
- Messina, M. J., Persky, V., Setchell, K. D. und Barnes, S. (1994). Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr.Cancer* **21** (2), 113-31.
- Metzler, M. Synthese von hydroxylierten Bisphenol A Derivaten. 1998.

- Mittendorf, R. (1995). Teratogen update: carcinogenesis and teratogenesis associated with exposure to diethylstilbestrol (DES) in utero. *Teratology* **51** (6), 435-45.
- Moore, W. E. und Moore, L. H. (1995). Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (9), 3202-07.
- Morrissey, R. E., George, J. D., Price, C. J., Tyl, R. W., Marr, M. C. und Kimmel, C. A. (1987). The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **8** (4), 571-82.
- Morton, M. S., Matos-Ferreira, A., Abranches-Monteiro, L., Correia, R., Blacklock, N., Chan, P. S., Cheng, C., Lloyd, S., Chieh-ping, W. und Griffiths, K. (1997). Measurement and metabolism of isoflavonoids and lignans in the human male. *Cancer Lett.* **114** (1-2), 145-51.
- Morton, M. S., Wilcox, G., Wahlqvist, M. L. und Griffiths, K. (1994). Determination of lignans and isoflavonoids in human female plasma following dietary supplementation. *J. Endocrinol.* **142** (2), 251-59.
- Mousavi, Y. und Adlercreutz, H. (1993). Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture. *Steroids* **58** (7), 301-04.
- Mulder, G. J. (1986). Sex differences in drug conjugation and their consequences for drug toxicity. Sulfation, glucuronidation and glutathione conjugation. *Chem. Biol. Interact.* **57** (1), 1-15.
- Naim, M., Gestetner, B., Zilkah, S., Birk, Y. und Bondi, A. (1974). Soybean isoflavones. Characterization, determination, and antifungal activity. *J. Agric. Food Chem.* **22** (5), 806-10.
- Nakagawa, Y. und Suzuki, T. (2001). Metabolism of bisphenol A in isolated rat hepatocytes and oestrogenic activity of a hydroxylated metabolite in MCF-7 human breast cancer cells. *Xenobiotica* **31** (3), 113-23.
- Nau, H. (1997). Toxikokinetik. In: *Lehrbuch der Toxikologie* (H. Marquardt and S. G. Schäfer, Eds.), pp. 32-66. Spektrum-Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Nielsen, S. E., Breinholt, V., Justesen, U., Cornett, C. und Dragsted, L. O. (1998). In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotica* **28** (4), 389-401.

Oesch, F. (1997). Fremdstoffmetabolismus. In: Lehrbuch der Toxikologie (H. Marquardt and S. G. Schäfer, Eds.), pp. 68-93. Spektrum-Verlag, Heidelberg, Berlin.

Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A. M. und Sonnenschein, C. (1996). Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.* **104** (3), 298-305.

Pelissero, C., Bennetau, B., Babin, P., Le Menn, F. und Dunogues, J. (1991). The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **38** (3), 293-99.

Pfeiffer, E. und Metzler, M. (1998). *In vitro* metabolism of bisphenol A. *Toxicologist* **42**, 279.

Pottenger, L. H., Domoradzki, J. Y., Markham, D. A., Hansen, S. C., Cagen, S. Z. und Waechter, J. M., Jr. (2000). The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol. Sci.* **54** (1), 3-18.

Przyrembel, H. (1998). Natürliche Pflanzeninhaltsstoffe mit Wirkung auf das Hormonsystem. *Bundesgesundhbl.* **8**, 335-40.

Reel, J. R., George, J. D., Lawton, A. D., Meyers, C. B. und Lamb, J. C. (1985). Bisphenol a: Reproduction and fertility assessment in cd-1 mice when administered in the feed. Report. (Ntp.-85.-192.):346.Pp., 1985. Tax.- Mus., Cd1. (NTP-85-192:346 PP, 1985 TAX - MUS), CD11.

Reinisch, J. M., Ziemba-Davis, M. und Sanders, S. A. (1991). Hormonal contributions to sexually dimorphic behavioral development in humans. *Psychoneuroendocrinology* **16** (1-3), 213-78.

Ring, J. A., Ghabrial, H., Ching, M. S., Smallwood, R. A. und Morgan, D. J. (1999). Fetal hepatic drug elimination. *Pharmacol. Ther.* **84** (3), 429-45.

Rose, D. P., Boyar, A. P. und Wynder, E. L. (1986). International comparisons of mortality rates for cancer of the breast, ovary, prostate, and colon, and per capita food consumption. *Cancer* **58** (11), 2363-71.

Routledge, E. J. und Sumpter, J. P. (1997). Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J. Biol. Chem.* **272** (6), 3280-88.

- Rush, G. F., Newton, J. F. und Hook, J. B. (1983). Sex differences in the excretion of glucuronide conjugates: the role of intrarenal glucuronidation. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **227** (3), 658-62.
- Safe, S., Connor, K. und Gaido, K. (1998). Methods for xenoestrogen testing. *Toxicol.Lett.* **102-103**, 665-70.
- Safe, S. H. (1995). Environmental and dietary estrogens and human health: Is there a problem? *Environ.Health Perspect.* **103**, 346-51.
- Sajiki, J., Takahashi, K. und Yonekubo, J. (1999). Sensitive method for the determination of bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* **736** (1-2), 255-61.
- Schaefer, W. R., Zahradnik, H. P., Frijus-Plessen, N. und Schneider, K. (1996). Anthropogene Substanzen mit unerwünschter Östrogenwirkung. *Umweltmedizin* **1** (1), 35-42.
- Seaman, B. und Seaman, G. (1975). *Women and the Crisis in Sex Hormones*.
- Semenza, J. C., Tolbert, P. E., Rubin, C. H., Guillette, L. J., Jr. und Jackson, R. J. (1997). Reproductive toxins and alligator abnormalities at Lake Apopka, Florida. *Environ.Health Perspect.* **105** (10), 1030-32.
- Setchell, K.D. (1985). Naturally occurring non-steroidal estrogens of dietary origin. In: *Estrogens in the environment* (J.A.McLachlan, Ed.), pp. 69-85. Elsevier Press, New York.
- Setchell, K. D. (1998). Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am.J.Clin.Nutr.* **68** (6 Suppl), 1333S-46S.
- Setchell, K. D., Borriello, S. P., Hulme, P., Kirk, D. N. und Axelson, M. (1984). Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone- dependent disease. *Am.J.Clin.Nutr.* **40** (3), 569-78.
- Setchell, K. D., Gosselin, S. J., Welsh, M. B., Johnston, J. O., Balistreri, W. F., Kramer, L. W., Dresser, B. L. und Tarr, M. J. (1987). Dietary estrogens--a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. *Gastroenterology* **93** (2), 225-33.
- Setchell, K. D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J. und Heubi, J. E. (1997). Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet* **350** (9070), 23-27.

Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M. und Barnes, S. (1997). Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J.Nutr.* **127** (7), 1260-68.

Sharpe, R. M. und Skakkebaek, N. E. (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* **341** (8857), 1392-95.

Snyder, R. W., Maness, S. C., Gaido, K. W., Welsch, F., Sumner, S. C. und Fennell, T. R. (2000). Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **168** (3), 225-34.

Soto,A.M., Lin,T.-M., Justicia,H., Silvia,R.M., and Sonnenschein,C. (1992). An in culture bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics e-screen. In: *Advances in modern environmental toxicology* (T.Colborn and C.CLEMENT, Eds.), Vol. 21: CHEMICALLY-INDUCED ALTERATIONS IN SEXUAL AND FUNCTIONAL DEVELOPMENT: THE WILDLIFE CONNECTION, pp. 295-309. XXI+402P.PRINCETON SCIENTIFIC PUBLISHING CO.INC., PRINCETON,NEW JERSEY,USA.

Staples, C. A., Dorn, P. B., Klecka, G. M., O'Block, S. T. und Harris, L. R. (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* **36** (10), 2149-73.

Strauss, L., Makela, S., Joshi, S., Huhtaniemi, I. und Santti, R. (1998). Genistein exerts estrogen-like effects in male mouse reproductive tract. *Mol.Cell Endocrinol.* **144** (1-2), 83-93.

Suiko, M., Sakakibara, Y. und Liu, M. C. (2000). Sulfation of environmental estrogen-like chemicals by human cytosolic sulfotransferases. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **267** (1), 80-84.

Takahashi, O. und Oishi, S. (2000). Disposition of orally administered 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environ.Health Perspect.* **108** (10), 931-35.

Tekel, J., Daeseleire, E., Heeremans, A. und van Peteghem, C. (1999). Development of a simple method for the determination of genistein, daidzein, biochanin A, and formononetin (biochanin B) in human urine. *J.Agric.Food Chem.* **47** (9), 3489-94.

Tinwell, H., Joiner, R., Pate, I., Soames, A., Foster, J. und Ashby, J. (2000). Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature mouse. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* **32** (1), 118-26.

Toppari, J. e. al. (1995). Male Reproductive Health and Environmental Chemicals with Estrogenic Effects. Danish EPA, Miljøprojekt Nr.290.

Udenfriend, S., Clark, C., Axelrod, J. und Brodie, B. (1954). A model system for aromatic hydroxylation. *J.Biol.Chem.* **208**, 731-39.

Upmeier, A., Degen, G. H., Diel, P., Michna, H. und Bolt, H. M. (2000). Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han rats after a single i.v. and oral administration. *Arch.Toxicol.* **74** (8), 431-36.

vom Saal, F. S., Timms, B. G., Montano, M. M., Palanza, P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., Dhar, M. D., Ganjam, V. K., Parmigiani, S. und Welshons, W. V. (1997). Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94** (5), 2056-61.

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

Watanabe, S., Yamaguchi, M., Sobue, T., Takahashi, T., Miura, T., Arai, Y., Mazur, W., Wahala, K. und Adlercreutz, H. (1998). Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J.Nutr.* **128** (10), 1710-15.

Whitten, P. L. und Patisaul, H. B. (2001). Cross-Species and Interassay Comparisons of Phytoestrogen Action. *Environ.Health Perspect.* **109 Suppl 1**, 5-20.

Wiebe, V. J., Osborne, C. K., Fuqua, S. A. und DeGregorio, M. W. (1993). Tamoxifen resistance in breast cancer. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* **14** (3), 173-88.

Wolff, M. S., Toniolo, P. G., Lee, E. W., Rivera, M. und Dubin, N. (1993). Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* **85** (8), 648-52.

Wu, A. H., Ziegler, R. G., Pike, M. C., Nomura, A. M., West, D. W., Kolonel, L. N., Horn-Ross, P. L., Rosenthal, J. F. und Hoover, R. N. (1996). Menstrual and reproductive factors and risk of breast cancer in Asian- Americans. *Br.J.Cancer* **73** (5), 680-86.

WWF and Lyons, G. Bisphenol A - A known endocrine disruptor. World Wildlife Fund-UK. 1-37, 2000.

- Xu, X., Harris, K. S., Wang, H. J., Murphy, P. A. und Hendrich, S. (1995). Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J.Nutr.* **125** (9), 2307-15.
- Xu, X., Wang, H. J., Murphy, P. A., Cook, L. und Hendrich, S. (1994). Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. *J.Nutr.* **124** (6), 825-32.
- Yasuda, T., Kano, Y., Saito, K. und Ohsawa, K. (1994). Urinary and biliary metabolites of daidzin and daidzein in rats. *Biol.Pharm.Bull.* **17** (10), 1369-74.
- Yokota, H., Iwano, H., Endo, M., Kobayashi, T., Inoue, H., Ikushiro, S. und Yuasa, A. (1999). Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem.J.* **340** (Pt 2), 405-09.
- Yoshida, T., Horie, M., Hoshino, Y. und Nakazawa, H. (2001). Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. *Food Addit.Contam* **18** (1), 69-75.
- Yueh, T. L. und Chu, H. Y. (1977). The metabolic fate of daidzein. *Sci.Sin.* **20** (4), 513-21.
- Zava, D. T., Blen, M. und Duwe, G. (1997). Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture. *Environ.Health Perspect.* **105 Suppl 3**, 637-45.
- Zhang, Y., Song, T. T., Cunnick, J. E., Murphy, P. A. und Hendrich, S. (1999). Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. *J.Nutr.* **129** (2), 399-405.
- Zhu, B. T., Suchar, L. A., Huang, M. T. und Conney, A. H. (1996). Similarities and differences in the glucuronidation of estradiol and estrone by UDP-glucuronosyltransferase in liver microsomes from male and female rats. *Biochem.Pharmacol.* **51** (9), 1195-202.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name : Thomas Colnot
Geburtsdatum : 18.01.1972
Geburtsort: Neunkirchen / Saar
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1978 - 1982 Grundschohle in Völklingen
1982 - 1991 Staatliches Realgymnasium in Völklingen
05/1991 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

07/1991 - 06/1992 Ableistung des Wehrdienstes

Studium

10/1992 – 07/1997 Studium Fachrichtung Diplom-Chemie an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken
10/1994 mündliche Diplom-Vorprüfung
12/1996 mündliche Diplom-Hauptprüfung
01/1997 – 07/1997 Diplomarbeit bei Prof. Dr. H. P. Beck am Institut für Anorganische und Analytische Chemie und Radiochemie der Universität des Saarlandes in Saarbrücken über das Thema: „Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der Stöchiometrie von (Sr,Ba)-Titanaten mittels Induktiv Gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS)“, Abschluß als Diplom-Chemiker
seit 10/1997 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Toxikologie und Pharmakologie der Universität Würzburg unter Betreuung von Prof. Dr. H. J. Gross und unter Anleitung von Prof. Dr. W. Dekant über das Thema „Beurteilung von Phyto- und Xenoöstrogenen am Beispiel ausgewählter Substanzen - Biotransformation und Toxikokinetik von Daidzein und Bisphenol A in Menschen und Ratten“

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die Dissertation „Beurteilung von Phyto- und Xenoöstrogenen am Beispiel ausgewählter Substanzen - Biotransformation und Toxikokinetik von Daidzein und Bisphenol A in Menschen und Ratten“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, daß diese Dissertation weder in gleicher oder in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.