

UMWELT & GESUNDHEIT

04/2012

Phthalat-Belastung der Bevölkerung in Deutschland: Expositionsrelevante Quellen, Aufnahmepfade und Toxikokinetik am Beispiel von DEHP und DINP

Band III: Humane Toxikokinetikstudie

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungskennzahl 3707 61 201
UBA-FB 001637/3

Phthalat-Belastung der Bevölkerung in Deutschland: Expositionsrelevante Quellen, Aufnahmepfade und Toxiko- kinetik am Beispiel von DEHP und DINP

Band III: Humane Toxikokinetikstudie

von

Prof. Dr. Hermann Fromme, PD Dr. Wolfgang Völkel
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Sachgebiet Chemikaliensicherheit und Toxikologie

Prof. Dr. Johannes G. Filser, Dr. Winfried Kessler
Helmholtz Zentrum München, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Toxikologie

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

UMWELTBUNDESAMT

Diese Publikation ist ausschließlich als Download unter <http://www.uba.de/uba-info-medien/4393.html> verfügbar. Hier finden Sie auch die weiteren drei Bände zum Forschungsprojekt sowie eine Kurzfassung auf Deutsch und Englisch.

Die in der Studie geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen der Herausgeber übereinstimmen.

Abschlussdatum: April 2012

ISSN 1862-4340

Herausgeber: Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Roßlau
Tel.: 0340/2103-0
Telefax: 0340/2103 2285
E-Mail: info@umweltbundesamt.de
Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>
<http://fuer-mensch-und-umwelt.de/>

Bundesinstitut für Risikobewertung
Max-Dohrn-Str. 8-10
10589 Berlin
Tel.: 030 1 8412-0
Telefax: 030 1 8412-4970
E-Mail: pressestelle@bfr.bund.de
Internet: <http://www.bfr.bund.de/>

Redaktion: Umweltbundesamt, Fachgebiet II 1.6 Expositions-
schätzung, gesundheitsbezogene Indikatoren
André Conrad, Dirk Wintermeyer

Dessau-Roßlau, Dezember 2012

Inhaltsverzeichnis Band III

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	IV
VERZEICHNIS DER TABELLEN.....	VI
ERLÄUTERUNG DER ABKÜRZUNGEN	VII
1 TOXIKOKINETISCHE GESICHTSPUNKTE UND PROBLEMSTELLUNG.....	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Vorgehensweise.....	3
2 MATERIAL UND METHODEN	4
2.1 Reagentien.....	4
2.2 Analytische Methoden.....	4
2.2.1 DEHP-d4 und freies MEHP-d4 im Vollblut	4
2.2.2 MEHP-d4- β -Glukuronid im Vollblut	7
2.2.3 MEHP-d4, 5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4, 2cx-MMHP-d4 und 5cx-MEPP in Plasma und Urin	8
2.2.4 Auswahl der Probanden, Durchführung der Exposition sowie Probennahmen	12
3 ERGEBNISSE	15
3.1 DEHP-d4, MEHP-d4 und MEHP-d4- β -Glukuronid im Vollblut von Probanden nach oralen Einnahme von DEHP-d4	15
3.2 MEHP-d4, 5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4 und 2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4 im Plasma von Probanden nach oraler Einnahme von DEHP-d4.....	19
3.3 Ausscheidung von MEHP-d4, 5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4 und 2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4 im Urin von Probanden nach oraler Einnahme von DEHP-d4.....	24
3.4 Korrelationen der im Urin ausgeschiedenen Metabolitenmengen mit der systemischen Belastung durch freies MEHP-d4	29
4 DISKUSSION	31
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	35
6 LITERATUR	36

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Metabolismusschema von DEHP (Koch et al. 2005)	3
Abbildung 2: Repräsentative GCMSD-Chromatogramme von DEHP-d4 aus humanen Blutproben. A) Kontrollblut versetzt mit DEHP-d4 (0,06 nmol/ml); B) Blutprobe eines Probanden vor DEHP-d4-Einnahme; C) Blutprobe eines Probanden 3 h nach DEHP-d4-Einnahme	6
Abbildung 3: Repräsentative GCMSD-Chromatogramme des MEHP-d4-Derivats aus Blutproben. A) Kontrollblut versetzt mit MEHP-d4 (0,9 nmol/ml); B) Blutprobe eines Probanden vor DEHP-d4-Einnahme; C) Blutprobe eines Probanden 3 h nach DEHP-d4-Einnahme	6
Abbildung 4: Linearität der DEHP-d4- und MEHP-d4-Methode. Symbole: jeweils Doppelbestimmungen. Lineare Regressionen: DEHP-d4 $r^2 = 0,999$; MEHP-d4 $r^2 = 0,997$	7
Abbildung 5: Verhältnis der Konzentrationen von MEHP-d4 im Plasma und Vollblut nach Zugabe zum Vollblut. Symbole: Mittelwerte aus Doppelbestimmungen; lineare Regression: $y = 1,84 \cdot x$	7
Abbildung 6: Reale Urinprobe 6 Stunden nach Einnahme von DEHP-d4. Achtung: 2cx-MMHP-d4 und 5cx-MEPP-d4 können nicht getrennt werden (siehe Text)	10
Abbildung 7: Reale Plasmaprobe 4 Stunden nach Einnahme von DEHP-d4. Achtung: 2cx-MMHP-d4 und 5cx-MEPP-d4 können nicht getrennt werden (siehe Text)	11
Abbildung 8: Wasserprobe mit geringen Mengen an MEHP als „Verunreinigung“	12
Abbildung 9: Konzentrations-Zeitverläufe von DEHP-d4 und MEHP-d4 im Vollblut der Probanden nach der Einnahme von etwa 640 µg DEHP-d4 pro kg Körpergewicht. Symbole: Mittelwerte von Doppelbestimmungen	16
Abbildung 10: Konzentrationen von DEHP-d4 vor und nach einstündigen Inkubationen von Blutproben mit β-Glukuronidase sowie von freiem MEHP-d4 vor und nach einstündigen Inkubationen von Blutproben ohne β-Glukuronidase. Symbole: Mittelwerte von Doppelbestimmungen	17
Abbildung 11: Gemittelte Konzentrations-Zeitverläufe von DEHP-d4 und Gesamt-MEHP-d4 im Vollblut aller Probanden nach der Einnahme von DEHP-d4. A) Symbole: Mittelwerte ± Standardabweichungen der Messwerte aus Abbildung 6 (n = 4); B) Symbole: Mittelwerte zur Bestimmung der Halbwertszeiten von DEHP-d4 und Gesamt-MEHP-d4; Linien: Anpassung von Exponentialfunktionen an die Mittelwerte	18
Abbildung 12: Blutplasmakurven von DEHP-d4-Metaboliten bei Proband 1 nach Einnahme von 0,64 mg DEHP-d4/kg	20
Abbildung 13: Blutplasmakurven von DEHP-d4-Metaboliten bei Proband 2 nach Einnahme von 0,65 mg DEHP-d4/kg	20
Abbildung 14: Blutplasmakurven von DEHP-d4-Metaboliten bei Proband 3 nach Einnahme von 0,66 mg DEHP-d4/kg	21

Abbildung 15: Blutplasmakurven von DEHP-d4-Metaboliten bei Proband 4 nach Einnahme von 0,62 mg DEHP-d4/kg	21
Abbildung 16: Gemittelte Konzentrations-Zeitverläufe von MEHP-d4, 5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4 und 2cx-MMHP-d4+5cx-MEPP-d4 im Plasma aller Probanden nach der Einnahme von DEHP-d4. A) Symbole: Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Messwerte aus den Abbildungen 12-15 (n = 4); B) Symbole: Mittelwerte zur Bestimmung der jeweiligen Halbwertszeiten; Linien: Anpassung von Exponentialfunktionen an die Mittelwerte.....	23
Abbildung 17: Vergleich der Methoden für die Bestimmung von Gesamt-MEHP-d4: Messungen im Blutplasma mittels LC-MS/MS vs. Messungen im Vollblut mittels GCMSD. Symbole: Messdaten von allen Probanden (n = 57); Linie: lineare Korrelation durch den Ursprung ($y = 2,35 \cdot x$, $R^2 = 0,96$).....	24
Abbildung 18: Zeitverlauf der Metabolitenausscheidung im Urin bei Proband 1 (59 kg KG) nach Einnahme von 37,8 mg DEHP-d4	25
Abbildung 19: Zeitverlauf der Metabolitenausscheidung im Urin bei Proband 2 (76 kg KG) nach Einnahme von 49,4 mg DEHP-d4.....	25
Abbildung 20: Zeitverlauf der Metabolitenausscheidung im Urin bei Proband 3 (88 kg KG) nach Einnahme von 58,1 mg DEHP-d4.....	26
Abbildung 21: Zeitverlauf der Metabolitenausscheidung im Urin bei Proband 4 (105 kg KG) nach Einnahme von 65,1 mg DEHP-d4.....	26
Abbildung 22: Gemittelte Zeitverläufe der Metabolitenausscheidung im Urin aller Probanden nach der Einnahme von DEHP-d4. A) Symbole: Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Messwerte aus den Abbildungen 12-15 (n = 4); B) Symbole: Mittelwerte zur Bestimmung der jeweiligen Halbwertszeiten; Linien: Anpassung von Exponentialfunktionen an die Mittelwerte.....	27
Abbildung 23: Kumulative Ausscheidung von DEHP-d4-Metaboliten im Urin in [mg] für Proband 1	28
Abbildung 24: Lineare Beziehungen zwischen der Fläche der Konzentrations-Zeitkurve ($AUC_{0-24\text{h}}$) von freiem MEHP-d4 im Blut und den im Urin ausgeschiedenen, auf das Körpergewicht normierten Gesamtmengen einzelner DEHP-d4-Metaboliten. Rote Symbole: Urinausscheidung bis 22 h; blaue Symbole: Urinausscheidung bis 46 h. Die Bestimmungsmaße waren für die beiden Zeitperioden jeweils identisch.....	30

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Relevante Daten zu Probanden, a) DEHP-d4-Dosen und Einnahmezeiten b) Frühstück und Mittagessen	13
Tabelle 2: Auf die DEHP-d4-Dosis normierte Flächen unter den Konzentrations- Zeitkurven von DEHP-d4 und MEHP-d4 im Vollblut ($AUC_{0-24\text{ h}}$) [nmol*h/ml pro mmol DEHP-d4/kg Körpergewicht]; MW: Mittelwert; STA: Standardabweichung	17
Tabelle 3: Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) von DEHP-d4 und Gesamt-MEHP-d4 im Vollblut, berechnet aus den Steigungen der Exponentialfunktionen in Abbildung 11.....	19
Tabelle 4: Auf die DEHP-d4-Dosis normierte Flächen unter den Konzentrations- Zeitkurven ($AUC_{0-24\text{ h}}$) von Gesamt-MEHP-d4, 5-OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP- d4 und 2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4 im Plasma; MW: Mittelwert; STA: Standardabweichung	22
Tabelle 5: Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) von MEHP-d4, 5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4 und 2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4 im Plasma, berechnet aus den Steigungen der Exponentialfunktionen in Abbildung 16	23
Tabelle 6: Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der Urinausscheidung von MEHP-d4, 5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4 und 2cx-MMHP-d4+5cx-MEPP-d4, berechnet aus den Steigungen der Exponentialfunktionen in Abbildung 22 B	27
Tabelle 7: Gesamtausscheidung aller Metabolite pro Person	28
Tabelle 8: Anteil des jeweiligen Metaboliten in % an der Gesamtdosis.....	29
Tabelle 9: Auf die DEHP-d4-Dosis normierte Fläche unter der Konzentrations- Zeitkurve bis 24 h ($AUC_{0-24\text{ h}}$) von freiem MEHP-d4 bei verschiedenen Spezies ¹ Kessler et al. (2004); * Mittelwert \pm Standardabweichung; **Konzentrations- Zeitkurve zusammengesetzt aus jeweils 2 Blutproben von 8 Tieren	32
Tabelle 10: Faktoren zur Berechnung der DEHP-Dosis anhand der Gesamtmenge des im Zeitraum von 22 h bzw. 46 h jeweils ausgeschiedenen Metaboliten	34

Erläuterung der Abkürzungen

AUC _{0-24 h}	Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve bis 24 h
DEHP	Di(2-ethylhexyl)phthalat
DEHP-d4	Di(2-ethylhexyl)(3,4,5,6-2H4)phthalat
DINP	Diisononylphthalat
DNOP	Di-n-octylphthalat
GCMSD	Gaschromatographie mit massenspektrometischer Detektion
KG	Körpergewicht
LC-MS/MS	Flüssigchromatograph mit Tandem-Massenspektrometer
MEHP	Mono(2-ethylhexyl)phthalat
MEHP-d4	Mono(2-ethylhexyl)(3,4,5,6-2H4)phthalat
5OH-MEHP	Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalat
5OH-MEHP-d4	Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)(3,4,5,6-2H4)phthalat
5oxo-MEHP	Mono(2-ethyl-5-oxohexyl)phthalat
5oxo-MEHP-d4	Mono(2-ethyl-5-oxohexyl)(3,4,5,6-2H4)phthalat
5cx-MEPP	Mono(2-ethyl-5-carboxypentyl)phthalat
5cx-MEPP-d4	Mono(2-ethyl-5-carboxypentyl)(3,4,5,6-2H4)phthalat
2cx-MMHP	Mono(2-carboxymethylhexyl)phthalat

1 Toxikokinetische Gesichtspunkte und Problemstellung

1.1 Einleitung

Bis(2-ethylhexyl)phthalat (Di(2-ethylhexyl)phthalat, Diethylhexylphthalat, DEHP) erwies sich bei Ratten als toxikologisch wirksamster Phthalsäureester mit den Testes als empfindlichstem Organ (Toxikologie von DEHP zusammengefasst in ECB, 2004). Die testikuläre Toxizität ist abhängig von der Dosis und dem Alter der Versuchstiere, wobei juvenile Tiere besonders empfindlich reagieren. Bei dem sich entwickelnden Fetus steht eine antiandrogene Wirkung im Vordergrund. DEHP wird im ersten metabolischen Schritt hydrolytisch zu Mono(2-ethylhexyl)phthalat (MEHP) abgebaut, das durch Oxidationen am verbliebenen 2-Ethylhexylrest weiter metabolisiert wird (Abbildung 1). Die in den Tierversuchen beobachteten Effekte von DEHP werden auf MEHP zurückgeführt (Borch et al. 2006, Chauvigné et al. 2009, Clewell et al. 2010, Lambrot et al. 2009, Sjöberg et al. 1986, Wilson et al. 2004). Zwei sekundäre Metabolite, Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalat (5OH-MEHP) und Mono(2-ethyl-5-oxohexyl)phthalat (5oxo-MEHP), wirken nach in-vitro-Befunden embryotoxisch und antiandrogen (Régnier et al. 2004, Stroheker et al. 2005), wobei die Testes nicht involviert sind. Die aufgeführten DEHP-Metaboliten werden im Urin ausgeschieden. Hierauf beruht das Biomonitoring von DEHP-Expositionen.

DEHP wird ubiquitär gefunden. Die DEHP-Belastung der Allgemeinbevölkerung wurde durch den Nachweis bestimmter Metaboliten im Urin gezeigt. Basierend auf den in Morgenurinproben einer Stichprobe (n = 85) der Allgemeinbevölkerung gefundenen Mengen an den Monoestern MEHP, 5OH-MEHP und 5oxo-MEHP, berechneten Koch et al. (2003, 2006) sowohl die durchschnittliche als auch die individuelle, tägliche DEHP-Aufnahme. Die zu dieser Berechnung erforderliche Kenntnis der Verhältnisse der einzelnen im Urin gefundenen Monoester zur aufgenommenen DEHP-Dosis entnahmen Koch et al. (2003) einer Studie an zwei Freiwilligen (Schmidt & Schlatter 1985). Hierüber ergab sich eine tägliche DEHP-Aufnahme von 13,8 µg/kg (Median) bzw. 52,1 µg/kg (95. Perzentil). Bei 5 von 85 untersuchten Personen war aufgrund dieser Daten der Sicherheitsfaktor, der „Margin of Safety“, zum „no-observed adverse effect level“ bei der Ratte (4,8 mg/kg; Wolfe und Layton 2003, zitiert in ECB 2004)

kleiner als 100 und damit die duldbare tägliche Aufnahme überschritten. In einer weiteren Studie bestimmten Koch et al. (2004, 2005) die Gesamtausscheidung der obigen Monoester im Urin eines einzigen, männlichen Probanden nach oraler Einnahme dreier unterschiedlicher DEHP-Dosen. Unter Heranziehung der hier erhaltenen Daten errechneten Koch et al. (2006) für die obige Stichprobe eine ca. 2-fach niedrigere DEHP-Aufnahme von 7,7 µg/kg (Median) bzw. 25 µg/kg (95. Perzentil). Der „Margin of Safety“ wäre nur noch bei einer Person kleiner als 100. Es stellt sich die Frage, ob es ausreicht, zur Ermittlung der täglichen DEHP-Aufnahme die Monoesterausscheidung ausschließlich im Morgenurin zu bestimmen und die Ausscheidungsdaten von nur einem einzigen Probanden zu verwenden.

Aus der Exposition gegen DEHP resultiert eine systemische Belastung durch den Primärmetaboliten MEHP sowie oxidativen Folgemetaboliten. Bisher existiert nur eine einzige, als vorläufig anzusehende Studie, die diese Belastung untersucht hat: Bei einem einzelnen DEHP-exponierten Probanden war im Zeitraum zwischen 2 und 8 h nach oraler DEHP-Aufnahme die Konzentrationen von MEHP, 5OH-MEHP, 5oxo-MEHP, Mono(2-carboxymethylhexyl)phthalat (2cx-MMHP) und Mono(2-ethyl-5-carboxypentyl)phthalat (5cx-MEPP) im Plasma an nur vier Zeitpunkten bestimmt worden (Koch et al. 2004, 2005). Die Kenntnis der Belastung beispielsweise durch den wirksamen Metaboliten MEHP beim Menschen erlaubt einen Vergleich mit entsprechenden Daten bei der Ratte als empfindlicher und beim Marmoset als unempfindlicher Spezies (Kessler et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit sollten an erwachsenen Probanden Belastungsparameter für DEHP und seinen Metaboliten MEHP, 5OH-MEHP, 5oxo-MEHP, 2cx-MMHP und 5cx-MEPP nach DEHP-Aufnahme bestimmt werden mit dem Ziel, zuverlässige, quantitative Daten zu generieren, die für das Biomonitoring und die Bewertung des Gesundheitsrisikos von DEHP verwendbar sind.

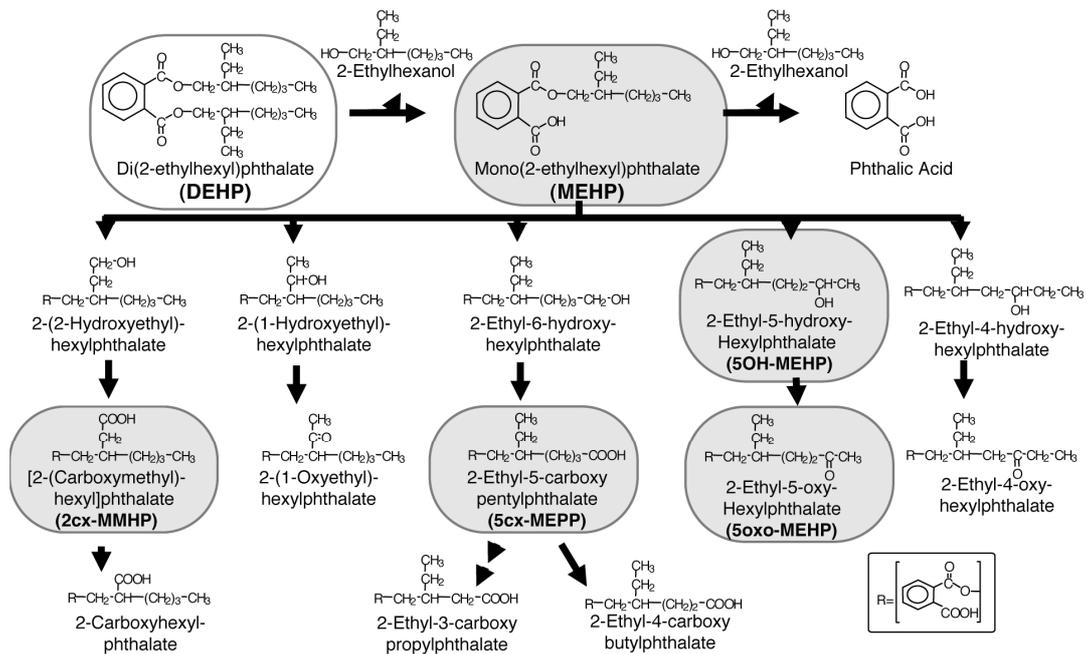


Abbildung 1: Metabolismusschema von DEHP (Koch et al. 2005)

1.2 Vorgehensweise

Vier männliche Probanden nahmen am Ring deuteriertes DEHP (DEHP-d4) mit einer Zieldosis von 640 µg/kg einmalig oral auf. DEHP-d4 wurde eingesetzt, da DEHP und MEHP in der Umwelt ubiquitär gefunden werden und die spezifische Analytik stören (Kessler et al. 2001). Die Zieldosis entspricht der Hälfte der täglich bei einer achtstündigen Exposition gegen die maximale Arbeitsplatzkonzentration von 10 mg DEHP pro m³ Atemluft (DFG 2002) inhalieren DEHP-Menge. Vor und bis 24 h nach Einnahme wurden Blutproben entnommen, die auf ihren Gehalt an DEHP-d4 und MEHP-d4 (Vollblut; Prof. Dr. Filser, Dr. Kessler, Helmholtz Zentrum München) sowie an MEHP-d4, 5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4, 2cx-MMHP-d4 und 5cx-MEPP-d4 (Plasma; Prof. Dr. Fromme, PD Dr. Völkel, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit) untersucht wurden. Urinproben wurden ebenfalls vor der Einnahme und bis 46 h danach gesammelt. Sie dienten zur Bestimmung der Ausscheidung von MEHP-d4, 5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4, 2cx-MMHP-d4 und 5cx-MEPP-d4 (Prof. Dr. Fromme, PD Dr. Völkel, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit).

2 Material und Methoden

2.1 Reagentien

Gaschromatographische Methode: Als am Ring deuterierte Standards wurden Di(2-ethylhexyl)(3,4,5,6-²H₄)-phthalat (DEHP-d₄, ≥ 98 Atom- % ²H₄) von ISOTEC (Miamisburg, USA) und Mono(2-ethylhexyl)(3,4,5,6-²H₄)-phthalat (MEHP-d₄, > 99 %) vom Biochemischen Institut für Umweltcarcinogene, Prof. Dr. Gernot Grimmer-Stiftung (Großhansdorf), verwendet. Als jeweilige interne Standards dienten Di-n-octylphthalat (DNOP, ≥ 99 %) bzw. Mono-n-octylphthalat (MNOP, 95 %) von der BASF (Ludwigshafen). β-Glukuronidase (140 U/mg) aus E. Coli K12 stammte von Roche (Mannheim). Zur Validierung der β-Glukuronidase wurden 4-Methylumbelliferyl-β-Glukuronid (98 %) und 4-Methylumbelliferon (98 %) von Sigma (Taufkirchen) sowie MEHP-d₄-β-Glukuronid (> 99 %) vom Biochemischen Institut für Umweltcarcinogene, Prof. Dr. Gernot Grimmer-Stiftung (Großhansdorf), bezogen. Organische Lösungsmittel von höchster Reinheit (Promochem picograde) stammten von LGC Standards (Wesel).

Flüssigchromatographische Methode: MEHP, ¹³C₄-MEHP (Ring-1,2-¹³C₂, Dicarboxyl-¹³C₂), 5oxo-MEHP, ¹³C₄-5oxo-MEHP (Ring-1,2-¹³C₂, Dicarboxyl-¹³C₂) und 5OH-MEHP wurden vom „Cambridge Isotope Laboratories“ (Andover, USA) bezogen, 5OH-MEHP Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)(3,4,5,6-²H₄)phthalat (5OH-MEHP-d₄), Mono(2-carboxymethylhexyl)phthalat (2cx-MMHP), Mono(2-carboxymethylhexyl)(3,4,5,6-²H₄)phthalat (2cx-MMHP-d₄), Mono(2-ethyl-5-carboxypentyl)phthalat (5cx-MEPP) und Mono(2-ethyl-5-carboxypentyl)(3,4,5,6-²H₄)phthalat (5cx-MEPP-d₄) vom Biochemischen Institut für Umweltcarcinogene, Prof. Dr. Gernot Grimmer-Stiftung (Grosshansdorf).

2.2 Analytische Methoden

2.2.1 DEHP-d₄ und freies MEHP-d₄ im Vollblut

DEHP-d₄ und freies MEHP-d₄ wurden mittels Gaschromatographie mit massenspektrometischer Detektion (GCMSD) bestimmt. Eine in der Arbeitsgruppe etablierte Methode zur Analyse von DEHP-d₄ mit DNOP als internem Standard im Vollblut (Kessler et al. 2004) wurde zur Erhöhung der Empfindlichkeit abgeändert. Nach Zugabe des internen Standards zu 500-µl-Blutproben, Verdünnung mit 1 ml Wasser und

Proteindenaturierung mit 1,5 ml Acetonitril wurden die Substanzen mit 1 ml n-Hexan extrahiert. Der n-Hexanextrakt wurde „on-column“ in einen GC 6890 versehen mit einem MSD 5973 (beide Geräte von Agilent Technologies, Waldbronn) injiziert, wobei die Temperatur des Injektors immer 3 °C über der jeweiligen Ofentemperatur lag („oven track“). Die Auftrennung geschah mittels einer Kapillarsäule HP-5MS (Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 1 µm) bei folgendem Temperaturprogramm: Anfangstemperatur 60 °C (1 min), Temperaturerhöhung mit einer Rate von 60 °C/min bis zur Endtemperatur von 290 °C (7 min), Kühlung bis zur Anfangstemperatur. Helium als Trägergas hatte einen Fluss von 1 ml/min. Die Quantifizierung erfolgte nach Elektronenionisation anhand der Massenfragmente m/z 153 für DEHP-d4 und m/z 149 für DNOP im „single ion monitoring“-Modus.

Die Methode zur Analyse von MEHP-d4 und seinem internem Standard MNOP im Vollblut mittels GCMSD nach Derivatisierung mit Pentafluorpropionsäureanhydrid/Pentafluorpropanol war bereits etabliert (Kessler et al. 2004). Sie wurde ohne Änderungen übernommen. Die Derivate von MEHP-d4 bzw. MNOP mit Pentafluorpropionsäureanhydrid/Pentafluorpropanol (2/1, v/v) wurden anhand der Massenfragmente m/z 285 bzw. m/z 281 im „single ion monitoring“-Modus quantifiziert. Beide Analyseverfahren wurden mittels frisch gewonnenen Humanbluts validiert. Typische Gaschromatogramme von DEHP-d4 und MEHP-d4-Derivat demonstrieren die vollständige Abwesenheit von Störsignalen (Abbildung 2 und 3).

Abbildung 4 zeigt die sehr gute Linearität beider Methoden. Die Nachweisgrenzen für DEHP-d4 und MEHP-d4, definiert als das jeweils dreifache Signalrauschen, lagen für beide Substanzen bei 9 pmol/ml Blut. Die Reproduzierbarkeit der DEHP-d4-Messung (n = 4) war ≤ 5 % bei 13-500 pmol/ml, diejenige der MEHP-d4-Messung (n = 4) war 15 % bei 18, < 10 % bei 90 und ≤ 3 % bei 180-700 pmol/ml.

Um die auf Vollblut bezogenen Angaben für MEHP-d4 auf Plasma umrechnen zu können, wurde der Umrechnungsfaktor Plasma-zu-Vollblut experimentell ermittelt. Hierzu wurden zuerst Messungen im Vollblut und Plasma, denen verschiedene MEHP-d4-Konzentrationen zugesetzt waren, durchgeführt. Sodann wurden aus den Vollblutproben durch Zentrifugation Plasmaproben gewonnen, in denen erneut MEHP-d4 bestimmt wurde. Aus dem Vergleich der Messungen im Vollblut und Plasma ergab sich ein Faktor Plasma-zu-Vollblut von 1,84 (Abbildung 5).

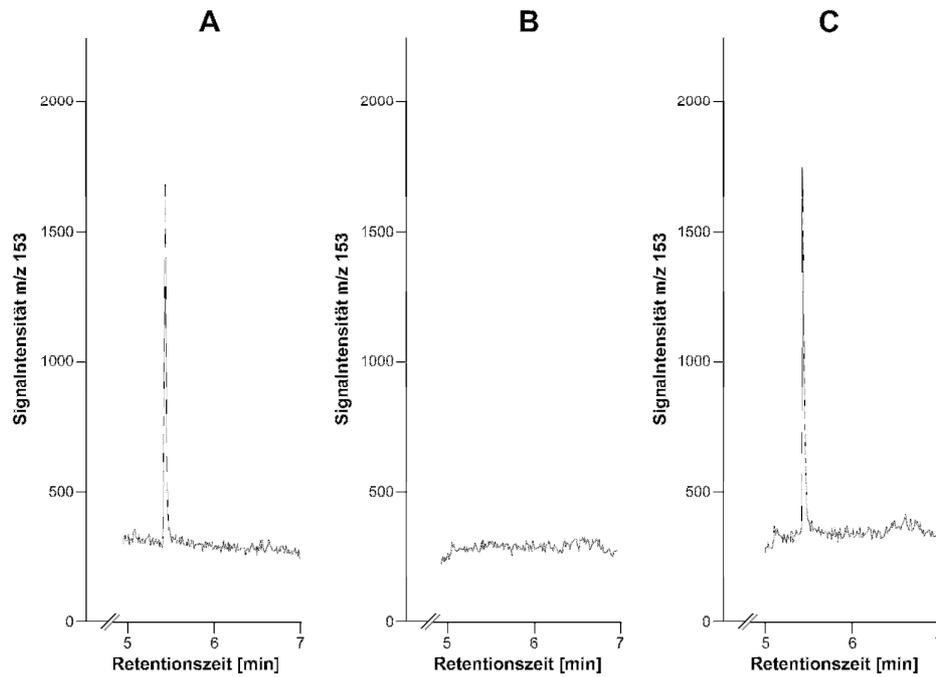


Abbildung 2: Repräsentative GCMSD-Chromatogramme von DEHP-d4 aus humanen Blutproben. A) Kontrollblut versetzt mit DEHP-d4 (0,06 nmol/ml); B) Blutprobe eines Probanden vor DEHP-d4-Einnahme; C) Blutprobe eines Probanden 3 h nach DEHP-d4-Einnahme

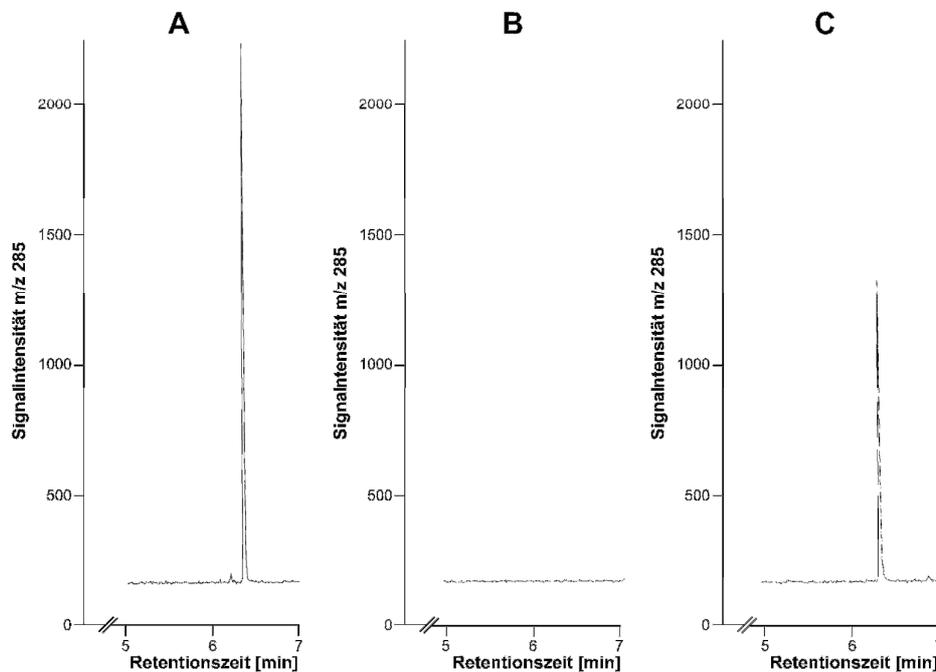


Abbildung 3: Repräsentative GCMSD-Chromatogramme des MEHP-d4-Derivats aus Blutproben. A) Kontrollblut versetzt mit MEHP-d4 (0,9 nmol/ml); B) Blutprobe eines Probanden vor DEHP-d4-Einnahme; C) Blutprobe eines Probanden 3 h nach DEHP-d4-Einnahme

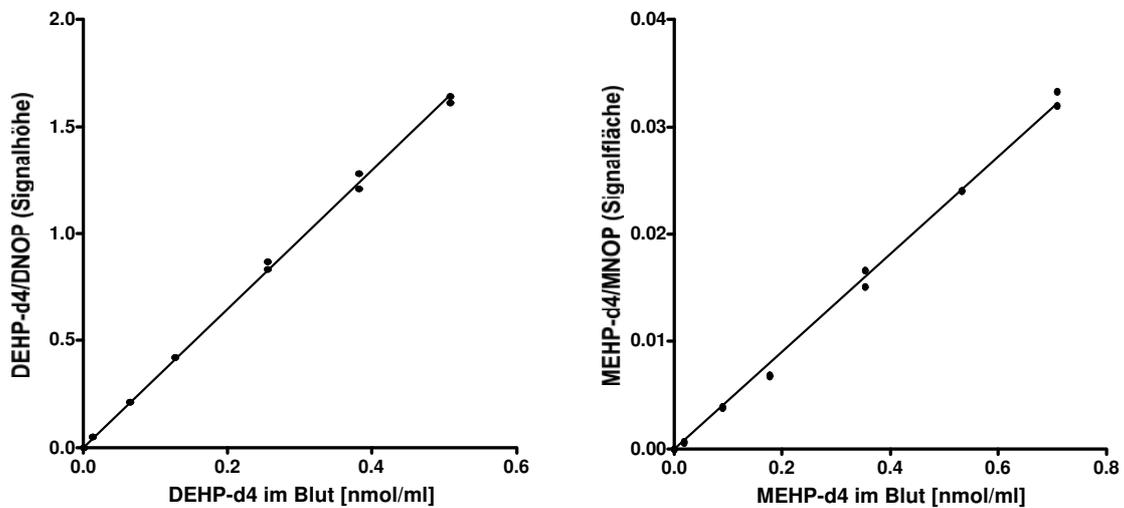


Abbildung 4: Linearität der DEHP-d4- und MEHP-d4-Methode. Symbole: jeweils Doppelbestimmungen. Lineare Regressionen: DEHP-d4 $r^2 = 0,999$; MEHP-d4 $r^2 = 0,997$

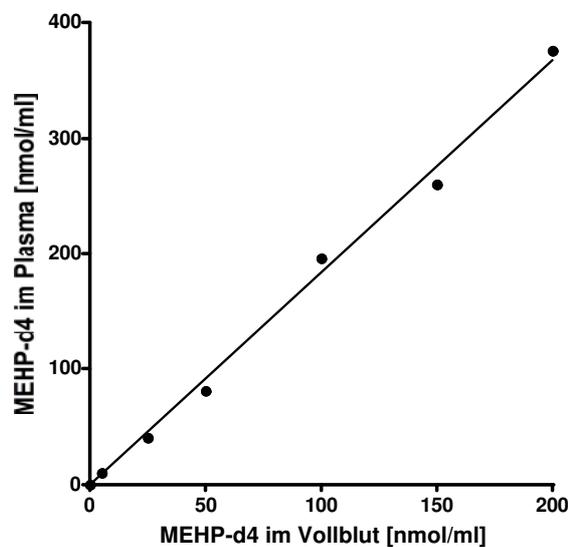


Abbildung 5: Verhältnis der Konzentrationen von MEHP-d4 im Plasma und Vollblut nach Zugabe zum Vollblut. Symbole: Mittelwerte aus Doppelbestimmungen; lineare Regression: $y = 1,84 \cdot x$

2.2.2 MEHP-d4- β -Glukuronid im Vollblut

MEHP-d4- β -Glukuronid wurde nicht direkt gemessen, sondern nach Glukuronidabspaltung mit β -Glukuronidase als Differenz zwischen dem erhaltenen Gesamt-MEHP-d4 und dem zuvor gemessenen freien MEHP-d4 berechnet. In Vorversuchen

war gezeigt worden, dass die β -Glukuronidase das MEHP-d4- β -Glukuronid vollständig umsetzt. Hierzu wurde zuerst die Aktivität des Enzyms in Anlehnung an Brandt et al. (1975) mit 4-Methylumbelliferyl- β -Glukuronid als Substrat (20 nmol/ml Blut) und 4-Methylumbelliferon als fluoreszierendem Produkt in 2-ml-Blutproben getestet. Die Reaktion wurde mit 5 μ l unverdünnter β -Glukuronidase-Lösung gestartet. Die Fluoreszenzmessungen (360 \rightarrow 440 nm) wurden mit einem Fluorimeter BioTek Synergy 2 (BioTek, Bad Friedrichshall) durchgeführt. Als Eichsubstanz diente 4-Methylumbelliferon. Die Reaktion war nach einstündiger Inkubation im Blut bei 37 °C vollständig (105 % des erwarteten Wertes). Daraufhin wurde MEHP-d4- β -Glukuronid als Substrat (22 nmol/ml Blut) verwendet und nach obiger Methode freies MEHP-d4 als Produkt bestimmt. In einen 2-ml-Eppendorfcup wurden 1,95 ml Blut pipettiert und 50 μ l einer MEHP-d4- β -Glukuronid-Lösung (880 μ mol/l) in Ammoniumacetatpuffer (1 mol/l, pH 5) zugegeben. Die Reaktion wurde mit 5 μ l unverdünnter β -Glukuronidase-Lösung gestartet. Auch in diesem Fall war die Reaktion nach einstündiger Inkubation im Blut bei 37 °C vollständig (105 % des erwarteten Wertes). Mit diesem Verfahren wurde daher die Konzentration an Gesamt-MEHP-d4 in den Blutproben der Probanden bestimmt.

2.2.3 MEHP-d4, 5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4, 2cx-MMHP-d4 und 5cx-MEPP in Plasma und Urin

Als Basis der Entwicklung der Messmethoden dient ein Methode, die kürzlich vom Sachgebiet Chemikaliensicherheit/Toxikologie des LGL im Rahmen eines Projektes publiziert wurde (Seckin et al. 2009). In diese Methode, die für den Nachweis von Metaboliten des Di-(n-butyl)phthalat und Di-isobutylphthalat im Urin unter Verwendung eines Flüssigchromatographen mit Tandem-Massenspektrometer (LC-MS/MS) und On-Line-Säulenschaltung entwickelt worden war, wurden die Metabolite des DEHP integriert. Die Nachweisgrenzen lagen für alle Metabolite in dem Bereich, die für Di-(n-butyl)phthalat und Di-isobutylphthalat bestimmt wurden. Vorab wurden sowohl die Urinals als auch die Plasmaproben mit 425 Units an Glukuronidase (*Escherichia coli*-K12 von Roche Biomedical, Mannheim, Deutschland) vorbehandelt, damit der Gesamtgehalt an dem jeweiligen Metabolit bestimmt werden konnte. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde mittels unterschiedlicher Inkubationszeiten ermittelt.

Als Probenvorbereitungsschritte wird eine Fällung der Proteine mit Acetonitril durchgeführt und der Überstand mit Puffer versetzt, so dass sichergestellt ist, dass die Metabolite des DEHP auf der „Trap“-Säule retiniert werden.

Alle DEHP-Metabolite und deren Isotopen markierten Analoga MEHP, 5-OH-MEHP, 5-oxo-MEHP, 2cx-MMHP und 5cx-MEPP konnten erfolgreich in die bestehende Methode integriert werden. Es zeigte sich jedoch, dass die beiden Säuren (2cx-MMHP und 5cx-MEPP) unter den gewählten Bedingungen chromatographisch nicht getrennt werden konnten. Somit wurde pro Analysenprobe immer die Summe beider Metabolite bestimmt.

Anmerkung: Da sowohl $^{13}\text{C}_4$ - als auch die D4-markierten Standards die Isotopen markierten C- bzw. H-Atome im/am Benzolring enthielten, konnten für die Quantifizierung von MEHP-d4, und 5oxo-MEHP-d4 die im Labor verfügbaren $^{13}\text{C}_4$ -markierten Standards genutzt werden.

Abbildung 6 zeigt ein typisches Chromatogramm einer Urinprobe eines Probanden nach Einnahme von DEHP-d4. Wie bereits angesprochen, ist eine chromatographische Trennung von 2cx-MMHP-d4 und 5cx-MEPP-d4 nicht möglich. Da die Isomere auch massenspektrometrisch nicht unterschieden werden können, ist die Zuordnung der beiden Signale für 2cx-MMHP-d4 und 5cx-MEPP-d4 willkürlich. Die Auswertung erfolgte daher als Summe für beide Isomere. Abbildung 7 zeigt entsprechend ein typisches Chromatogramm einer Plasmaprobe eines Probanden nach Einnahme von DEHP-d4.

In Abbildung 8 ist eine reine Wasserprobe gezeigt, die vor und nach Injektionen von Eich- bzw. Urin-/Plasmaproben vermessen werden. Damit stellt man sicher, dass keine Artefakte bzw. Verschleppung von einem zum nächsten Analysenlauf geschehen. Man sieht, dass nur bei MEHP ein kleines Signal nachweisbar ist. Dies deutet daraufhin, dass geringe Mengen an DEHP als Verunreinigung im System freigesetzt werden und dieses DEHP zu MEHP hydrolysiert wird. Da MEHP als „interner“ Standard in zu dieser Konzentration vergleichsweise hoher Menge zugeben wird, kann diese geringe Verunreinigung vernachlässigt werden. Es bestätigt aber nochmals anschaulich, dass es gerechtfertigt war nicht DEHP sondern DEHP-d4 an die Probanden zu verabreichen.

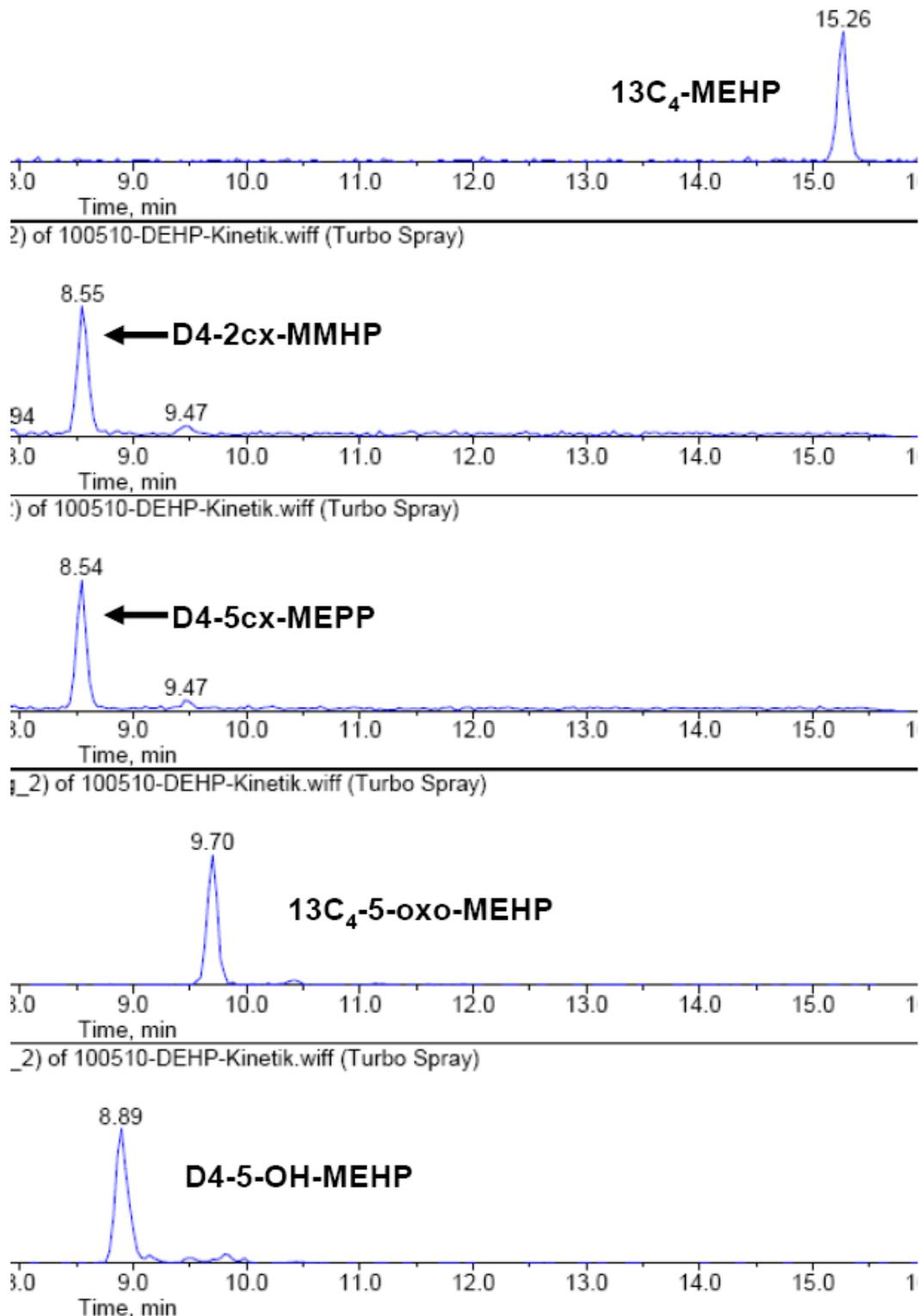


Abbildung 6: Reale Urinprobe 6 Stunden nach Einnahme von DEHP-d4. Achtung: 2cx-MMHP-d4 und 5cx-MEPP-d4 können nicht getrennt werden (siehe Text)

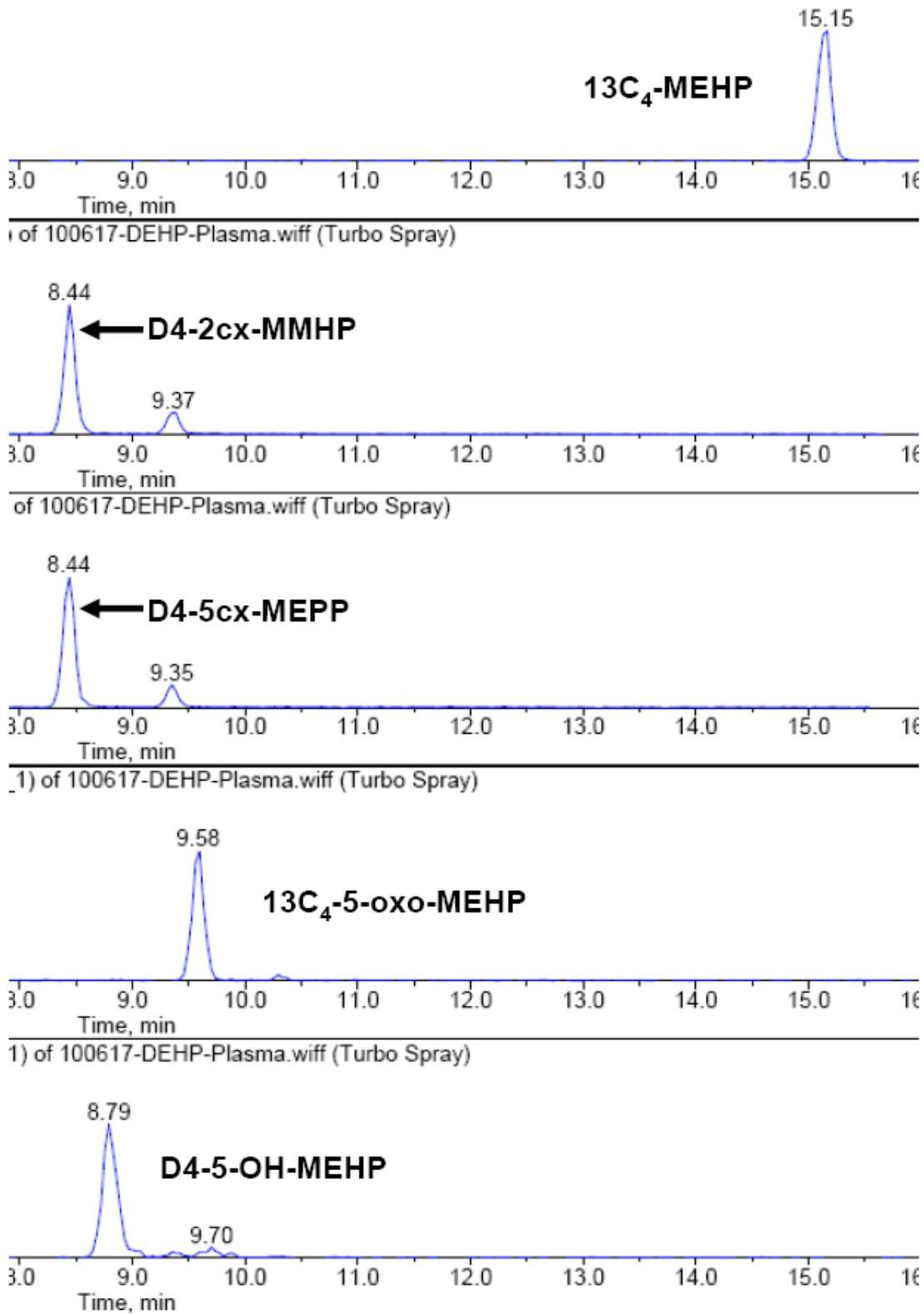


Abbildung 7: Reale Plasmaprobe 4 Stunden nach Einnahme von DEHP-d4. Achtung: 2cx-MMHP-d4 und 5cx-MEPP-d4 können nicht getrennt werden

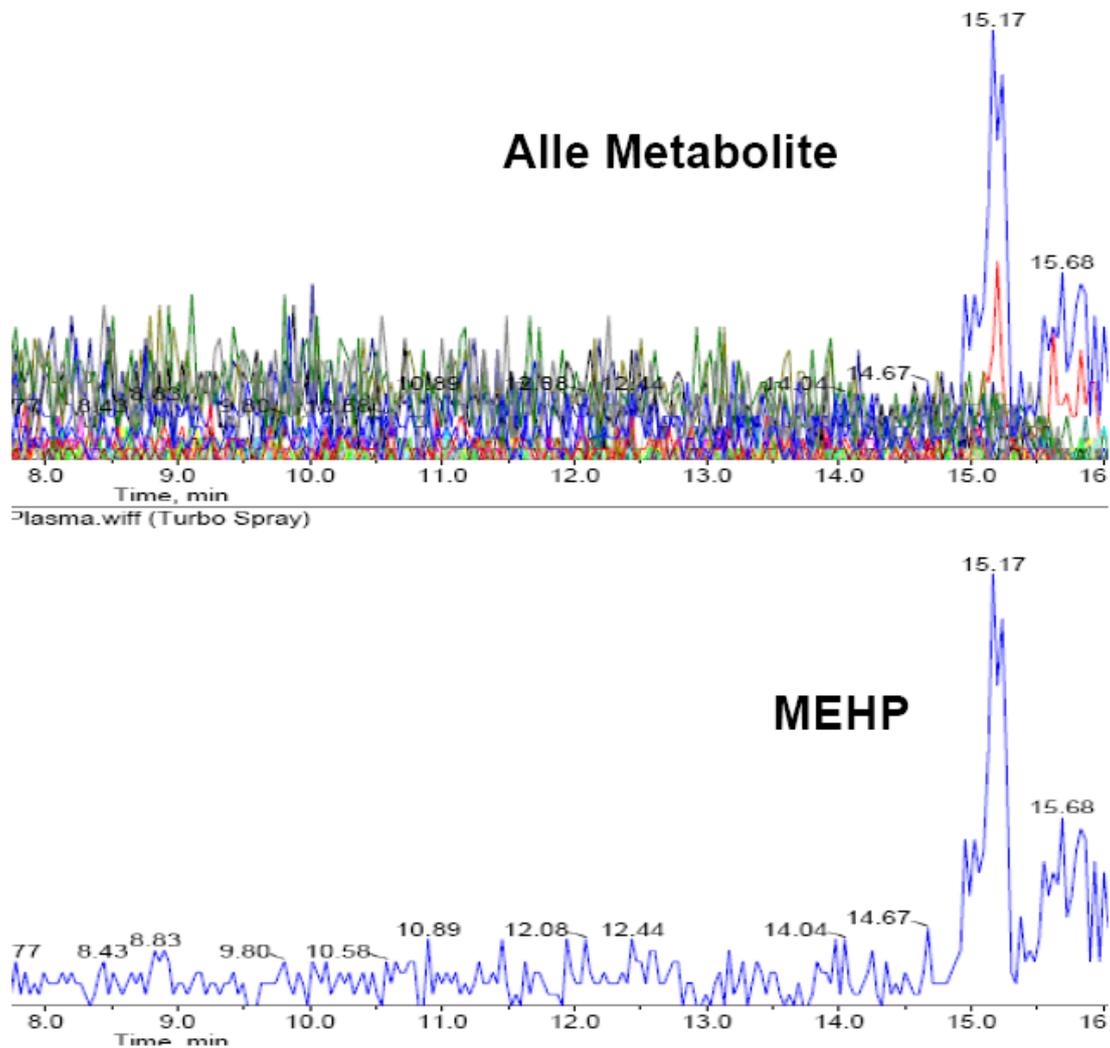


Abbildung 8: Wasserprobe mit geringen Mengen an MEHP als „Verunreinigung“

2.2.4 Auswahl der Probanden, Durchführung der Exposition sowie Probennahmen

Vier erwachsene Probanden wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: gesund, männlich, großes Alters- und Körpergewichtsspektrum. Die Probanden waren über die Abläufe der Studie und zur Toxikologie von DEHP ausführlich schriftlich und mündlich informiert worden. Der Studienablauf war von der Ethikkommission der Landesärzte-

kammer Bayern genehmigt worden (Entscheid vom 16.2.2009, Nr. 08104). Ein positives Votum des Datenschutzbeauftragten lag zum Studienbeginn gleichfalls vor.

Direkt vor der DEHP-d4-Einnahme wurde durch Ultraschallbehandlung und kräftiges Schütteln eine 2-ml-Emulsion von 120 mg DEHP-d4 in 70 %iger wässriger Saccharoselösung hergestellt. Gegen 9 h morgens nahm jeder Proband von dieser Emulsion 0,8 ml pro 75 kg Körpergewicht mittels einer 1-ml-Einmalspritze intraoral zu sich. Die genaue DEHP-d4-Dosis wurde anschließend durch Rückwiegen ermittelt. Relevante Daten zu den Probanden, den DEHP-d4-Dosen und Einnahmezeiten sind in Tabelle 1a zusammengefasst. Tabelle 1b gibt die Zeiten von Frühstück und Mittagessen wieder und informiert über die aufgenommenen Speisen.

Proband	Körpergewicht [kg]	Alter [J]	DEHP-d4-Dosis [mg/kg]	Uhrzeit
1	59	49	0.64	9:05
2	76	28	0.65	9:20
3	88	61	0.66	9:02
4	105	39	0.62	9:00

Proband	Frühstück		Mittagessen	
	Uhrzeit	Speisen	Uhrzeit	Speisen
1	7:00	Käse- und Wurstbrot	11:00	Käsebrötchen, Buttermilch
2	9:05	Käsebrötchen mit Butter	12:30	Fisch mit Kartoffelsalat
3	8:50	Käse- und Wurstbrot mit Butter	11:00	Grüner Salat mit viel Öl, Buttermilch
4	8:50	2 Käsetoasts mit Butter	12:00	3 Käsebrötchen

Tabelle 1: Relevante Daten zu Probanden, a) DEHP-d4-Dosen und Einnahmezeiten b) Frühstück und Mittagessen

Zur Blutprobenentnahme (jeweils 11-12 ml mittels heparinierter 10-ml-Einmalspritzen) wurde ein Venenverweilkatheter in einen Unterarm gelegt. Bei Proband 1 wurden zu folgenden Zeitpunkten Blutproben entnommen: 15 min vor Einnahme, direkt nach Einnahme und dann 15, 30 und 45 min sowie 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 und 24,0 h nach Einnahme. Nach Kenntnis der Messdaten von Proband 1 wurden bei den Probanden 2, 3 und 4 weitere Blutproben zu folgenden zusätzlichen Zeitpunkten

entnommen: 5,0, 7,0 und 9,0 h nach Einnahme. Von jeder Blutprobe wurden 6,5 ml in Eis gekühlt und danach zur Plasmagewinnung 10 min lang bei 4 °C mit 4000 x g zentrifugiert. Ca. 3,5 ml des Überstands (Plasma) wurden bei -20 °C eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Das restliche Vollblut (ca. 5 ml) wurde sofort für die Bestimmung von DEHP-d4, freiem MEHP-d4 und Gesamt-MEHP-d4 aufgearbeitet. Von jeder Blutprobe wurden Doppelbestimmungen vorgenommen. Für jede Messreihe wurde eine Einpunktkalibrierung mit Probandenblut, entnommen vor der DEHP-d4-Einnahme, durchgeführt. Urinproben wurden zu folgenden Zeitpunkten von allen Probanden gesammelt: direkt nach der DEHP-d4-Einnahme und dann 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42 sowie 46 h nach Einnahme. Die Probanden 2 und 4 sammelten zusätzliche Urinproben 1,5 bzw. 1 h vor der Einnahme. Von jeder Probe wurden der pH-Wert und das Volumen gemessen. Dann wurden sie in Aliquots von 1, 10 und, soweit möglich, 100 ml aufgeteilt, bei -20 °C eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3 Ergebnisse

3.1 DEHP-d4, MEHP-d4 und MEHP-d4- β -Glukuronid im Vollblut von Probanden nach oraler Einnahme von DEHP-d4

Die Ergebnisse der Bestimmung von DEHP-d4, freiem MEHP-d4, Gesamt-MEHP-d4 und MEHP-d4- β -Glukuronid in den Blutproben der Probanden sind in Abbildung 9 dargestellt. Sowohl für die Ausgangssubstanz als auch für die Metaboliten zeigten sich Probanden-charakteristische, mehrgipflige Konzentrations-Zeitverläufe. DEHP-d4 war bis zu 1 h nach Einnahme im Blut unterhalb der Nachweisgrenze, während MEHP-d4 bereits bei der ersten Messung (15 min nach DEHP-d4-Einnahme) im Blut auftrat, mit einem frühen Maximum nach 30 bis 45 min. 24 h nach der DEHP-d4-Einnahme war kein DEHP-d4 mehr nachweisbar. Die MEHP-d4-Konzentrationen lagen zu diesem Zeitpunkt an oder unter der Nachweisgrenze. Die bei jedem Probanden gefundenen großen Schwankungen der Konzentrations-Zeitverläufe lassen zwingend schließen, dass sich die systemische Belastung aus Einzelmessungen nicht zuverlässig ermitteln lässt.

Mittels der Trapezmethode wurden die Flächen unter den jeweiligen Konzentrations-Zeitkurven berechnet und auf die DEHP-d4-Dosis pro kg Körpergewicht normiert ($AUC_{0-24\text{ h}}$, Tabelle 2). Als das Integral über die Zeit spiegelt die $AUC_{0-24\text{ h}}$ die systemische Belastung innerhalb von 24 h wieder. Die $AUC_{0-24\text{ h}}$ -Werte zeigen, dass die systemische Belastung mit DEHP-d4 immerhin ein Drittel derjenigen mit Gesamt-MEHP-d4 beträgt. Gesamt-MEHP-d4 setzt sich zusammen aus $64 \pm 6,0\%$ freiem und $36 \pm 6,1\%$ glukuronidiertem MEHP-d4 ($n = 4$). Zusammenhänge zwischen den $AUC_{0-24\text{ h}}$ der einzelnen Stoffe und dem Alter (28 bis 61 Jahre) oder dem Körpergewicht (59 bis 105 kg) der Probanden wurden nicht gefunden.

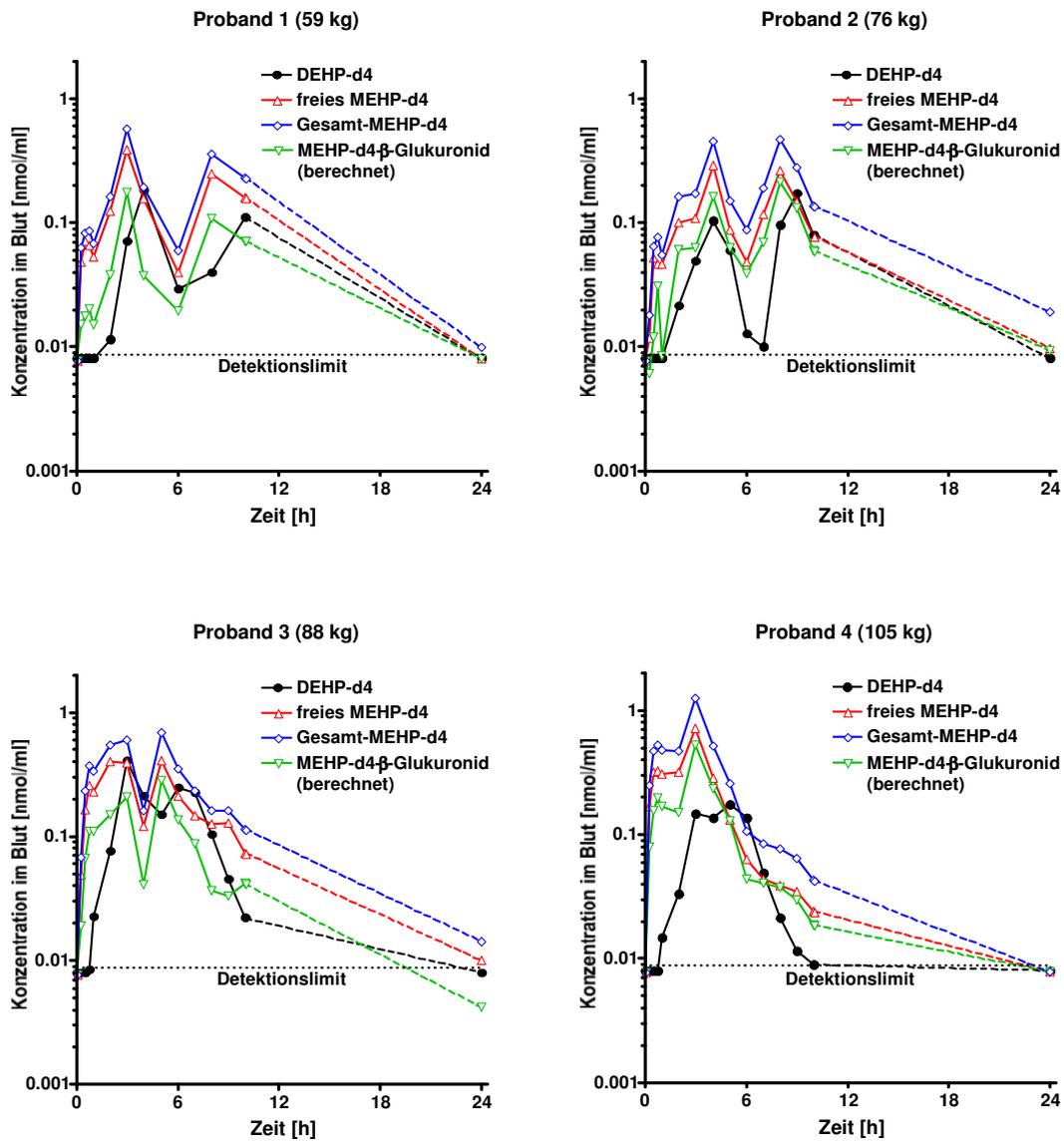


Abbildung 9: Konzentrations-Zeitverläufe von DEHP-d4 und MEHP-d4 im Vollblut der Probanden nach der Einnahme von etwa 640 µg DEHP-d4 pro kg Körpergewicht. Symbole: Mittelwerte von Doppelbestimmungen

Proband	AUC _{0-24 h} [nmol*h/ml pro mmol DEHP-d4/kg Körpergewicht]			
	DEHP-d4	Freies MEHP-d4	MEHP-d4-β-Glukur.	Gesamt-MEHP-d4
1	847	1674	684	2363
2	679	1129	802	1930
3	974	1664	849	2513
4	501	1410	989	2397
MW ± STA	750 ± 205	1470 ± 260	830 ± 130	2300 ± 255

Tabelle 2: Auf die DEHP-d4-Dosis normierte Flächen unter den Konzentrations-Zeitkurven von DEHP-d4 und MEHP-d4 im Vollblut (AUC_{0-24 h}) [nmol*h/ml pro mmol DEHP-d4/kg Körpergewicht]; MW: Mittelwert; STA: Standardabweichung

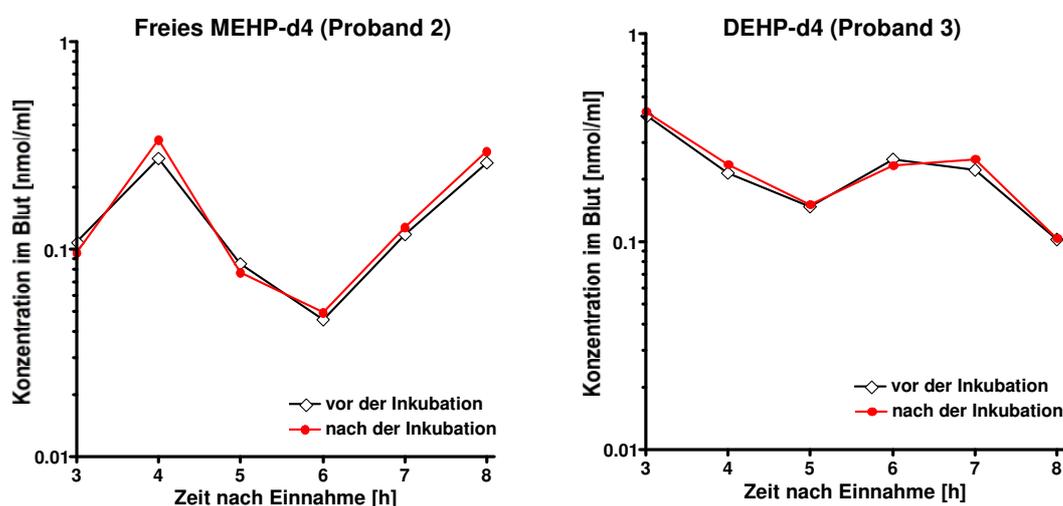


Abbildung 10: Konzentrationen von DEHP-d4 vor und nach einstündigen Inkubationen von Blutproben mit β-Glukuronidase sowie von freiem MEHP-d4 vor und nach einstündigen Inkubationen von Blutproben ohne β-Glukuronidase. Symbole: Mittelwerte von Doppelbestimmungen

In Kontrollmessungen wurde nachgewiesen, dass die Erhöhung der MEHP-d4-Konzentration im Blut während der einstündigen Inkubation mit β-Glukuronidase tatsächlich auf der Hydrolyse von MEHP-d4-β-Glukuronid beruhte und nicht auf einer Esteraseaktivität im Blut. Wie in Abbildung 10 beispielhaft gezeigt, blieb die Konzentration von DEHP-d4 während der Inkubation konstant; in Abwesenheit von β-Glukuronidase veränderte sich die Konzentration von freiem MEHP-d4 nicht.

Um eine allgemeine kinetische Interpretation zu ermöglichen, wurden die Konzentrations-Zeitverläufe von DEHP-d4 und Gesamt-MEHP-d4 aller Probanden

gemittelt (Abbildung 11A). Die Streuungen zu den einzelnen Zeitpunkten sind bei beiden Substanzen sehr groß. Im Gegensatz zu DEHP-d4 wiesen die Mittelwerte von Gesamt-MEHP-d4 einen leicht oszillierenden Verlauf auf, was auf einen enterohepatischen Kreislauf für das MEHP-d4- β -Glukuronid (Molekulargewicht 460) hinweisen könnte (Abbildung 11B). Aus Anpassungen von Exponentialfunktionen an die Mittelwerte im Zeitraum zwischen 3 bis 24 h (Abbildung 11B) ergab sich für DEHP-d4 eine einphasige Elimination und für Gesamt-MEHP-d4 eine zweiphasige Elimination. Die Halbwertszeiten zeigen (Tabelle 3), dass die schnellere Elimination von Gesamt-MEHP-d4 unabhängig, die langsamere abhängig von der Elimination des metabolischen Vorläufers DEHP-d4 ist. Diese Eliminationshalbwertszeiten erlauben für eine gegebene DEHP-Dosis die Abschätzung der mittleren systemischen Belastung mit DEHP und MEHP.

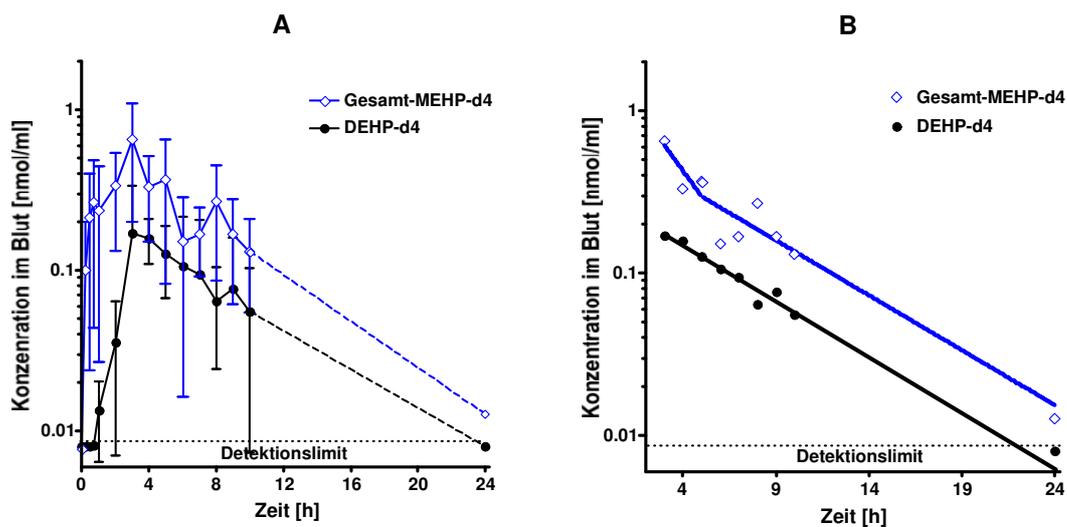


Abbildung 11: Gemittelte Konzentrations-Zeitverläufe von DEHP-d4 und Gesamt-MEHP-d4 im Vollblut aller Probanden nach der Einnahme von DEHP-d4. A) Symbole: Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Messwerte aus Abbildung 6 ($n = 4$); B) Symbole: Mittelwerte zur Bestimmung der Halbwertszeiten von DEHP-d4 und Gesamt-MEHP-d4; Linien: Anpassung von Exponentialfunktionen an die Mittelwerte

	DEHP-d4	Gesamt-MEHP-d4 Phase 1	Gesamt-MEHP-d4 Phase 2
$t_{1/2}$ [h]	4,4	1,9	4,4

Tabelle 3: Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) von DEHP-d4 und Gesamt-MEHP-d4 im Vollblut, berechnet aus den Steigungen der Exponentialfunktionen in Abbildung 11

3.2 MEHP-d4, 5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4 und 2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4 im Plasma von Probanden nach oraler Einnahme von DEHP-d4

In den Abbildungen 12-15 sind die Blutplasma-Zeitkurven für die 4 Probanden und die 5 untersuchten Metaboliten dargestellt. Im Plasma aller Probanden konnte zum Zeitpunkt 0 Minuten (Einnahme des DEHP-d4) keiner der 5 Metabolite des DEHP-d4 nachgewiesen werden. Bereits nach 15 Minuten ließen sich die meisten Metabolite im Plasma nachweisen. Nach 30 Minuten waren alle Metabolite im Blutplasma nachweisbar. Außer für einen Probanden liefern alle Metaboliten 2 Maxima im Bereich von 3-4 h und 6-8 h. Nach 24 h konnten alle Metabolite in allen Proben noch nachgewiesen werden. Die Gehalte lagen nach 24 h zwischen ca. 3 µg/l für 5oxo-MEHP-d4 und >25 µg/l für die Summe aus 2cx-MMHP-d4 und 5cx-MEPP-d4. Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, dass 5OH-MEHP-d4 und 5oxo-MEHP-d4 bei allen Probanden einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf aufweisen und auch die Konzentrationen beider Metabolite im Plasma sich sehr ähneln.

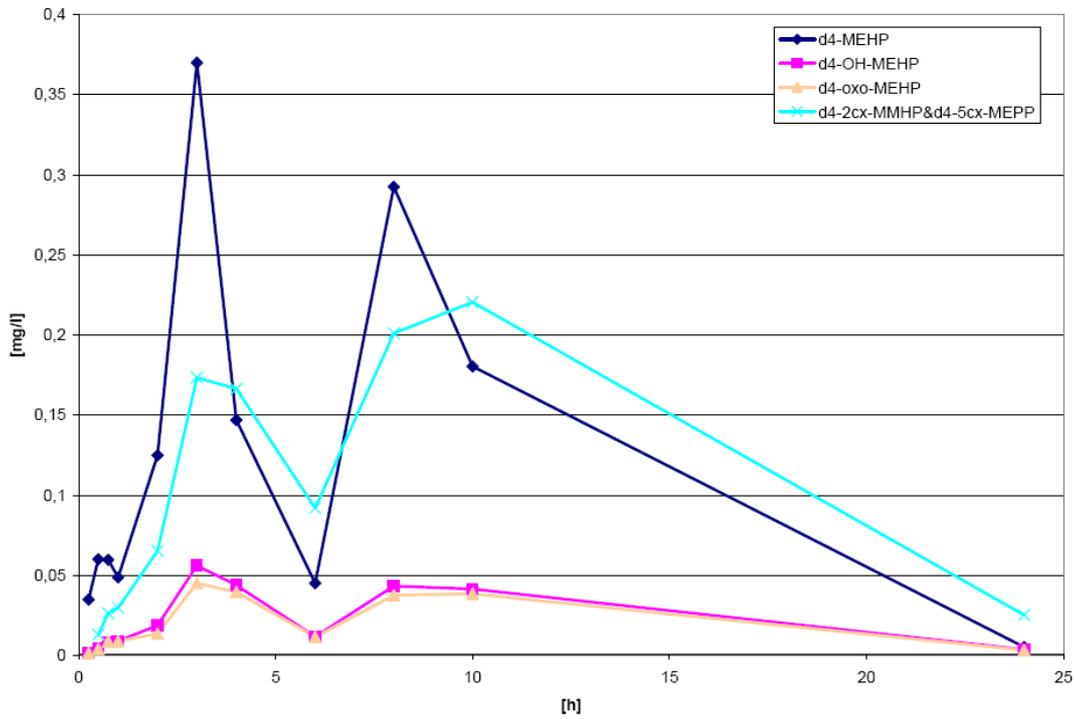


Abbildung 12: Blutplasmakurven von DEHP-d4-Metaboliten bei Proband 1 nach Einnahme von 0,64 mg DEHP-d4/kg

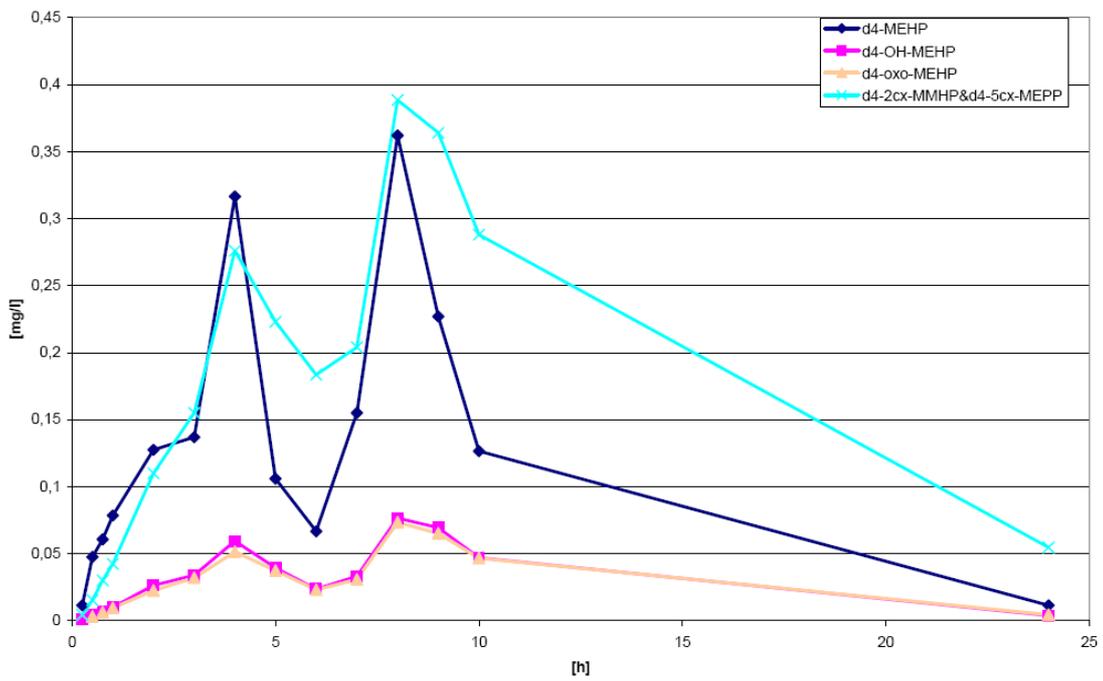


Abbildung 13: Blutplasmakurven von DEHP-d4-Metaboliten bei Proband 2 nach Einnahme von 0,65 mg DEHP-d4/kg

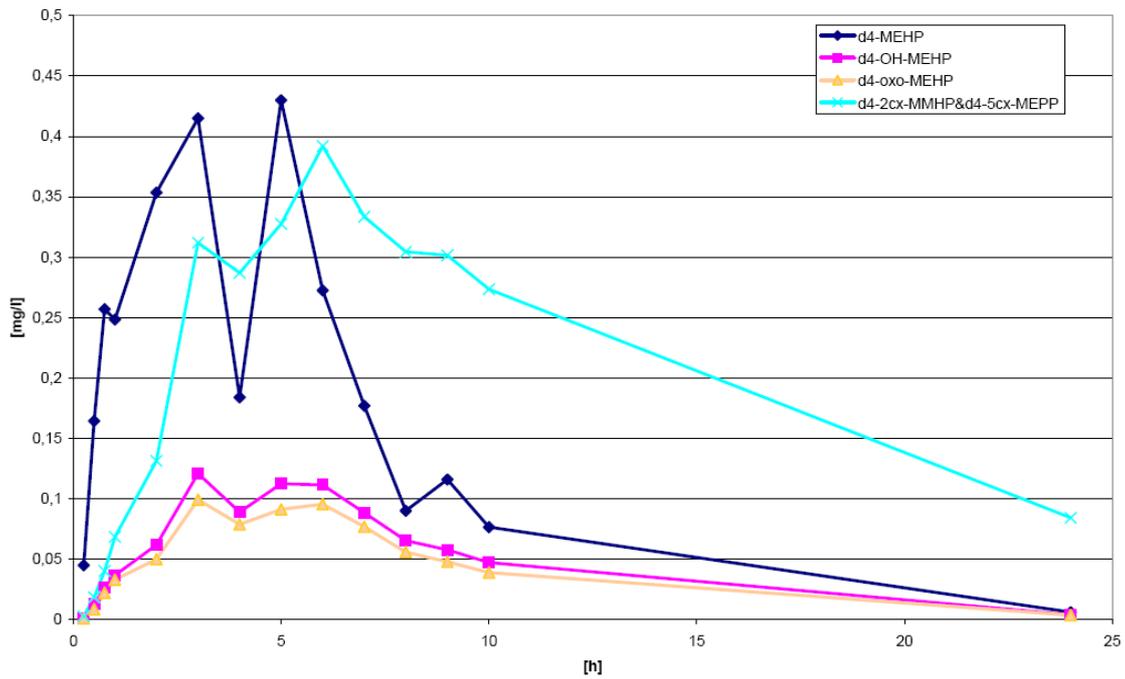


Abbildung 14: Blutplasmakurven von DEHP-d4-Metaboliten bei Proband 3 nach Einnahme von 0,66 mg DEHP-d4/kg

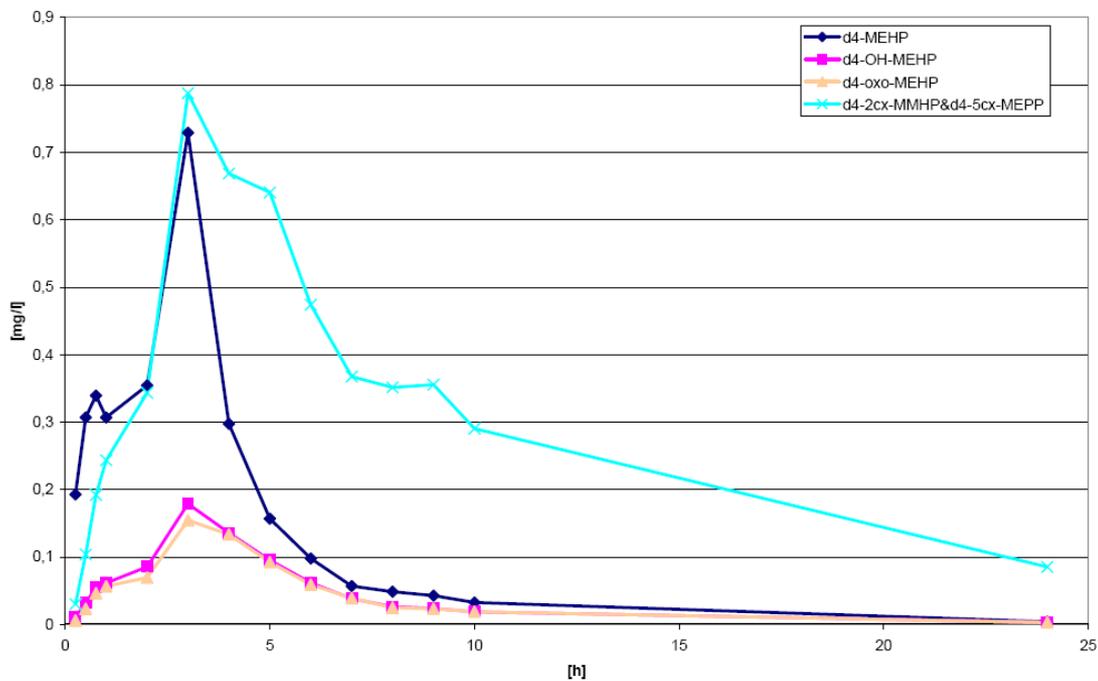


Abbildung 15: Blutplasmakurven von DEHP-d4-Metaboliten bei Proband 4 nach Einnahme von 0,62 mg DEHP-d4/kg

Als Maß für die systemische Belastung innerhalb von 24 h wurde mittels der Trapezmethode die Flächen unter den jeweiligen Konzentrations-Zeitkurven berechnet und auf die DEHP-d4-Dosis pro kg Körpergewicht normiert ($AUC_{0-24\text{ h}}$, Tabelle 4). Die $AUC_{0-24\text{ h}}$ -Werte zeigen, dass im Mittel die systemische Belastung durch 5OH-MEHP-d4 und 5oxo-MEHP-d4 etwas weniger als ein Drittel derjenigen durch MEHP-d4 beträgt. Im Vergleich zum MEHP-d4-Wert liegt der Mittelwert der systemischen Belastung durch 2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4 fast doppelt so hoch.

Proband	$AUC_{0-24\text{ h}}$ [nmol*h/ml pro mmol DEHP-d4/kg Körpergewicht]			
	MEHP-d4	5OH-MEHP-d4	5oxo-MEHP-d4	2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4
1	6400	1270	1150	6270
2	5670	1550	1500	9240
3	6370	2310	1950	10480
4	5360	1800	1690	14410
MW ± STA	5760 ± 520	1800 ± 440	1660 ± 340	10840 ± 3370

Tabelle 4: Auf die DEHP-d4-Dosis normierte Flächen unter den Konzentrations-Zeitkurven ($AUC_{0-24\text{ h}}$) von Gesamt-MEHP-d4, 5-OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4 und 2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4 im Plasma; MW: Mittelwert; STA: Standardabweichung

Die gemittelten Konzentrations-Zeitverläufe im Plasma zeigen für MEHP-d4 wie im Vollblut einen deutlich erkennbaren oszillierenden Verlauf, schwächer ausgeprägt auch für 5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4 und 2cx-MMHP-d4+5cx-MEPP-d4 (Abbildung 11B). Die Streuungen zu den einzelnen Zeitpunkten sind bei allen Metaboliten sehr groß. Aus Anpassungen von Exponentialfunktionen an die Mittelwerte im Zeitraum zwischen 3 bis 24 h (Abbildung 16B) ergab sich für MEHP-d4 eine zweiphasige Elimination, für die anderen Metaboliten jeweils eine einphasige Elimination. Die Halbwertszeiten zeigen (Tabelle 5) für MEHP-d4 sehr ähnliche Werte wie im Vollblut. Während sich die an der omega-1-Position der Hexylkette oxidierten 5OH-MEHP-d4 und 5oxo-MEHP-d4 kinetisch fast wie MEHP-d4 verhalten, zeigen die an der omega-Position der Ethyl- bzw. Hexylkette oxidierten 2cx-MMHP-d4 bzw. 5cx-MEPP-d4 ein leicht verzögertes Eliminationsverhalten.

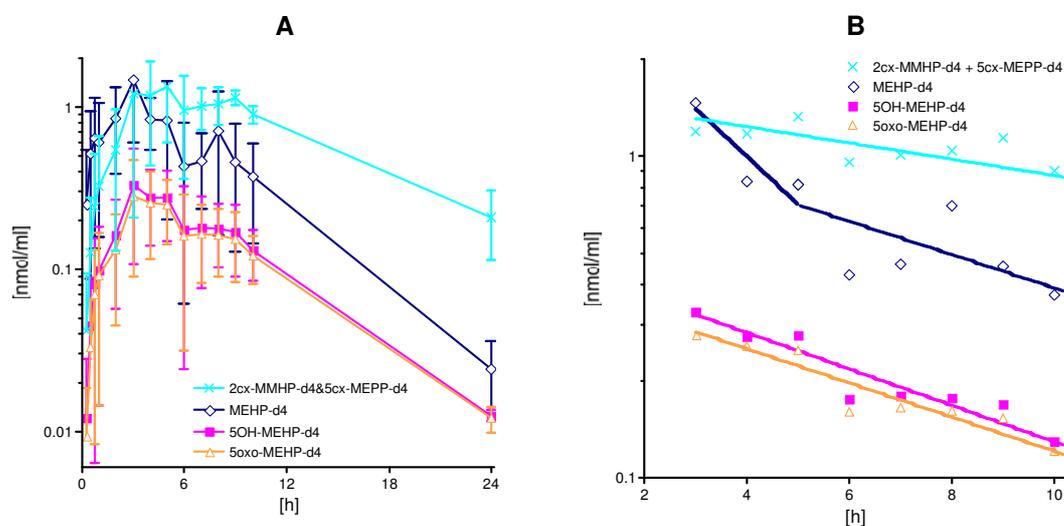


Abbildung 16: Gemittelte Konzentrations-Zeitverläufe von MEHP-d4, 5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4 und 2cx-MMHP-d4+5cx-MEPP-d4 im Plasma aller Probanden nach der Einnahme von DEHP-d4. A) Symbole: Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Messwerte aus den Abbildungen 12-15 ($n = 4$); B) Symbole: Mittelwerte zur Bestimmung der jeweiligen Halbwertszeiten; Linien: Anpassung von Exponentialfunktionen an die Mittelwerte

	MEHP-d4 Phase 1	MEHP-d4 Phase 2	5OH-MEHP-d4	5oxo-MEHP- d4	2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4
$t_{1/2}$ [h]	2,0	5,8	5,3	5,7	11,9

Tabelle 5: Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) von MEHP-d4, 5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4 und 2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4 im Plasma, berechnet aus den Steigungen der Exponentialfunktionen in Abbildung 16

Ein Vergleich der Bestimmung von Gesamt-MEHP-d4 im Blut mittels zweier sehr unterschiedlicher Verfahren – aus Blutplasma mit LC-MS/MS und aus Vollblut mit GCMSD – ergibt eine gute Übereinstimmung. Die Auftragung aller Messdaten im Plasma gegen diejenigen im Vollblut zeigt eine sehr gute lineare Beziehung (Abbildung 17) mit einer Steigung von 2,35, die dem Faktor Plasma-zu-Vollblut für Gesamt-MEHP-d4 entspricht. In Kapitel 2.2.1 wurde für freies MEHP-d4 ein Faktor Plasma-zu-Vollblut von 1,84 bestimmt (Abbildung 5). Für MEHP-d4- β -Glukuronid wird ein Faktor Plasma-zu-Vollblut von 2 postuliert (Annahme: kein Durchtritt durch die Zellmembran). Bei 64 % freiem MEHP-d4 und 36 % MEHP-d4- β -Glukuronid im Vollblut errechnet sich daraus

ein Faktor Plasma-zu-Vollblut für Gesamt-MEHP-d4 von 1,9 ($= 1,84 * 0,64 + 2 * 0,36$). Der über den Methodenvergleich gefundene Faktor von 2,35 ist nur 24 % höher.

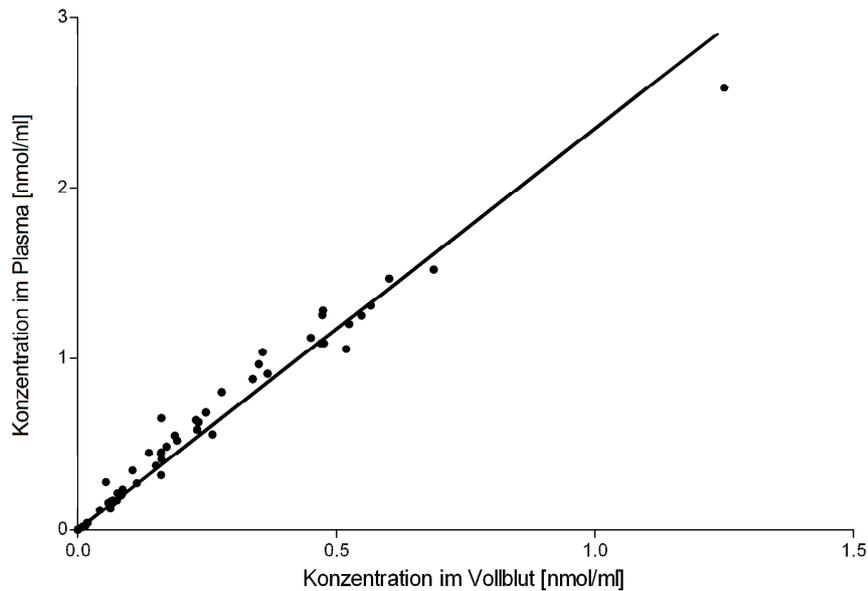


Abbildung 17: Vergleich der Methoden für die Bestimmung von Gesamt-MEHP-d4: Messungen im Blutplasma mittels LC-MS/MS vs. Messungen im Vollblut mittels GCMSD. Symbole: Messdaten von allen Probanden (n = 57); Linie: lineare Korrelation durch den Ursprung ($y = 2,35 * x$, $R^2 = 0,96$)

3.3 Ausscheidung von MEHP-d4, 5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4 und 2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4 im Urin von Probanden nach oraler Einnahme von DEHP-d4

Im Gegensatz zum Blutplasma findet man im Urin die niedrigsten Werte für MEHP-d4. Deutlich höhere Werte im Vergleich zum Blutplasma findet man für die beiden sekundären Metabolite 5OH-MEHP-d4 und 5oxo-MEHP-d4. Ähnlich wie beim Blutplasma zeigen sich auch bei den Urinkurven mehrere Maxima, am ausgeprägtesten bei ca. 4 und 8 h. Damit ergibt sich ein ähnliches Bild wie beim Blutplasma. In den folgenden Abbildungen 18-21 sind die Urin-Zeitkurven für die 4 Probanden und die 5 untersuchten Metaboliten dargestellt.

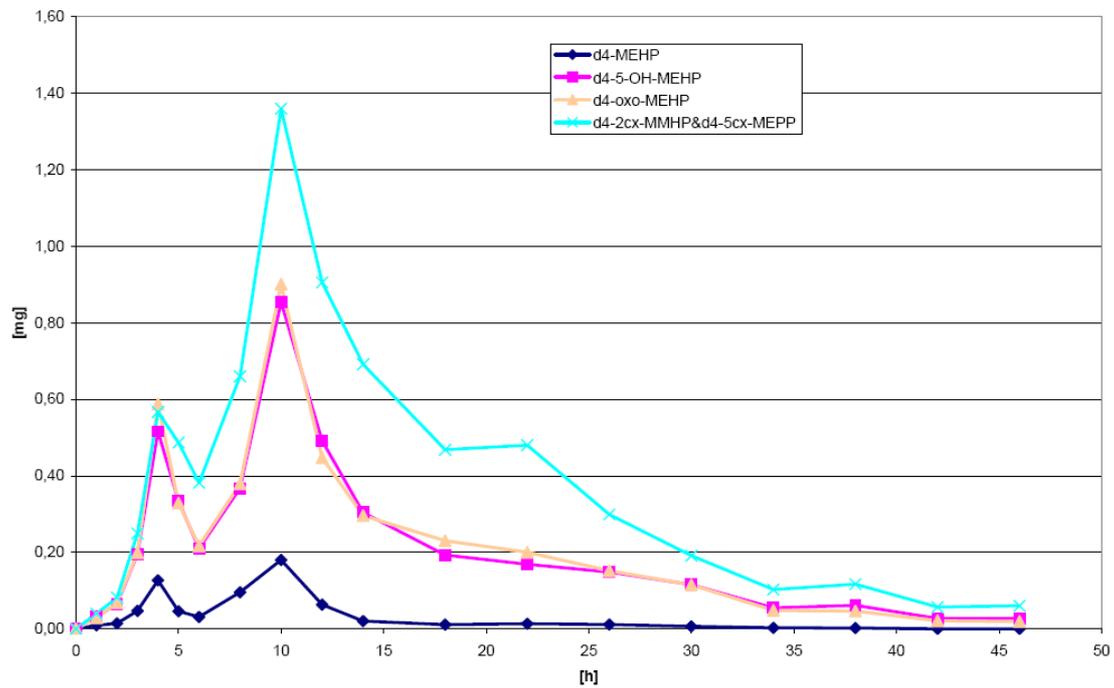


Abbildung 18: Zeitverlauf der Metabolitenausscheidung im Urin bei Proband 1 (59 kg KG) nach Einnahme von 37,8 mg DEHP-d4

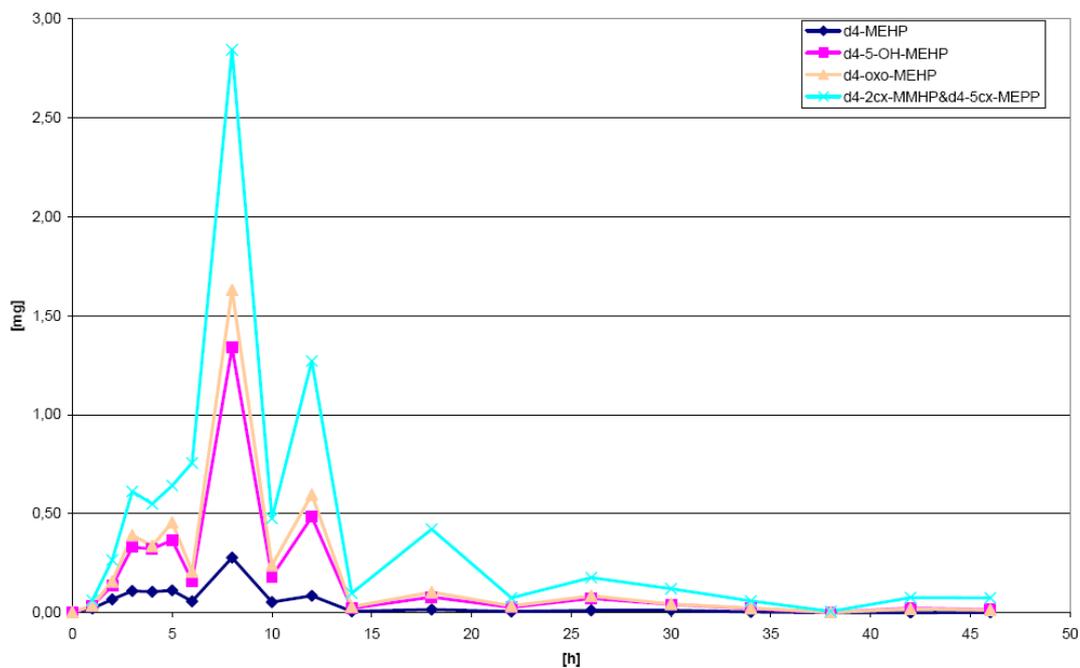


Abbildung 19: Zeitverlauf der Metabolitenausscheidung im Urin bei Proband 2 (76 kg KG) nach Einnahme von 49,4 mg DEHP-d4.

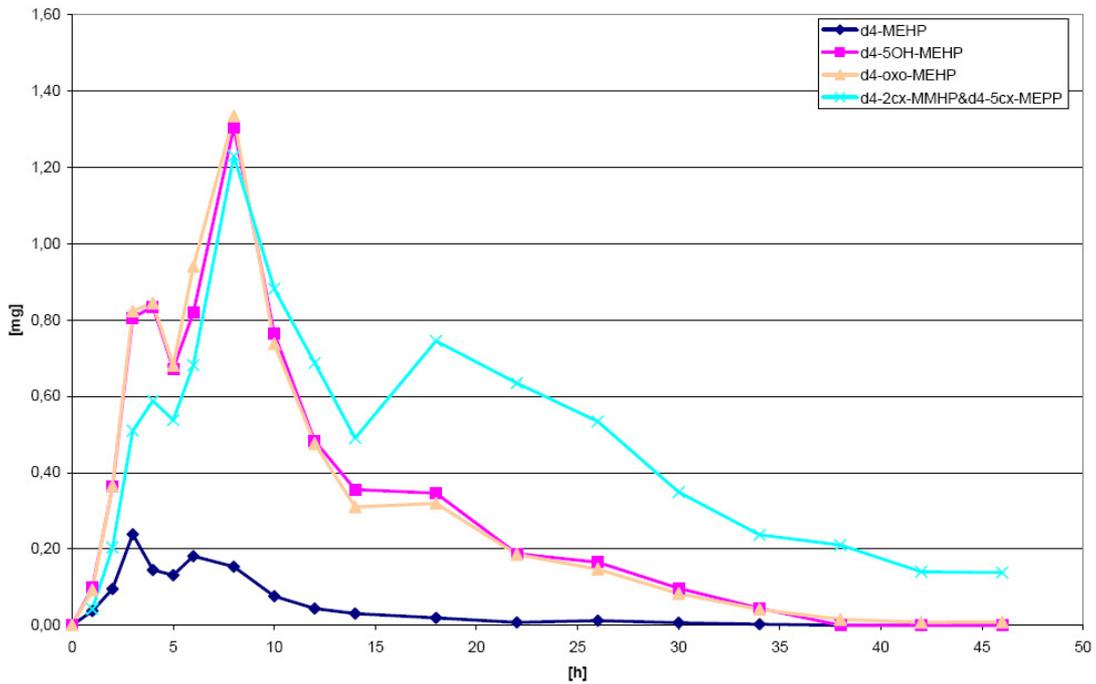


Abbildung 20: Zeitverlauf der Metabolitenausscheidung im Urin bei Proband 3 (88 kg KG) nach Einnahme von 58,1 mg DEHP-d4.

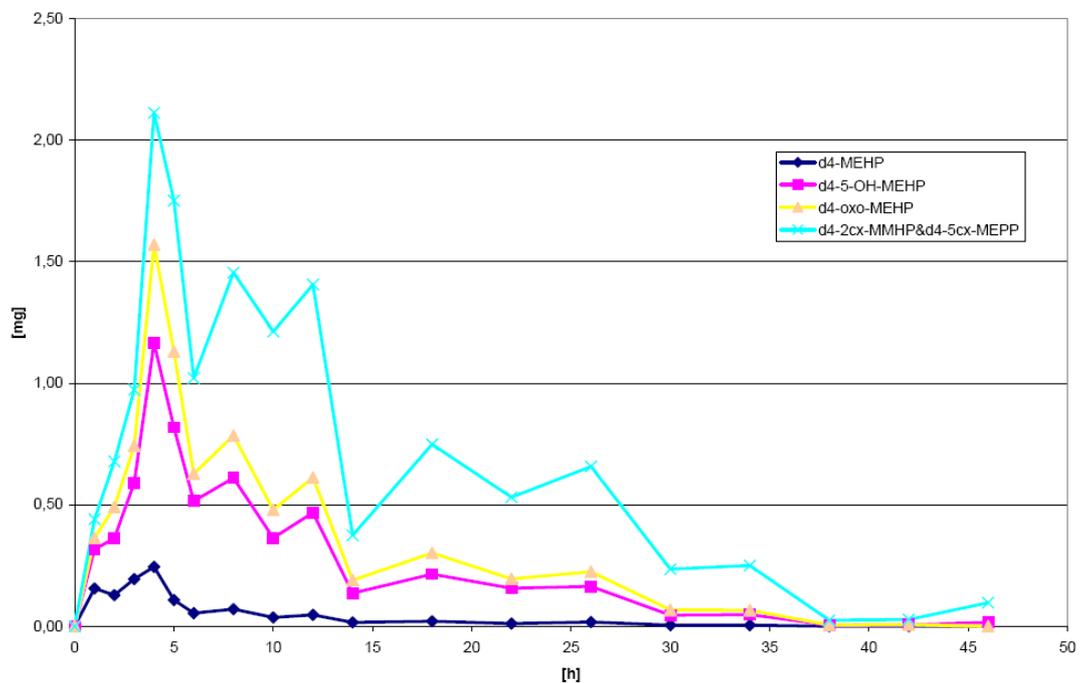


Abbildung 21: Zeitverlauf der Metabolitenausscheidung im Urin bei Proband 4 (105 kg KG) nach Einnahme von 65,1 mg DEHP-d4

Ähnlich wie im Blut zeigen die über alle Probanden gemittelten Konzentrations-Zeitverläufe im Urin (Abbildung 22A) zum Teil große Streuungen. Aus Anpassungen von Exponentialfunktionen an die Mittelwerte im Zeitraum zwischen 8 bis 46 h (Abbildung 22B) ergab sich für die Metaboliten jeweils eine einphasige Elimination. Die Halbwertszeiten (Tabelle 5) sind denjenigen im Plasma (Tabelle 3) sehr ähnlich.

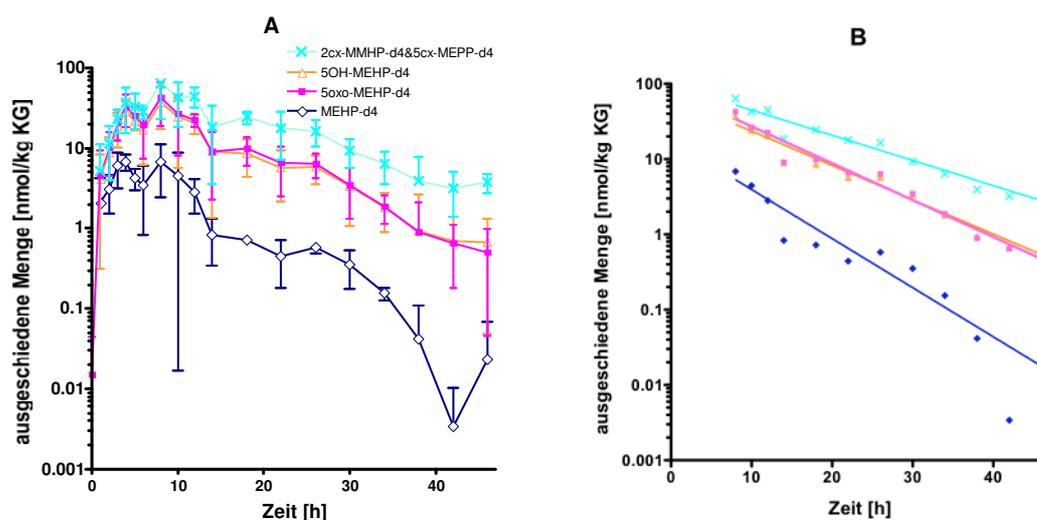


Abbildung 22: Gemittelte Zeitverläufe der Metabolitenausscheidung im Urin aller Probanden nach der Einnahme von DEHP-d4. A) Symbole: Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Messwerte aus den Abbildungen 12-15 ($n = 4$); B) Symbole: Mittelwerte zur Bestimmung der jeweiligen Halbwertszeiten; Linien: Anpassung von Exponentialfunktionen an die Mittelwerte

	MEHP-d4	5OH-MEHP-d4	5oxo-MEHP-d4	2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4
$t_{1/2}$ [h]	5,3	6,8	6,5	9,3

Tabelle 6: Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der Urinausscheidung von MEHP-d4, 5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4 und 2cx-MMHP-d4+5cx-MEPP-d4, berechnet aus den Steigungen der Exponentialfunktionen in Abbildung 22 B

In Tabelle 7 ist die Gesamtausscheidung aller Metabolite für die einzelnen Probanden zusammengefasst. Wie bereits aufgrund der Ausscheidungsverläufe zu erwarten, findet man die niedrigsten Gehalte für MEHP-d4, ähnliche für 5OH-MEHP-d4 und 5oxo-MEHP-d4 und die höchsten Werte für die Summe der beiden Carbonsäuren.

Proband	d4-MEHP [mg]	d4-5-OH-MEHP [mg]	d4-oxo-MEHP [mg]	d4-2cx-MMHP&d4-5cx-MEPP [mg]
1	0,68	4,17	4,29	7,20
2	0,95	3,66	4,41	8,84
3	1,18	7,34	7,41	8,59
4	1,12	6,00	7,86	14,00

Tabelle 7: Gesamtausscheidung aller Metabolite pro Person

Aus der in Abbildung 23 kumulativ dargestellten Ausscheidung der Metabolitenmengen relativ zur DEHP-d4-Dosis (exemplarisch für Person 1) ist zu erkennen, dass mit Ausnahme von 2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4 nach 22 h mehr als 90 % der jeweiligen Metabolitenmenge ausgeschieden worden sind.

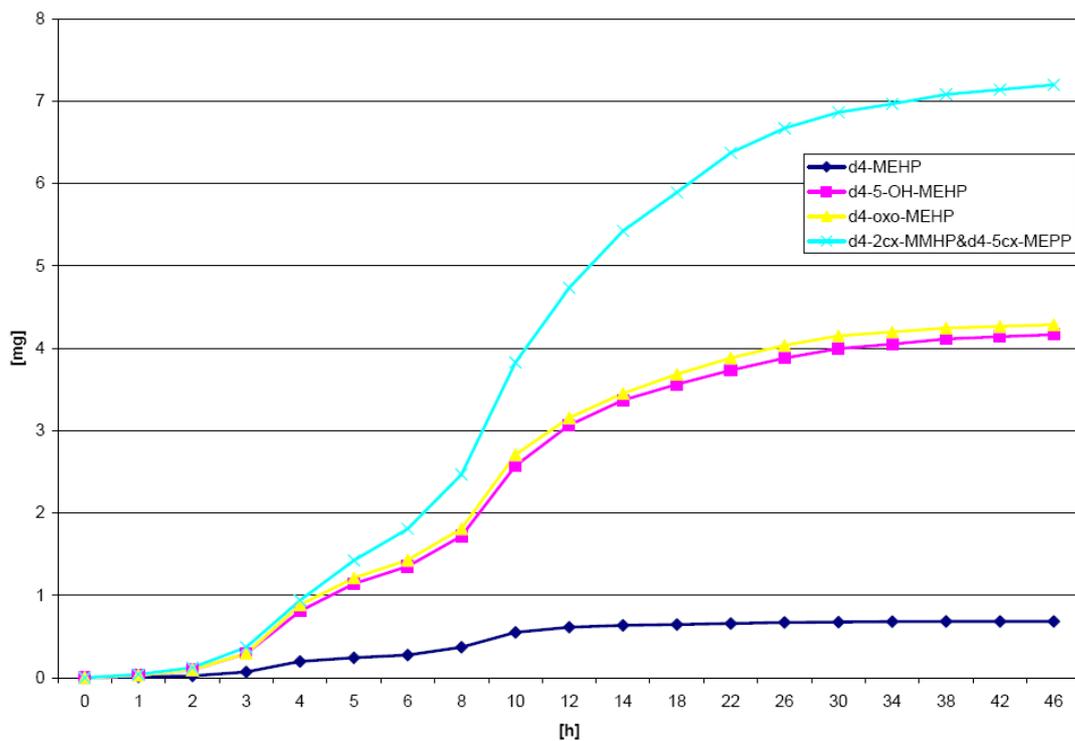


Abbildung 23: Kumulative Ausscheidung von DEHP-d4-Metaboliten im Urin in [mg] für Proband 1

Bilanziert man die Ausscheidung der einzelnen Metabolite für alle 4 Probanden so fällt auf, dass nur ein Proband weniger als 50 % der aufgenommenen Dosis innerhalb von 46 h ausscheidet und der Variationskoeffizient des Mittelwerte über alle 4 Probanden bei kleiner 8 % liegt. Für die einzelnen Metabolite schwankt 5OH-MEHP-d4 mit knapp

20 % am stärksten und MEHP-d4 mit knapp über 6 % am geringsten. Tabelle 8 zeigt die entsprechenden Daten im Detail.

Proband	d4-MEHP	d4-5-OH-MEHP	d4-oxo-MEHP	d4-2cx-MMHP&d4-5cx-MEPP	Summe
1	2,5%	14,6%	15,2%	24,1%	56,5%
2	2,7%	9,8%	11,9%	22,7%	47,1%
3	2,8%	16,8%	17,0%	18,7%	55,3%
4	2,4%	12,2%	16,1%	27,2%	58,0%
MW	2,5%	14,6%	15,2%	24,1%	56,5%
SD	0,2%	2,6%	1,9%	3,1%	4,2%
VK	6,6%	17,7%	12,7%	12,7%	7,5%

Tabelle 8: Anteil des jeweiligen Metaboliten in % an der Gesamtdosis

3.4 Korrelationen der im Urin ausgeschiedenen Metabolitenmengen mit der systemischen Belastung durch freies MEHP-d4

Die Belastung durch freies MEHP-d4 im Vollblut ($AUC_{0-24\text{ h}}$) und die jeweiligen im Urin ausgeschiedenen Metabolitenmengen sind linear korreliert, wobei die Bestimmungsmaße für 5OH-MEHP-d4 und 5oxo-MEHP-d4 die höchsten Werte haben (Abbildung 24). Erneut zeigt sich die fast vollständige Ausscheidung von MEHP-d4, 5OH-MEHP-d4 und 5oxo-MEHP-d4 innerhalb von 22 h.

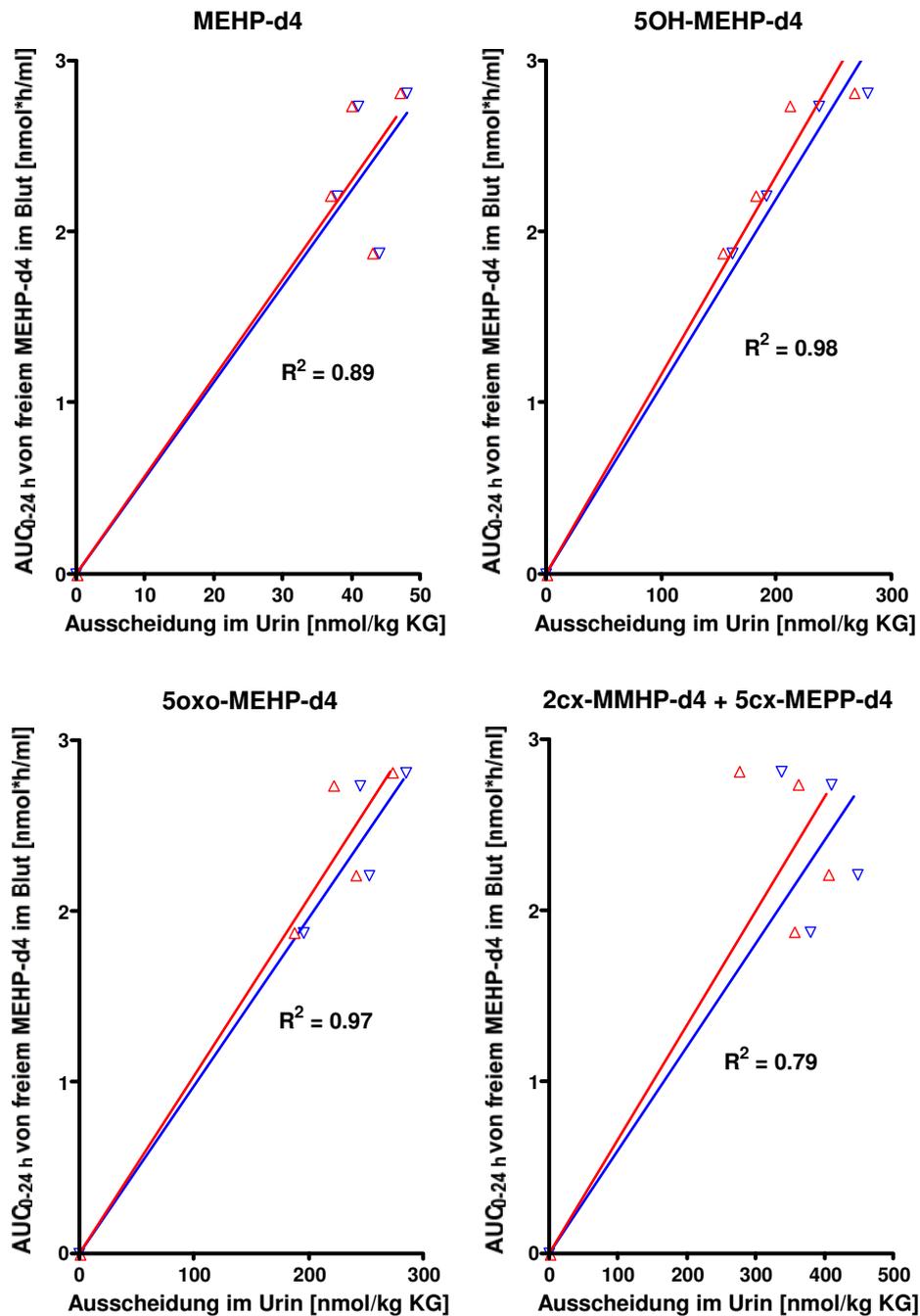


Abbildung 24: Lineare Beziehungen zwischen der Fläche der Konzentrations-Zeitkurve (AUC_{0-24 h}) von freiem MEHP-d4 im Blut und den im Urin ausgeschiedenen, auf das Körpergewicht normierten Gesamtmengen einzelner DEHP-d4-Metaboliten. Rote Symbole: Urinausscheidung bis 22 h; blaue Symbole: Urinausscheidung bis 46 h. Die Bestimmungsmaße waren für die beiden Zeitperioden jeweils identisch.

4 Diskussion

Die nach DEHP-d4-Einnahme in der vorliegenden Studie erhaltenen Konzentrations-Zeitverläufe von DEHP-d4 und seinen Metaboliten im Vollblut oder Plasma ergeben ein komplexes Bild, das nur dank der hohen Messfrequenz sichtbar ist. Das Auf und Ab wird verständlich, wenn man bestimmte physiologische und biochemische Prozesse in Betracht zieht: Die Ausgangssubstanz DEHP-d4 wird als lipidähnliche Substanz (Griffiths et al. 1988) offensichtlich erst nach Galleneintritt im Duodenum resorbiert, was die beobachtete lag-Phase erklärt. Zumindest das zweite bei den Probanden erkennbare Maximum ist möglicherweise auf eine vom Mittagessen initiierte, verstärkte Magenentleerung (Thews et al. 1991) zurückzuführen. Ähnliche Schwankungen von Konzentrations-Zeitverläufen im Blut wurden auch nach oraler Aufnahme anderer lipophiler Verbindungen wie beispielsweise β -Carotin (O'Neill and Thurnham 1998) oder Fettsäuren (Cabr e et al. 2005) gefunden. Die frühen kleinen Maxima von MEHP-d4 d rfhten aus einer durch saure Lipasen im Magen (Carrière et al. 1993) katalysierten DEHP-d4-Hydrolyse resultieren, gefolgt von unmittelbarer Resorption in den Blutkreislauf. Die weiteren Maxima von MEHP-d4, die auffallenderweise kurz vor den entsprechenden DEHP-d4-Maxima erscheinen, resultieren wohl vorwiegend aus der gut bekannten DEHP-d4-Hydrolyse im Dünndarm (zusammengefasst in Albro 1989) sowie m glichlicherweise aus DEHP-d4, das über die Pfortader in die Leber gelangt und dort hydrolysiert wird. DEHP bindet, bedingt durch seine Lipophilie und Struktur, zum Teil an Lipoproteine (Griffiths et al. 1988). Da ein Anteil der im Darm gebildeten Lipoproteine in die Lymphe abgegeben wird, ist davon auszugehen, dass eine gewisse Menge des resorbierten DEHP-d4 in die Lymphe gelangt. Dies würde die leichte Verzögerung der DEHP-d4-Maxima im Vergleich zu den MEHP-d4-Maxima erklären, da der Lymphfluss im Brustlymphgang (Lindena et al. 1986) als Sammelgefäß etwa 3 Größenordnungen langsamer ist als der Blutfluss in der Pfortader. Nach unserem Wissen war DEHP noch niemals beim Menschen nach oraler Einnahme im Blut bestimmt worden.

Etwas mehr als ein Drittel des Gesamt-MEHP-d4 lag im Vollblut als MEHP-d4- β -Glukuronid vor. Hiermit übereinstimmend sind Ergebnisse von Kato et al. (2004). Die Autoren hatten bei Einzelmessungen von MEHP im Plasma der Allgemeinbevölkerung (n = 127) im Mittel 64 % freies MEHP und 36 % MEHP-d4- β -Glukuronid gefunden.

Nach oraler DEHP-d4-Einnahme resultierte eine im Vergleich zu Ratte und Marmoset relativ hohe systemische Belastung an unverändertem DEHP-d4. Bei weiblichen Ratten bzw. Marmosets betrug sie nach oraler Gabe von 30 mg DEHP-d4 /kg 1,4 - 3,2 % bzw. 2-5,5 % von derjenigen an freiem MEHP-d4 (Kessler et al. 2004). Bei den Probanden lag der entsprechende Prozentsatz bei 35-60 %. Möglicherweise ist die intestinale DEHP-d4-Hydrolyse beim Menschen weniger effektiv als bei Ratte oder Marmoset. Leider liegen dazu keine Untersuchungen vor.

Die systemische Belastung mit freiem MEHP-d4, normiert auf die DEHP-d4-Dosis, liegt beim Menschen etwa doppelt so hoch wie bei der Ratte und acht mal so hoch wie beim Marmoset (Tabelle 9). In einem analogen Vergleich (Koch et al. 2005) schätzten die Autoren, basierend auf nur vier MEHP-d4-Messungen im Plasma eines einzelnen Probanden, die Belastung des Menschen 7,5fach höher ein, als es sich aus der jetzigen Datenlage ergibt.

Spezies	DEHP-d4-Dosis [mg/kg]	AUC _{0-24 h} von freiem MEHP-d4 [nmol*h/ml Blut pro mmol DEHP-d4/kg]	Anzahl der Individuen
Ratte ¹	30	695 ± 113*	3
Marmoset ¹	30	181**	8
Mensch	0,64	1470 ± 260*	4

Tabelle 9: Auf die DEHP-d4-Dosis normierte Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve bis 24 h (AUC_{0-24 h}) von freiem MEHP-d4 bei verschiedenen Spezies ¹ Kessler et al. (2004); * Mittelwert ± Standardabweichung; **Konzentrations-Zeitkurve zusammengesetzt aus jeweils 2 Blutproben von 8 Tieren

Im Unterschied zu MEHP-d4 stimmen die in der vorliegenden Studie bestimmten Konzentrations-Zeitverläufe von 5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4 und 2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4 im Plasma wesentlich besser mit denjenigen überein, die von Koch et al. (2004, 2005) bei einem Probanden erhalten wurden. Im Gegensatz zu MEHP ist allerdings die in-vivo-Relevanz der weiteren Metaboliten hinsichtlich der antiandrogenen Wirkung von DEHP nicht geklärt.

Ein Vergleich der Metabolitenausscheidung im Urin kann mangels weiterer Studien nur mit der von Koch et al. (2004, 2005) vorgenommen werden. Die dort bei einem Probanden nach einer DEHP-d4-Dosis von 640 µg/kg KG erhaltenen Zeitverläufe stehen nicht im Widerspruch zu den Befunden der vorliegenden Studie; sie ähneln

denjenigen bei Proband 4 gefundenen. Die Halbwertszeiten der Metaboliten (Koch et al. 2004, 2005) sind gleich (MEHP-d4) oder etwas länger (5OH-MEHP-d4, 5oxo-MEHP-d4 und 2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4) als die mittleren Halbwertszeiten der vorliegenden Studie. Die auf die DEHP-d4-Dosis bezogene prozentuale Gesamtausscheidung bis 46 h (siehe Tabelle 7) ist in beiden Studien für 5oxo-MEHP-d4 und 2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4 nahezu gleich. Hingegen beträgt die mittlere prozentuale Gesamtausscheidung von MEHP-d4 in der vorliegenden Studie nur ein Drittel und die von 5OH-MEHP-d4 nur gut die Hälfte der entsprechenden von Koch et al. (2004, 2005) gefundenen Werte. Der Mittelwert der gesamten Metabolitenausscheidung, bezogen auf die DEHP-d4-Dosis, liegt daher in der vorliegenden Studie mit ca. 57 % (Maximalwert 59 %) niedriger als in der Studie von Koch et al. (2005) mit ca. 74 %. Vermutlich wird ein Teil der aufgenommenen DEHP-d4-Dosis wie beim Marmoset (unveröffentlichte Ergebnisse) unverändert über die Fäzes ausgeschieden. Über denselben Ausscheidungsweg könnten auch gallengängige Glukuronide der DEHP-d4-Metaboliten eliminiert werden.

Zur Berechnung der individuellen, täglichen DEHP-Aufnahme bei der Allgemeinbevölkerung verwendeten Koch et al. (2006) die Summe der in einzelnen Urinproben (Morgenurin) ausgeschiedenen Mengen an MEHP, 5OH-MEHP und 5oxo-MEHP. Mittels dieser Mengen berechneten die Autoren anhand der Kreatininclearance die tägliche (24 h) Metabolitenausscheidung. Die täglich aufgenommene DEHP-Dosis erhielten sie hieraus mittels des in ihrer Studie an einem einzelnen Probanden erhaltenen Verhältnisses zwischen Metabolitenausscheidung und DEHP-d4-Dosis. Nach den vorliegenden Resultaten ist dieses Verfahren ungeeignet zur Berechnung der individuellen, täglichen DEHP-Dosen, da die Ausscheidungskurven der Metaboliten ausgeprägt oszillierten (Abbildung 18-21). So zeigten die über die Probanden gemittelten Ausscheidungsmengen zu den einzelnen Zeitpunkten starke Streuungen mit mittleren Variationskoeffizienten von 50-70 % (Abbildung 22A), d. h. die einzelnen Werte unterschieden sich um ein Mehrfaches. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Fromme et al. (2007). Die Autoren fanden bei 49 Personen (Stichprobe der Allgemeinbevölkerung), die an 8 aufeinander folgenden Tagen Morgenurinproben sammelten, eine starke, intraindividuelle Streuung in der Ausscheidung der DEHP-Metaboliten MEHP, 5OH-MEHP, 5oxo-MEHP, 2cx-MMHP und 5cx-MEPP. Daraus schlossen Fromme et al. (2007), dass eine auf nur einer

einzelnen Urinprobe beruhende Expositionsabschätzung in ihrer Aussagekraft begrenzt ist. Lediglich auf der Basis von umfangreicheren Studien zur Ermittlung einer z. B. mittleren und oberen (auf der Basis höherer Perzentile) täglichen Exposition der Bevölkerung lassen sich Aussagen treffen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Koch et al. (2005) haben die hier vorliegenden Daten zur kumulativen Ausscheidung der Metabolite im Urin gezeigt, dass – mit Ausnahme von 2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4 – mehr als 90 % des jeweiligen Metaboliten den Körper nach 22 h verlassen haben. Die prozentuale Ausscheidung der DEHP-d4-Metaboliten innerhalb von 24 h war in der Studie von Koch et al. (2005) bei drei DEHP-d4-Dosen über zwei Größenordnungen (4,7, 28,7 und 650 µg/kg) dosisunabhängig, d. h., in diesem Dosisbereich waren die im Urin ausgeschiedenen Gesamtmengen jedes einzelnen Metaboliten proportional zur DEHP-d4-Dosis. Daher können in diesem Dosisbereich die im Urin ausgeschiedenen Gesamtmengen der Metaboliten direkt für die Bestimmung einer unbekannt DEHP-Dosis herangezogen werden. Tabelle 9 zeigt Quotienten „DEHP-Dosis/ausgeschiedene Metabolitenmenge“ für die untersuchten Metaboliten nach 22- und 46-stündiger Urinsammlung, die zur Berechnung der individuellen, täglichen Aufnahme von DEHP bei der Allgemeinbevölkerung verwendet werden können. Zu diesem Zweck sollten bevorzugt 5OH-MEHP und 5oxo-MEHP herangezogen werden. Wie aus der Tabelle ersichtlich, ist hierfür eine Urinsammelperiode von 24 h ausreichend.

	DEHP-d4 [mg/kg KG] / Metabolit [mg/kg KG]; Mittelwert ± Standardabw. (n = 4)			
	MEHP-d4	5OH-MEHP-d4	5oxo-MEHP-d4	2cx-MMHP-d4 + 5cx-MEPP-d4
22 h	55,4 ± 4,3	11,0 ± 2,5	9,6 ± 1,6	6,3 ± 1,2
46 h	53,9 ± 4,0	10,3 ± 2,4	9,0 ± 1,5	5,6 ± 0,8

Tabelle 10: Faktoren zur Berechnung der DEHP-Dosis anhand der Gesamtmenge des im Zeitraum von 22 h bzw. 46 h jeweils ausgeschiedenen Metaboliten

5 Zusammenfassung

Bei Erwachsenen im arbeitsfähigen Alter scheinen weder Körpergewicht noch Alter die Toxikokinetik von DEHP und MEHP zu beeinflussen.

Die erhaltenen toxikokinetischen Daten ermöglichen es, bei einer gegebenen DEHP-Dosis die mittlere systemische Belastung mit dem toxischen Metaboliten MEHP zu berechnen.

Die Ausscheidungsmengen von 5OH-MEHP oder 5oxo-MEHP im Urin innerhalb von 24 h können zur Ermittlung der systemischen Belastung durch MEHP und der DEHP-Dosis verwendet werden.

Die systemische Belastung einer Person durch DEHP und MEHP lässt sich nicht aus einer Einzelmessung im Blut ermitteln.

Die individuelle, tägliche DEHP-Einnahme sollte nicht aus der ausgeschiedenen Menge von DEHP-Metaboliten in einer einzelnen Urinprobe ermittelt werden. Hierzu sind umfangreichere Untersuchungen, Mehrfachmessungen bei der gleichen Person oder längere Sammelzeiten (z. B. 24-Stunden Sammelurin) erforderlich.

6 Literatur

- Albro PW (1989)
Metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate. *Drug Metab Rev* 21: 13-34.
- Borch J, Metzdorff SB, Vinggaard AM, Brokken L, Dalgaard M (2006)
Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology* 223: 144-155.
- Brandt EJ, Elliott RW, Swank RT (1975)
Defective lysosomal enzyme secretion in kidneys of Chediak-Higashi (beige) mice. *J Cell Biol* 67: 774-788.
- Cabré E, Hernández-Pérez JM, Fluvà L, Pastor C, Corominas A, Gassull MA (2005)
Absorption and transport of dietary long-chain fatty acids in cirrhosis: a stable-isotope-tracing study. *Am J Clin Nutr* 81: 692-701.
- Carrière F, Barrowman JA, Verger R, Laugier R (1993)
Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology* 105: 876-888.
- Chauvigné F, Menuet A, Lesné L, Chagnon MC, Chevrier C, Régnier JF, Angerer J, Jégou B (2009)
Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis in vitro. *Environ Health Perspect* 117: 515-521.
- Clewell RA, Campbell JL, Ross SM, Gaido KW, Clewell HJ 3rd, Andersen ME (2010)
Assessing the relevance of in vitro measures of phthalate inhibition of steroidogenesis for in vivo response. *Toxicol In Vitro* 24: 327-334.
- DFG (2002)
Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP). *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe: Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten und Einstufungen* 35. Lieferung, VCH Weinheim.
- ECB (European Chemicals Bureau) (2004)
Risk assessment bis(2-ethylhexyl) phthalate (CAS-No.: 117-81-7, EINECS-No.: 204-211-0). Consolidated Final Report.
- Fromme H, Bolte G, Koch HM, Angerer J, Boehmer S, Drexler H, Mayer R, Liebl B (2007)
Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population. *Int J Hyg Environ Health* 210: 21-33.
- Griffiths WC, Camara PD, Saritelli A, Gentile J (1988)
The in vitro serum protein-binding characteristics of bis-(2-ethylhexyl) phthalate and its principal metabolite, mono-(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect* 77: 151-156.
- Kato K, Silva MJ, Reidy JA, Hurtz D 3rd, Malek NA, Needham LL, Nakazawa H, Barr DB, Calafat AM (2004)
Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate and mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment to di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect* 112: 327-330.
- Kessler W, Numtip W, Grote K, Csanády GA, Chahoud I, Filser JG. (2004)
Blood burden of di(2-ethylhexyl) phthalate and its primary metabolite mono(2-ethylhexyl) phthalate in pregnant and nonpregnant rats and marmosets. *Toxicol Appl Pharmacol* 195:142-153.

- Kessler W, Phokha W, Csanády GA, Filser JG (2001)
No background concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate and mono(2-ethylhexyl) phthalate in blood of rats. *Arch Toxicol* 75: 62-64.
- Koch HM, Bolt HM, Angerer J (2004)
Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and Plasma after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* 78: 123-130
- Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Angerer J (2005)
New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and Plasma after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* 79: 367-376.
- Koch HM, Preuss R, Angerer J (2006)
Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure – an update and latest results. *Int J Androl* 29: 155-165.
- Koch HM, Rossbach B, Drexler H, Angerer J (2003)
Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates – determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environ Res* 93: 177-185.
- Lambrot R, Muczynski V, Lécureuil C, Angenard G, Coffigny H, Pairault C, Moison D, Frydman R, Habert R, Rouiller-Fabre V (2009)
Phthalates impair germ cell development in the human fetal testis in vitro without change in testosterone production. *Environ Health Perspect* 117: 32-37.
- Lindena J, Küpper W, Trautschold I (1986)
Catalytic enzyme activity concentration in thoracic duct, liver, and intestinal lymph of the dog, the rabbit, the rat and the mouse. Approach to a quantitative diagnostic enzymology, II. Communication. *J Clin Chem Clin Biochem* 24: 19-33.
- O'Neill ME, Thurnham DI (1998)
Intestinal absorption of beta-carotene, lycopene and lutein in men and women following a standard meal: response curves in the triacylglycerol-rich lipoprotein fraction. *Br J Nutr* 79: 149-159.
- Régnier J, Bowden C, Lhuguenot J (2004)
Effects on rat embryonic development in vitro of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and its metabolites. *The Toxicologist* 78: 38.
- Schmid P, Schlatter C (1985)
Excretion and metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in man. *Xenobiotica* 15: 251-256.
- Seckin E, Fromme H, Völkel W (2009)
Determination of total and free mono-n-butyl phthalate in human urine samples after medication of a di-n-butyl phthalate containing capsule. *Toxicol Lett* 188: 33-37.
- Sjöberg P, Bondesson U, Gray TJ, Plöen L (1986)
Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and five of its metabolites on rat testis in vivo and in vitro. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 58: 225-233.
- Stroheker T, Cabaton N, Nourdin G, Régnier JF, Lhuguenot JC, Chagnon MC (2005)
Evaluation of anti-androgenic activity of di-(2-ethylhexyl)phthalate. *Toxicology* 208: 115-121.
- Thews G, Mutschler E, Vaupel P (1991)
Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, 4. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Wilson VS, Lambright C, Furr J, Ostby J, Wood C, Held G, Gray LE Jr (2004)
Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced insl3 gene expression in the fetal rat testis. *Toxicol Lett* 146: 207-215.

