

TEXTE

84/2011

Anwendung von Biotests zur Charakterisierung der Expositionspfade für Umwelthormone aus Kunststoffen

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungskennzahl 206 67 448/04
UBA-FB 001482

Anwendung von Biotests zur Charakterisierung der Expositionspfade für Umwelthormone aus Kunststoffen

von

Martin Wagner und Prof. Dr. Jörg Oehlmann

Goethe-Universität Frankfurt, Abteilung Aquatische Ökotoxikologie,
Frankfurt am Main

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

UMWELTBUNDESAMT

Diese Publikation ist ausschließlich als Download unter
<http://www.uba.de/uba-info-medien/4228.html>
verfügbar.

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

ISSN 1862-4804

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/>

Redaktion: Fachgebiet IV 2.2 Arzneimittel, Wasch - und Reinigungsmittel
Dr. Jean Bachmann

Dessau-Roßlau, Dezember 2011

Berichts-Kennblatt

1. Berichtsnummer UBA-FB 001482	2.	3.
4. Titel des Berichts Anwendung von Biotests zur Charakterisierung der Expositionspfade für Umwelthormone aus Kunststoffen		
5. Autor(en), Name(n), Vorname(n) Wagner, Martin Oehlmann, Jörg	8. Abschlußdatum 08.11.2010	
6. Durchführende Institution (Name, Anschrift) Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt Abteilung Aquatische Ökotoxikologie Siesmayerstr. 70 D-60323 Frankfurt am Main	9. Veröffentlichungsdatum Dezember 2011	
	10. UFOPLAN-Nr. 206 67 448/04	
	11. Seitenzahl 94	
7. Fördernde Institution (Name, Anschrift) Umweltbundesamt, Postfach 14 06, D-06813 Dessau-Roßlau	12. Literaturangaben 139	
	13. Tabellen und Diagramme 9	
	14. Abbildungen 28	
15. Zusätzliche Angaben		
16. Kurzfassung Das vorliegende Projekte hat das Ziel, die Expositionspfade für Umwelthormone aus Kunststoffen zu charakterisieren. Zur Erfassung und Charakterisierung der endokrinen Aktivität wurden biologische Testverfahren (Biotests) eingesetzt. Migrationsstudien mit Lebensmittelverpackungen und Kunststoffvorformen belegen das Auslaugen von östrogen aktiven Substanzen aus verschiedenen Kunststoffen im Yeast Estrogen Screen (YES) und im E-Screen. Zudem dominieren antiöstrogen aktive Substanzen in einer Vielzahl von Proben. Es konnten komplexe Migrationsprofile detektiert werden, die wahrscheinlich aus der Migration verschiedener, endokrin aktiver Komponenten resultieren. In Extrakten von Kunststoffverpackungen ließen sich zudem Substanzen mit agonistischer Aktivität am Östrogenrezeptor, Retinoid-X-Rezeptor und Vitamin-D-Rezeptor nachweisen. Ein theoretisches Expositionsszenario für marine Mollusken gibt Hinweise darauf, dass Endokrine Disruptoren aus Kunststoffen in der Umwelt relevante Effekte auslösen können. Die modellhafte Untersuchung von Mineralwasser zeigte, dass 60% der untersuchten Produkte im YES und E-Screen östrogen aktiv sind. Die In-vitro-Daten deuten auf die Kunststoffverpackung als eine Quelle der östrogenen Kontamination hin. Ein In-vivo-Versuch mit dem östrogensensitiven Modellorganismus <i>Potamopyrgus antipodarum</i> unterstützt diese Hypothese. Mit verschiedenen Analytikverfahren (GC-MS, LC-MS/MS) konnten außerdem bekannte, endokrin aktive Substanzen in PET- und Mineralwasserextrakten identifiziert werden, u.a. diverse Phthalate und Phenole. Zudem wurden potente Antagonisten des Östrogen- und Androgenrezeptors aus Mineralwasser extrahiert. Eine non-target Analytik (Orbitrap-MS) zeigte, dass eine Substanz mit der Molekülmasse 363,1992 Da [M+H ⁺] hochsignifikant mit der biologischen Aktivität korreliert ist. Anhand der im Projekt erprobten Verfahren wurde eine Reihe von methodischen Aspekten herausgearbeitet, die für die Anwendung von Biotests für die Charakterisierung der endokrinen Aktivität komplexer Proben relevant sind. Dass Kunststoffe eine ganze Reihe endokrin wirksamer Substanzen enthalten und freisetzen können, konnte im vorliegenden Projekt mit Hilfe von Biotests bestätigt werden. Somit sind Kunststoffe eine relevante und bisher unterschätzte Quelle für die Exposition von Mensch und Umwelt mit endokrin aktiven Substanzen. Bei der Identifizierung und Charakterisierung dieser Substanzen besteht nach wie vor erheblicher Forschungsbedarf.		
17. Schlagwörter Endokrine Disruptoren, E-Screen, Exposition, Kunststoff, Migration, Verpackung, Yeast Estrogen Screen		
18. Preis	19.	20.

Report Cover Sheet

1. Report No. UBA-FB 001482	2.	3.
4. Report Title Anwendung von Biotests zur Charakterisierung der Expositionspfade für Umwelthormone aus Kunststoffen		
5. Autor(s), Family Name(s), First Name(s) Wagner, Martin Oehlmann, Jörg	8. Report Date 08.11.2010	
6. Performing Organisation (Name, Address) Johann Wolfgang Goethe University Frankfurt Department Aquatic Ecotoxicology Siesmayerstr. 70 D-60323 Frankfurt am Main, Germany	9. Publication Date December 2011	
	10. UFOPLAN-Ref. No. 206 67 448/04	
	11. No. of Pages 94	
	12. No. of Reference 139	
7. Sponsoring Agency (Name, Address) Umweltbundesamt, Postfach 14 06, D-06813 Dessau-Roßlau	13. No. of Tables, Diagrams 9	
	14. No. of Figures 28	
	15. Supplementary Notes	
16. Abstract The present project aims to characterise the exposure pathways for endocrine disruptors from plastic materials. A bioassay-based approach was employed to investigate and characterise the endocrine activity. Migration studies with food packaging and plastic preforms document the leaching of estrogen-like compounds from several types of plastic in the Yeast Estrogen Screen and the E-Screen. Additionally, anti-estrogenic activity was predominant in many samples. The detection of complex migration profiles provides evidence for the leaching of several, diverse-acting endocrine disruptors. Moreover, extracts of plastic food packaging exhibited agonistic activity on the estrogen receptor, retinoid X receptor, and vitamin D receptor. A theoretical exposure assessment for marine molluscs implies that endocrine disruptors from plastic might induce relevant effect in the environment. Within the exemplary investigation of bottled mineral water, 60% of the products were characterised as significantly estrogenic using the YES and E-Screen. These in vitro data point to the plastic packaging being one source of estrogenic contamination. An in vivo study employing the estrogen-sensitive model organism <i>Potamopyrgus antipodarum</i> supports this hypothesis. By using several analytical techniques (GC-MS, LC-MS/MS) we identified several well-known endocrine disruptors in bottled water and the plastic material, e.g. numerous phthalates and phenols. Moreover, potent antagonists of the estrogen and androgen receptor were extracted from bottled water. In a non-target analysis (Orbitrap-MS) a compound with the exact mass of 363.1992 [M+H⁺] correlated highly significantly with the biological activity. On the basis of the methods optimised and applied within the project we elaborated a set of aspects that are crucial for the applicability of bioassays to characterise the endocrine activity of complex samples. Employing a bioassay-based approach we provide evidence for the presence and migration of endocrine disruptors from plastic materials. In that sense, polymers represent a relevant but currently neglected source of human and environmental exposure to endocrine active compounds. Concerning the identification and toxicological characterisation of those chemicals, there is substantial need for further research.		
17. Keywords endocrine disruptors, E-Screen, exposure, plastic, migration, packaging, Yeast Estrogen Screen		
18. Price	19.	20.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	1
Summary and conclusions	4
1 Einleitung: Endokrine Disruptoren aus Kunststoffen – Eine vernachlässigte Expositionsquelle?	6
1.1 Kunststoff in der Umwelt	6
1.2 Kunststoff als Expositionsquelle für Chemikalien	9
2 Aufgaben und Ziele des Projektes	13
3 Methodische Aspekte: Eignung von Biotests zur Untersuchung des endokrinen Potentials aus Kunststoffen	14
3.1 Probenauswahl: Vielfalt vs. Repräsentativität	14
3.2 Integrierte Betrachtung der endokrinen Aktivität	15
3.3 Auswahl der In-vitro-Screens	15
3.4 Etablierung und Optimierung der In-vitro-Verfahren	17
3.4.1 YES	17
3.4.2 Antiscreens: YAES/YAAS	17
3.4.3 E-Screen	18
3.4.4 Yeast-Two-Hybrid-Assays für RXR, TR und VDR	18
3.5 Migrations- und Extraktionsverfahren für Kunststoffe	18
3.6 Auswahl der Extraktionsmethode für Wasserproben	20
3.7 Probenaufbereitung	22
3.8 Qualitätssicherung	23
3.9 Datenanalyse und Quantifizierung	23
3.10 Zusammenfassung: Methodische Überlegungen	24
4 Biologische Testsysteme: Integrierte Betrachtung des endokrinen Potentials von Kunststoffen	26
4.1 Östrogene Aktivität: Migrationsversuch nach EU mit Verpackungen	26
4.2 Östrogene Aktivität: Migrationsversuch nach EU mit Granulaten	28
4.3 Migrationsversuche nach EU: Verpackungen und Granulate im Vergleich	29
4.4 Migrationsversuche nach Kataoka	31
4.5 Zusammenfassung: Migrationsversuche	32
4.6 Yeast-Two-Hybrid: Extrakte verschiedener Kunststoffverpackungen	34
4.7 Zusammenfassung: Extraktion und Yeast-Two-Hybrid	37
5 Modell Mineralwasser	38
5.1 Ausgangslage: Östrogene Aktivität in Mineralwasser und aus PET	38
5.2 Migrationsdaten: Mischung aus Östrogenen und Antiöstrogenen	41
5.3 Festphasenextraktion: Selektive Aufreinigung verschiedener endokrin aktiver Bestandteile	43
5.4 Aktivität von Mineralwasserextrakten im E-Screen	45

5.5	Zusammenfassung: Mineralwasser	46
6	Wirkbezogene Analytik: Kombination aus Biotests und chemischer Analytik zur Identifizierung der stofflichen Ursachen	48
6.1	Gezielte chemische Analytik: GC-MS und LC-MS/MS-Untersuchungen von PET- und Mineralwasserextrakten	48
6.1.1	GC-MS-Untersuchungen von PET-Material.....	48
6.1.2	GC-MS- und LC-MS-Untersuchungen von Mineralwasser.....	49
6.2	Zusammenfassung: Gezielte Analytik	51
6.3	Fraktionierung östrogen aktiver Proben und Kombination mit GC-MS.....	52
6.4	Zusammenfassung: gezielte Analytik und EDA.....	54
6.5	Aufreinigung antiandrogen aktiver Proben und Kombination mit Orbitrap-MS	55
6.6	Zusammenfassung: Orbitrap-MS und non-target Analytik	58
7	Charakterisierung ausgewählter Kunststoffinhaltsstoffe	59
8	Kunststoff als Quelle Endokriner Disruptoren: Relevanz für Mensch und Umwelt.....	63
9	Kunststoff und wirkbezogenen Analytik: Perspektiven für Forschung und Regulation..	66
9.1	Endokrine Aktivität von Umweltproben: Methodische Überlegungen.....	66
9.2	Kunststoffe und Endokrine Disruptoren.....	67
9.3	Implikationen für die regulatorische Arbeit.....	67
10	Literatur	69
Anhang		77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kunststoffproduktion im Überblick.....	7
Abbildung 2: Haupteintragspfade und Transport von Kunststoffen in der Umwelt.....	8
Abbildung 3: Lebenszyklus von Kunststoffen.....	9
Abbildung 4: Klassifizierung potentiell migrierender Substanzen aus Kunststoffen.....	11
Abbildung 5: Funktionsprinzip der im Projekt verwendeten Yeast-Two-Hybrid-Systeme.....	18
Abbildung 6: Östrogene Aktivität von verschiedenen Lösemittelextrakten (Methanol, Acetonitril, Dichlormethan und Heptan) einer Frischhaltefolie im YES.....	20
Abbildung 7: Östrogene Aktivität der Blindwerte bei der Festphasenextraktion (YES).....	21
Abbildung 8: Vergleich verschiedener Methoden zu Festphasenextraktion (SPE) am Beispiel einer Mineralwasserprobe im YAES.....	21
Abbildung 9: Vergleich der Auswirkung der Probenapplikation im E-Screen.....	22
Abbildung 10: Östrogene Aktivität von Verpackungsmaterialien im Migrationsversuch nach EU (YES).....	27
Abbildung 11: Östrogene Aktivität von Kunststoffgranulaten im Migrationsversuch nach EU (YES).....	29
Abbildung 12: Übersicht über die östrogene Aktivität von Kunststoffproben in verschiedenen Migrationsstudien nach EU.....	30
Abbildung 13: Östrogene Aktivität von Kunststoffgranulaten im Migrationsversuch nach KATAOKA <i>et al.</i> (2002).....	31
Abbildung 14: Östrogene Aktivität von Kunststoffgranulaten im Migrationsversuch nach KATAOKA <i>et al.</i> (2002).....	32
Abbildung 15: Aktivität von Kunststoffextrakten am Östrogenrezeptor (A), RXR-Rezeptor (B), Thyroidrezeptor (C) und Vitamin-D-Rezeptor (D).....	35
Abbildung 16: Reproduktion von <i>Potamopyrgus antipodarum</i> nach achtwöchiger Hälterung in Glas und PET-Flaschen (aus WAGNER & OEHLMANN 2009).....	40
Abbildung 17: Endokrine Aktivität im Migrationsversuch mit Mineralwasser.....	42
Abbildung 18: Vergleich verschiedener Methoden zu Festphasenextraktion (SPE) am Beispiel einer Mineralwasserprobe im YES und im YAES.....	43
Abbildung 19: Antiöstrogene (A) und antiandrogene Aktivität (B) von SPE-Extrakten 18 verschiedener Mineralwassermarken.....	44
Abbildung 20: Korrelation der antiöstrogenen und antiandrogenen Aktivität von Mineralwasserextrakten.....	44
Abbildung 21: Östrogene Aktivität von SPE-Extrakten 18 verschiedener Mineralwassermarken im E-Screen.....	45
Abbildung 22: Chromatogramm (oben) und Massenspektrum (unten) der aufsummierten Massenübergängen im Elutionszeitraum von 15,3 bis 16,3 Minuten des LC-MS/MS-Screenings.....	51
Abbildung 23: Schematische Darstellung der Effekt-geleiteten Analytik (A, aus BRACK 2003) und Adaption für das vorliegende Projekt (B).....	53
Abbildung 24: Vergleich zweier verschiedener HPLC-Programme zur Fraktionierung östrogen aktiver SPE-Extrakte am Beispiel einer Mineralwasserprobe.....	53

Abbildung 25: Östrogene Aktivität eines fraktionierten Mineralwasserextraktes (Marke C) im YES (A) und mittels GC-MS in der jeweiligen Fraktion gefundene Substanzen (B).	54
Abbildung 26: Antiandrogene Aktivität von SPE-Extrakten 18 verschiedener Mineralwässer im YAES (A) und Massen der in diesen Proben mittels Orbitrap detektierten Substanzen (B).	56
Abbildung 27: Korrelation der Abundanz der Substanz mit der Masse 363,1992 Da mit der antiandrogenen Aktivität in 18 verschiedenen Mineralwasserextrakten (A) und Massenspektrum dieser Substanz in einem MS ⁵ -Experiment.	57
Abbildung 28: Potentielle Expositionspfade von Kunststoff-assoziierten Chemikalien.	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über aus Kunststoff migrierende Substanzen.....	10
Tabelle 2: Übersicht über die im Rahmen des Projektes untersuchten Kunststofftypen.....	14
Tabelle 3: Spezifische Aspekte verschiedener In-vitro-Assays zur Detektion östrogenen Aktivität (verändert nach LEUSCH <i>et al.</i> 2010).	16
Tabelle 4: Freisetzung von endokriner Aktivität in den durchgeführten Migrationsstudien. ...	33
Tabelle 5: Expositionsszenario für RXR-Aktivität (TBT-Äquivalente) aus Kunststoffmikrofragmenten am Beispiel von <i>Hydrobia ulvae</i>	36
Tabelle 6: Qualitative Ergebnisse der chemischen Analytik von MeOH-Extrakten zwei verschiedener PET-Flaschen in zwei unterschiedlichen GC-MS-Systemen.....	48
Tabelle 7: Qualitative Ergebnisse der chemischen Analytik des Soxhlet-Extraktes einer PET-Flasche mittels GC-MS.....	49
Tabelle 8: SPE-Anreicherung einer derivatisierten Mineralwasserprobe gemessen mittels GC-MS.	50
Tabelle 9: Übersicht über die im Projekt auf endokrine Aktivität untersuchten Substanzen. .	61

Abkürzungsverzeichnis

3M	SPE-Säule des Herstellers 3M	NIST	National Institute of Standards and Technology
AcNi	Acetonitril		
AR	Androgenrezeptor	NMR	Nuclear magnetic resonance
BHA	butyliertes Hydroxyanisol	NOEC	No observed effect concentration
BHT	butyliertes Hydroxytoluol	OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
CARB	SPE-Säule des Herstellers Suppelco		
CAS	Chemical Abstract Service (Nummer)	PC	Polycarbonat
CEQ	Calcitrioläquivalente	PE	Polyethylen
CPRG	chlorophenolred- β -D-galactopyranoside	PET	Polyethylenterephthalat
DBD	DNA-Bindedomäne	PF	Phenol-Formaldehyd-Harz
DBP	Dibutylphthalat	PMMA	Polymethylmethacrylat
DCM	Dichlormethan	PP	Polypropylen
DEHP	Diethylhexylphthalat	PS	Polystyren
DEP	Diethylphthalat	PVC	Polyvinylchlorid
DIBP	Diisobutylphthalat	PVDF	Polyvinylidenfluorid
DMP	Dimethylphthalat	RP	reverse phase
DMSO	Dimethylsulfoxid	RPE	Relative Proliferationseffekte
DMT	Dimethylterephthalat	RT	retention time (Retentionszeit)
E1	Estron	RXR	Retinoid-X-Rezeptor
E2	17 β -Östradiol	SC	solvent control (Lösemittelkontrolle)
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods	SDB	Bakerbond
EDA	Effect-directed analysis	SIC	Selected ion current
EE2	Ethinylestradiol	SOP	Standard operation procedure
EEQ	Östradioläquivalente	SPE	Solid phase extraction (Festphasenextraktion)
ENV+	SPE-Säule des Herstellers Isolute	TBP	Tributylphosphat
EtOH	Ethanol	TBT-EQ	Tributylzinnäquivalente
GC-MS	Gas chromatography mass spectrometry	TDI	Total daily intake
HDPE	High-density polyethylene	TIC	Total ion current
HLB	SPE-Säule des Herstellers Waters	TIF2	Transcriptional intermediary factor 2
HPLC	High pressure liquid chromatography	TNPP	Tris(nonylphenyl)phosphite
HPV	High production volume	TR	Thyroidrezeptor
HRMS	High resolution mass spectrometry	U.S. FDA	U.S. Food and Drug Authority
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods	VDR	Vitamin-D-Rezeptor
		YAAS	Yeast anti-androgen screen

LC-MS	Liquid chromatography mass spectrometry	YAES	Yeast anti-estrogen screen
LDPE	Low-density polyethylene	YES	Yeast Estrogen Screen
MCF7	Michigan cancer cell line 7	TR	Thyroidrezeptor
MeOH	Methanol	U.S. FDA	U.S. Food and Drug Authority
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	VDR	Vitamin-D-Rezeptor
		YAAS	Yeast anti-androgen screen
NC	Negative control (Negativkontrolle)	YAES	Yeast anti-estrogen screen
NIAS	Non intentionally added substance	YES	Yeast Estrogen Screen

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die exponentiell wachsende Produktion und die meist kurzlebige Nutzung von Kunststoffen bringt – neben vielen gesellschaftlichen Vorteilen – auch Nachteile mit sich, u.a. deren Akkumulation in der Umwelt. Zudem können Kunststoffe Chemikalien freisetzen und somit zur Exposition von Mensch und Umwelt beitragen. In diesem Kontext werden insbesondere hormonell wirksame Substanzen (Endokrine Disruptoren) diskutiert.

Ziel des Projekts war es, die Expositionspfade für Umwelthormone aus Kunststoffen zu charakterisieren. Hierzu wurde die Migration endokrin aktiver Komponenten aus Kunststoffen, insbesondere Lebensmittelverpackungen, untersucht. Die Erfassung und Charakterisierung der endokrinen Aktivität erfolgte mittels biologischer Testverfahren (Biotests), da diese die Effekte bisher nicht identifizierter Substanzen sowie potentielle Mixtureffekte integrieren. Ein wichtiger Aspekt war hierbei die Neuentwicklung biologischer Testmethoden und die Optimierung entsprechender chemischer Analyseverfahren.

Das Projekt gliederte sich in drei Projektphasen: In-vitro-Screening (1) von Lebensmittelverpackungen, (2) von Kunststoffrohformen sowie (3) Identifizierung und Charakterisierung ausgewählter Substanzen. Parallel zu diesen Projektphasen wurden Arbeitspakete zur Methodenentwicklung im Bereich Migrationsstudien, Extraktion, Probenaufbereitung und Biotests ausgeführt.

Die Migrationsstudien mit Lebensmittelverpackungen und Kunststoffvorformen (Granulate) wurden nach einem von der EU standardisierten Verfahren durchgeführt und belegen das Auslaugen von östrogen aktiven Substanzen aus verschiedenen Kunststoffen. Insgesamt betrachtet waren 17% der untersuchten Verpackungsproben und 33% der Vorformen im Yeast Estrogen Screen (YES) östrogen aktiv. Die komplexen Zeitverläufe der endokrinen Aktivität deuten auf ein zusätzliches Auslaugen von antiöstrogen aktiven Substanzen hin, die in einer Vielzahl von Proben im Vergleich zur östrogenen Aktivität dominieren. Antiöstrogene Aktivität war in 44% der Verpackungen und 62% der Vorformen detektierbar. Somit ist die Migration verschiedener, endokrin aktiver Komponenten aus Kunststoffen wahrscheinlich, die in komplexen Migrationsprofilen resultiert. Die Anwendung eines alternativen Migrationsverfahrens erlaubte die Untersuchung von Kunststoffvorformen im E-Screen. Auch in diesem Biotest waren 38% der untersuchten Proben östrogen aktiv.

Der Vergleich verschiedener Kunststofftypen zeigte, dass kein einheitlicher Trend hinsichtlich der Freisetzung von endokriner Aktivität durch ein bestimmtes Material existiert. Bei den Verpackungsmaterialien überwiegen die östrogenen Befunde für Materialien aus Polyethylenterephthalat (PET) und Polystyren (PS). Verpackungen aus Polyethylen (PE) und Polypropylen (PP) scheinen eher Antiöstrogene freizusetzen. Ähnlich divers sind die Resultate für Kunststoffvorformen: Aus LDPE, PET und PS migrieren überwiegend antiöstrogen aktive Komponenten, bei PE und PP konnte östrogenes Potential detektiert werden. Die individuelle Veredelung jedes Polymers mit verschiedensten Additiven kann diese heterogenen Befund erklären.

In einer exploratorischen Studie wurden Extrakte verschiedener Kunststoffverpackungen auf Aktivität an bisher vernachlässigten Hormonrezeptoren untersucht. Trotz eines beschränkten Probenumfangs ließen sich Substanzen mit agonistischer Aktivität am Östrogenrezeptor (PE oder PVC), Retinoid-X-Rezeptor (PP, PS) und Vitamin-D-Rezeptor (HDPE, PP, PE oder PVC) aus Kunststoffverpackungen extrahieren. Die Extrakte weisen z.T. eine erhebliche Potenz auf, wie z.B. mehr als 30 µg TBT-EQ/g Kunststoff im Fall von PP. Am Thyroidrezeptor war keine agonistische Aktivität feststellbar. Auf Basis dieser In-vitro-Daten wurde ein Expositionsszenario für marine Mollusken entwickelt. Diese theoretische Analyse gibt Hinweise darauf, dass Endokrine Disruptoren aus Kunststoffen in der Umwelt zu Effekten führen können.

Die im Projekt entwickelten und optimierten Methoden wurden modellhaft anhand von Mineralwasser erprobt. Im YES konnte in unaufgearbeitetem Mineralwasser in 60% der

untersuchten Produkte eine signifikante östrogene Aktivität nachgewiesen werden. Die östrogene Aktivität betrug im Mittel 18 ng EEQ/L und im Maximum 75 ng EEQ/L. Zur Aufreinigung der östrogen aktiven Komponenten wurden diverse Verfahren zur Festphasenextraktion (SPE) eingesetzt. Mit einer dieser Methoden konnten Extrakte gewonnen werden, die im E-Screen aktiv waren. In Übereinstimmung mit dem YES wiesen 60% der Proben eine signifikant erhöhte östrogene Aktivität auf.

In beiden Biotests lieferte der Vergleich von in Glas und PET verpackten Produkten Hinweise auf eine östrogene Kontamination durch die Kunststoffverpackung. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde ein In-vivo-Versuch mit *Potamopyrgus antipodarum* durchgeführt. Der östrogensensitive Modellorganismus wurde über 56 Tage in Mineralwasserflaschen aus Glas und PET gehältert, die mit definiertem Kulturmedium befüllt wurden. Verglichen mit Individuen aus Glasflaschen war die Reproduktion von *P. antipodarum* aus PET-Flaschen verdoppelt. Diese Daten weisen auf das Auslaugen von Substanzen aus PET hin, welche *in vivo* östrogen aktiv sind.

Um den stofflichen Ursachen der östrogenen Aktivität nachzugehen, wurden verschiedene Analytikverfahren (GC-MS, LC-MS/MS) angewandt. Bei der Untersuchung von PET- und Mineralwasserextrakten konnten einige Substanzen identifiziert werden, welche bekanntermaßen endokrin aktiv sind. Die am häufigsten gefundenen Substanzen gehören zur Substanzklasse der Phthalate. Qualitativ konnten DEP, DIBP, DBP und DEHP in Extrakten von PET, sowie DMP, DIBP, DBP und D-HexP in Mineralwasser nachgewiesen werden. Zudem wurden östrogen aktive Alkylphenole (Nonylphenol, Octylphenol) sowie Antioxidantien (para-tert-Butylphenol, 2,4-Di-tert-butylphenol) im Material selbst detektiert. Im Mineralwasser wurden eine Reihe weiterer bioaktiver Substanzen gefunden, u.a. butyliertes Hydroxyanisol, Tributylphosphat und 9-Octadecenamide.

Eine für polare Substanzen optimierte SPE-Methode extrahierte potente Antagonisten des Östrogen- und Androgenrezeptors aus Mineralwasser. Im Fall der antiandrogenen Aktivität konnte in der Hälfte der Produkte eine Inhibition von 40-90% detektiert werden. Diese Proben wurden in einer non-target Analytik mittels hochauflösender Massenspektrometrie (Orbitrap-MS) untersucht. Von der Vielzahl der detektierten Komponenten war eine Substanz mit der Molekülmasse 363,1992 Da $[M+H]^+$ hochsignifikant mit der biologischen Aktivität korreliert. Zusätzlich wurden MSⁿ-Experimente zur Strukturaufklärung durchgeführt. Die Kombination von sensitiven biologischen und analytischen Testverfahren ist somit hervorragend geeignet, um bisher unbekannte Endokrine Disruptoren zu charakterisieren.

Anhand der im Projekt erprobten Verfahren lässt sich eine Reihe von methodischen Aspekten herausarbeiten, die beim Einsatz von Biotests zur Charakterisierung der Endokrinen Aktivität von komplexen Proben entscheidend sind. Biotests eignen sich in besonderer Weise für eine integrierte Betrachtung des endokrinen Potentials, da sie die biologischen Effekte aller in den Proben vorhandenen Substanzen abbilden und die Effekte von nicht identifizierten Komponenten und potentiellen Mischungen mit einbeziehen.

Die Anwendung mehrerer Biotests mit dem gleichen Endpunkt (z.B. östrogene Aktivität) verringert das Risiko von falsch-negativen oder -positiven Ergebnissen. Die Untersuchung des antagonistischen Potentials liefert zusätzlich wertvolle Informationen über antiöstrogen und antiandrogen aktive Substanzen, welche agonistische Effekte maskieren können.

Bei der Probenaufbereitung und -applikation für Biotests besteht ein erheblicher Entwicklungs- und Optimierungsbedarf. Der Vergleich der untersuchten Methoden machte deutlich, dass viele gebräuchliche Extraktionsmethoden nicht in der Lage sind, endokrin aktive Komponenten aus komplexen Proben aufzureinigen. Zusätzlich kann die inadäquate Aufbereitung und Applikation der Proben im Biotest zum Verlust der aktiven Substanzen führen.

Für nicht standardisierte Verfahren ist zudem die Qualitätssicherung bei der Erhebung von Biotestdaten entscheidend. Dies kann durch die Definition strenger Validitätskriterien und

das Mitführen adäquater Kontrollen/Blindwerte gewährleistet werden. Auch bei der Auswertung von In-vitro-Daten können erhebliche Unsicherheiten generiert werden. Im Projekt wurde deshalb ein Datenanalyseverfahren entwickelt, welches diese Unsicherheiten minimiert.

Dass Kunststoffe eine Reihe endokrin wirksamer Substanzen enthalten und freisetzen können, konnte im vorliegenden Projekt mit Hilfe von Biotests bestätigt werden. Somit können Kunststoffe als relevante und bisher unterschätzte Quelle für die Exposition von Mensch und Umwelt mit endokrin aktiven Substanzen angesehen werden. Die Daten legen den Schluss nahe, dass viele dieser bioaktiven Substanzen bisher nicht beschrieben sind. Eine Vorhersage der Effekte von Kunststoff-assoziierten Endokrinen Disruptoren kann erst erfolgen, wenn die entsprechenden Komponenten identifiziert und toxikologisch charakterisiert sind. Hier besteht somit ein erheblicher Forschungsbedarf.

Summary and conclusions

Besides numerous social benefits, the exponentially growing production and often short-term use of plastic materials involve disadvantages, e.g. the accumulation in the environment. In addition, chemicals released by plastic may lead to an exposure of humans and the environment. In this context, hormonally active compounds (endocrine disruptors) are of special interest.

The present project aims to characterise the exposure pathways for endocrine disruptors from plastic materials. To achieve this, the migration of endocrine active compounds from plastic is evaluated with a focus on food packaging. A bioassay-based approach was used for the investigation and characterisation of endocrine activity because bioassays integrate the effects of so-far unidentified chemicals and potential mixtures. Here, the adaption and optimisation of biological and chemical methods is a crucial aspect.

The project was carried out in three phases: in vitro screening of (1) plastic food packaging, (2) preforms, and (3) the identification and characterisation of selected chemicals. In parallel work packages, methods for migration studies, extraction, sample preparation, and bioassays were developed and optimised.

Migration experiments with food packaging and plastic preforms (pellets) were conducted according to an EU-standardised method. The results demonstrated a leaching of estrogen-like compounds from several types of plastic. In total, 17% of the packaging samples and 33% of the preforms were estrogenic in the Yeast Estrogen Screen (YES). The detection of complex migration profiles provides evidence for an additional leaching of anti-estrogenic chemicals that is very prominent in many samples. Anti-estrogenic activity was observed in 44% of the packaging samples and in 33% of the preforms. Based on these data it appears probable that the migration of several, diverse-acting endocrine disruptors results in complex migration profiles. An alternative migration method yielded samples that were analysed in the E-Screen. In this bioassay 38% of the plastic preforms exhibited estrogenic activity.

When comparing the different types of polymers, no consistent trend was observed concerning the leaching of endocrine activity from a specific material. In case of packaging, estrogenic activity was predominantly detected in samples made from polyethylene terephthalate (PET) and polystyrene (PS). Anti-estrogenic effect outbalanced in polyethylene (PE) and polypropylene (PP) materials. Likewise, the results for plastic preforms are heterogeneous: Anti-estrogenic compounds predominantly migrate from LDPE, PET, and PS whereas estrogenic activity was present in samples from PE and PP. The polymer's individual processing and the application of diverse additives in the formulation might explain these findings.

In an exploratory study, we analysed extracts of several plastic food packaging for their activity on hormone receptors that are less investigated. Despite the limited number of samples, agonists of the estrogen receptor (PE or PVC), the retinoid X receptor (PP, PS), and the vitamin D receptor were extracted. Some extracts exhibited prominent endocrine activity, e.g. 30 µg TBT-equivalents per gram polypropylene. No agonistic activity was detectable for the thyroid receptor. A theoretical exposure scenario for marine molluscs was based on these in vitro data and provided evidence that endocrine disruptors from plastic materials may result in actual effects in the environment.

We exemplarily applied the methods developed and optimised within the project to the model of bottled mineral water. In the YES 60% of the products contained a significantly elevated estrogenic activity with a mean potency of 18 ng EEQ per litre and a maximum potency of 75 ng EEQ per litre. Several solid phase extraction (SPE) methods were applied to isolate estrogen-like compounds from bottled water. One of those methods yielded extracts that were estrogenic in the E-Screen. In accordance to the YES, 60% of the samples induced significant estrogenic effects.

When comparing the packaging materials glass and PET, data from both bioassays suggest that the plastic packaging is one source of the estrogenic contamination. To follow up this hypothesis, we conducted an *in vivo* experiment with the model organism *Potamopyrgus antipodarum*. Over a period of 56 days, the estrogen-sensitive mollusc was cultured in glass and plastic PET water bottles filled with defined medium. Compared to specimen from glass bottles, the reproduction of *P. antipodarum* from plastic bottles was doubled. These results indicate the migration of chemicals from PET that induce estrogenic effects *in vivo*.

To investigate the chemicals responsible for the estrogenic activity in bottled water we employed several analytical techniques (GC-MS, LC-MS/MS) and identified some well-known endocrine disruptors. Compounds from the chemical class of phthalates were most frequently detected. Qualitatively, we detected DEP, DIBP, DBP, and DEHP in extracts of PET and DMP, DIBP, DBP, as well as D-HexP in bottled water. In addition, estrogen-like alkylphenols (Nonylphenol and Octylphenol) and antioxidants (para-tert-Butylphenol, 2,4-Di-tert-butylphenol) were present in the plastic. In bottled water we identified additional bioactive compounds, e.g. butylated hydroxyanisole, tributyl phosphate and 9-Octadecenamide.

An additional SPE method optimized for the enrichment of polar compounds extracted potent antagonists of the estrogen and androgen receptor from bottled water. In case of anti-androgenic activity an inhibition of 40-60% was detected in 50% of the products. This samples were analysed using high resolution mass spectrometry (Orbitrap-MS). From the plethora of detected compounds, a substance with the exact mass of 363.1992 Da [$M+H^+$] was significantly correlated with the biological activity. We conducted MSⁿ experiments to elucidate the molecule's structure. In conclusion, the combination of sensitive biological and analytical techniques provides a suitable tool to characterize novel endocrine disruptors.

On the basis of the methods optimised and applied within the project we elaborated a set of aspects that are crucial for the applicability of bioassays to characterise the endocrine activity of complex samples. Bioassay provide an ideal tool to investigate the integrated endocrine potential because they examine the effects of the full range of compounds present in a sample including unidentified chemicals and potential mixtures.

The application of multiple bioassays investigating the same endpoint (e.g. estrogenic activity) reduces the risk of false-negative and false-positive findings. Additionally, the evaluation of antagonistic activity provides information on the presence of anti-estrogens and anti-androgens that might mask agonistic effect.

Concerning the preparation and application of samples in bioassay there appears to be a considerable need for adaption and optimisation. When comparing different methods, it becomes obvious that many of the commonly employed extraction techniques fail to isolate endocrine disruptors from complex samples. Moreover, an inadequate sample preparation and application in the bioassay might result in the loss of bioactive compounds.

Because currently *in vitro* bioassays are not standardised quality assurance is a key factor for generating sound bioassay data. This can be achieved by defining and adopting a stringent regime of validity criteria, suitable controls and blanks. However, data analysis might introduce additional inaccuracy. Within the project we therefore developed a data analysis strategy that minimises this uncertainty.

Employing a bioassay-based approach we provide evidence for the presence and migration of endocrine disruptors from plastic materials. In that sense, polymers represent a relevant but currently neglected source of human and environmental exposure to endocrine active compounds. The data presented imply that many of those chemicals are so-far unidentified. The assessment of potential effects of plastic-associated substances therefore depends on the identification and toxicological characterisation of the corresponding compounds. Hence, there is substantial need for further research.

1 Einleitung: Endokrine Disruptoren aus Kunststoffen – Eine vernachlässigte Expositionsquelle?

Die positiven Eigenschaften von Kunststoffen (Haltbarkeit, Formbarkeit, Leichtigkeit etc.) und die Vielfalt von verfügbaren Polymeren führen zum Einsatz dieser Materialien in fast allen Produkten und Lebensbereichen (THOMPSON *et al.* 2009a). Seit der Einführung von Kunststoffen zu Beginn des vorigen Jahrhunderts (Bakelite, 1907) hat diese Entwicklung ins sogenannten Plastik-Zeitalter geführt (THOMPSON *et al.* 2009c). Der Einsatz von Kunststoffen ist seitdem unmittelbar mit dem technischen und medizinischen Fortschritt verknüpft und hat somit viele gesellschaftliche Vorteile mit sich gebracht. Auch in Zukunft wird der Einsatz von Kunststoffen entscheidend zum Fortschritt beitragen (ANDRADY & NEAL 2009). Abseits all dieser Vorteile müssen allerdings auch die Nachteile, die sich aus der intensiven Verwendung von Kunststoffen ergeben, in Betracht gezogen werden. Eine aktuelle Themenausgabe der Zeitschrift PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY B – BIOLOGICAL SCIENCES befasst sich unter dem Titel „*Plastics, the environment and human health*“ (THOMPSON *et al.* 2009b) umfassend mit all diesen Aspekten und macht deutlich, dass die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit möglichen Auswirkungen von Kunststoffen in der Umwelt ein neues, expandierendes Forschungsfeld darstellt.

1.1 Kunststoff in der Umwelt

Die Kunststoffproduktion unterliegt einem fast exponentiellen Wachstum (vgl. Abbildung 1 A). Mit einer jährlichen Wachstumsrate von 9% seit 1950 hat das globale Produktionsvolumen von Kunststoffen im Jahr 2008 245 Millionen Tonnen erreicht (PLASTICSEUROPE 2009). Der europäische Anteil an der globalen Kunststoffproduktion beträgt 25%, der Deutschlands 7,5% (Abbildung 1 B). Der Hauptanteil des produzierten Kunststoffs wird für verbrauchernahe Produkte verwendet (Abbildung 1 D). Hierbei machen Verpackungen (38%) den größten Teil aus, gefolgt von der Anwendung in Kraftfahrzeugen (7%) und Elektrik/Elektronik (6%). Am Beispiel von Kunststoffverpackungen – 18,4 Millionen Tonnen wurden 2008 in Europa produziert – wird deutlich, dass Kunststoffe in großem Umfang im ständigen und direkten Kontakt mit dem Menschen und der Umwelt sind. So wurde in Europa (EU-27) im Jahr 2006 eine Stückzahl von 99 Milliarden Kunststoffbehältern (Flaschen etc.) produziert (EUROPEAN COMMISSION 2009).

Kein anderer Werkstoff wird so weitreichend und vielfältig eingesetzt wie Kunststoff. Selbst wenn die fünf Polymere Polyethylen (PE), Polyethylenterephthalat (PET), Polypropylen (PP), Polystyren (PS) und Polyvinylchlorid (PVC) mit 75% den Hauptanteil am Europäischen Verbrauch repräsentieren (Abbildung 1 C, Stand 2008), gibt es eine Vielzahl weiterer Materialien (u.a. Polyurethan, Epoxydharze und Polycarbonate), die ebenfalls in relevanten Mengen eingesetzt werden. Zudem wird jeder Kunststofftyp bei der sogenannten Compoundierung für die spezifische Anwendung, etwa durch die Einarbeitung von Additiven, optimiert.

Obwohl keine publizierten Daten zum Kontakt mit Kunststoff vorliegen, machen diese Zahlen deutlich, dass Kunststoff wahrscheinlich das Material ist, mit dem der Mensch am häufigsten in Kontakt kommt. Daten aus dem humanen Biomonitoring zeigen, dass Kunststoffe eine relevante Expositionsquelle sind: Phthalate und Bisphenol A können in den meisten humanen Matrices und Populationen detektiert werden; die Hauptquelle dieser Substanzen sind Kunststoffe (KOCH & CALAFAT 2009; TALSNESS *et al.* 2009).

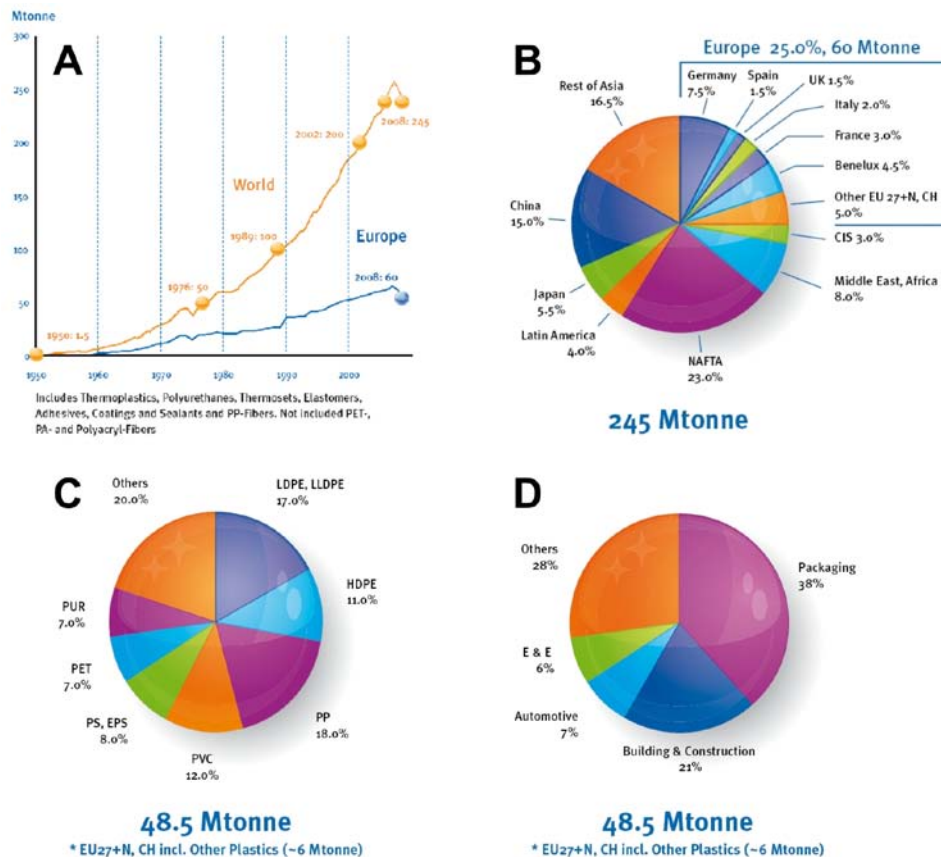


Abbildung 1: Kunststoffproduktion im Überblick. Weltweite Produktionsmengen (A), regionaler Anteil an der Produktion (B), Anteil der verschiedenen Kunststofftypen (C) und Anwendungen (D), verändert nach PlasticsEurope (2009).

Ein Problem ist der meist lineare Produktlebenszyklus von Kunststoffen: Hergestellt aus Erdöl (ca. 8% der weltweiten Verbrauchs), wird ca. die Hälfte der Kunststoffe zur Produktion kurzlebiger Konsumgüter (Lebensdauer < 1 Jahr) eingesetzt, welche nach ihrer Verwendung schnell entsorgt werden (HOPEWELL *et al.* 2009). Dieses lineare Nutzungsmuster generierte im Jahr 2008 ca. 25 Millionen Tonnen Kunststoffabfall in der EU (PLASTICSEUROPE 2009), an dem Verpackungen den größten Anteil ausmachen (HOPEWELL *et al.* 2009). Trotz intensiver Anstrengungen zu Abfallmanagement und Recycling werden End-of-life-Kunststoffe in relevanten Mengen in die Umwelt eingetragen und verbleiben dort für Jahrzehnte, wenn nicht gar Jahrhunderte (THOMPSON *et al.* 2009a).

Während die Akkumulation von Kunststoff im marinen Ökosystem besser untersucht ist, gibt es einen klaren Mangel an Daten zu terrestrischen und limnischen Habitaten (THOMPSON *et al.* 2009a). BARNES *et al.* (2009) und RYAN *et al.* (2009) diskutieren die Akkumulation und das Verhalten von Kunststoffen im marinen Ökosystem und beschreiben Ansätze zum Monitoring. Eine schematische Übersicht über die Quellen und den Transport von Kunststoffen in der marinen Umwelt ist in Abbildung 2 dargestellt; allerdings ist das wissenschaftliche Verständnis dieses hoch-dynamischen Systems bisher noch unvollständig (RYAN *et al.* 2009).

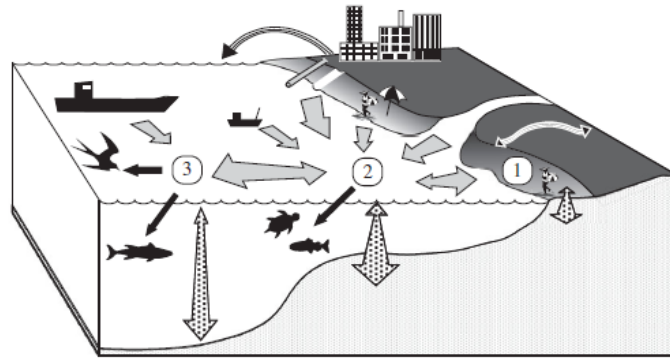


Abbildung 2: Haupteintragspfade und Transport von Kunststoffen in der Umwelt (aus RYAN *et al.* 2009).

Auch wenn die räumliche und zeitliche Entwicklung des Kunststoffeintrags und -verhaltens aufgrund unvollständiger Monitoringdaten nicht abschließend geklärt werden kann, wird von einer grundsätzlichen Zunahme der Mengen im marinen Ökosystem ausgegangen. Kunststoffe und Kunststofffragmente werden ubiquitär an Küstenlinien, in küstennahen Gewässern und auf hoher See gefunden (THOMPSON *et al.* 2009a). Sie akkumulieren aufgrund von geringer Dichte oder Lufteinschlüssen besonders an der Oberfläche, gelangen aber durch Zerfall und Aufwuchs in die Tiefsee, welche die letzte Senke für Kunststoffe darstellt (BARNES *et al.* 2009). Ebenso wie die Verteilung variiert auch die Quantität von Kunststoffen in der Umwelt: An manchen Küstenlinien werden mehr als 100.000 Kunststoffstücke pro Quadratmeter gefunden, an der Oberfläche des Ozeans sind es bis zu 3,5 Millionen Teile pro Quadratkilometer (Details in THOMPSON *et al.* 2009a).

Das Auftreten großer Mengen an Kunststoffen in der Umwelt ist weit mehr als ein ästhetisches Problem: Bisher ist die Aufnahme von oder das Verfangen in Kunststoffen für mehr als 260 marine Spezies beschrieben. Betroffen sind insbesondere Invertebraten, Schildkröten, Fische, Seevögel und Säuger (GREGORY 2009). Neben Verwundungen kommt es zur Beeinträchtigung der Nahrungsaufnahme und Beweglichkeit, die zu einer verminderten Reproduktionsleistung oder erhöhten Mortalität der betroffenen Individuen führen kann (THOMPSON *et al.* 2009a). Abseits dieser akuten Effekte verdienen besonders Mikrofragmente Beachtung. Diese kleinen Kunststoffpartikel, die vor allem durch den Zerfall größerer Teile entstehen, können an Küstenlinien bis zu 10% des Sedimentgewichts ausmachen (BARNES *et al.* 2009). Zwar ist bekannt, dass Kunststoffmikrofragmente von Invertebraten aufgenommen werden können (BROWNE *et al.* 2008), potentielle Effekte sind bisher jedoch nicht untersucht. In der aquatischen Umwelt wird Kunststoff mittlerweile als eigenes Kompartiment betrachtet, da es ebenso wie Wasser, Sediment und Atmosphäre Umweltchemikalien transportieren und anreichern kann.

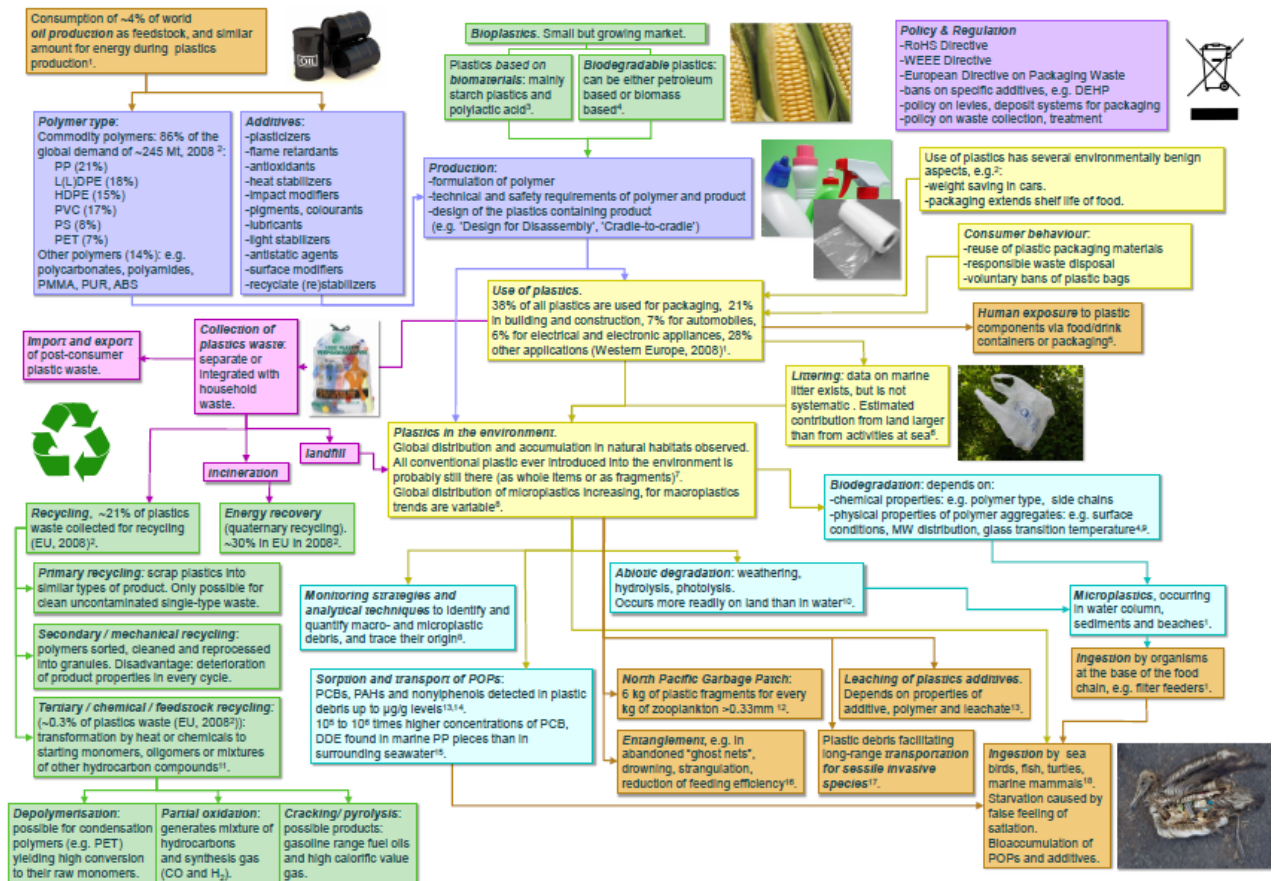


Abbildung 3: Lebenszyklus von Kunststoffen. Produktion, Verwendung, Freisetzung in die Umwelt und Effekten (aus JONKER, Posterpräsentation, SETAC Europe, 2010).

Die enorme Komplexität des Produktionszyklus, des Verhaltens und der Effekte von Kunststoffen macht Abbildung 3 deutlich. Trotz der noch bestehenden Wissenslücken bei der Untersuchung der „Exposition“ von Mensch und Umwelt mit Kunststoffen und den sich daraus ergebenden Effekten machen die zusammengefassten Informationen deutlich, dass es sich um ein globales Problem handelt.

1.2 Kunststoff als Expositionsquelle für Chemikalien

Zu Projektbeginn wurden Daten zur Migration von Chemikalien aus Kunststoffverpackungen zusammengestellt, welche in Tabelle 1 zusammengefasst sind. Soweit es sich um bekannte Endokrine Disruptoren handelt, ist dies in der Tabelle vermerkt, jedoch sind die toxikologischen Eigenschaften einiger Komponenten bisher noch unbekannt. Die aus Kunststoff auslaugenden Komponenten gehören zu einer Reihe von Stoffklassen, u.a. zur Klasse der Bisphenole und Alkylphenole, die z.B. als Monomer (BPA), Antioxidanz (NP) oder Stabilisator (TNPP) bei der Kunststoffherstellung eingesetzt werden. Adipate (DEHA) und Phthalate (DEHP, BBP, DBP, DMP, DEP) werden hauptsächlich als Weichmacher eingesetzt; die butylierten Anisol- und Toluolderivate BHA und BHT finden als Antioxidantien in Plastik Anwendung.

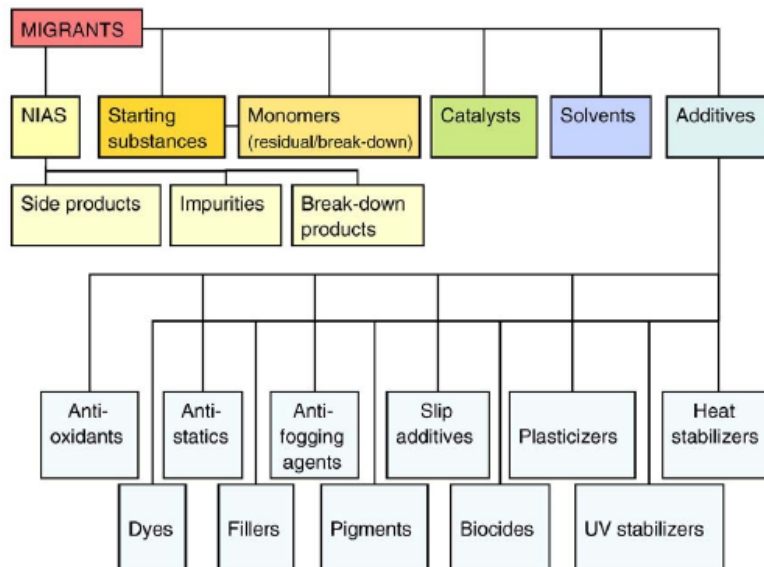
Tabelle 1: Übersicht über aus Kunststoff migrierende Substanzen. Dargestellt sind Substanzen, die aus dem Verpackungsmaterial stammen und im Lebensmittel nachgewiesen wurden oder solche, die in Migrationsversuchen mit Surrogaten (in Klammern) gefunden wurden.

Substanz mit CAS	Migration aus	in Lebensmittel	maximale Konz.	Referenz	endokrine Aktivität
Bisphenol A (BPA) 80-05-7	PET	Mineralwasser	10 ng/L	TOYO'OKA 2000	östrogen, antian- drogen
	PC	Mineralwasser	4,7 µg/L	McNEAL 2000	
	Dose	Gemüse	23 µg/L	McNEAL 2000	
	Verbundverp.	Milch	2,64 µg/kg	CASAJUANA 2004	
	HDPE	Milch	1,29 µg/kg	CASAJUANA 2004	
	Dose	Gemüse	76,3 µg/kg	BROTONS 1995	
	Dose	Energydrink	3,4 µg/L	BRAUNRATH 2005	
	Dose	Gemüse	35 µg/kg	BRAUNRATH 2005	
	PC	Mineralwasser	4,7 ng/L	BILES 1998	
Nonylphenol (NP) 84852-15-3 (25154-52-3)	PET	Mineralwasser	78 ng/L	TOYO'OKA 2000	östrogen
	HDPE	Mineralwasser	180 ng/L	LOYO-ROSALES 2004	
	HDPE	Milch	27,7 µg/kg	CASAJUANA 2004	
	PVC	Mineralwasser	300 ng/L	LOYO-ROSALES 2004	
	Verbundverp.	(Säfte)	7 µg/L	McNEAL 2000	
	Vinyldichtung	(Babynahrung)	81 µg/kg	McNEAL 2000	
	Verbundverp.	Milch	34,8 µg/kg	CASAJUANA 2004	
Octylphenol (OP) 140-66-9	PET	Mineralwasser	< 8 ng/L	LOYO-ROSALES 2004	östrogen
	HDPE	Mineralwasser	12 ng/L	LOYO-ROSALES 2004	
	PVC	Mineralwasser	< 8 ng/L	LOYO-ROSALES 2004	
TNPP, 26523-78-4	PVC	(Wasser)	8,5 µg/L	McNEAL 2000	unbekannt
DEHA 103-23-1	PET	(Wasser)	0,049 µg/L	EMPA 2003	(östrogen), (antian- drogen)
	PET	(Wasser)	32,8 ppm	LILYA 2001	
	PET	Polymer selbst	560 µg/g	KIM 1990	
	PVC	(Wasser)	85 µg/L	ZYGOURA 2005	
DEHP/BEHP/ DOP 117-81-7	PET	Polymer selbst	820 µg/g	KIM 1990	(östrogen)
	PET	Mineralwasser	3,22 mg/L	BISCARDI 2003	
	PET	(Wasser)	0,71 µg/L	EMPA 2003	
	PET	Mineralwasser	0,64 ppm	HIGUCHI 2004	
	Glas	Mineralwasser	0,35 ppm	HIGUCHI 2004	
	HDPE	Milch	27,2 µg/kg	LOYO-ROSALES 2004	
	Verbundverp.	Milch	24,7 µg/kg	LOYO-ROSALES 2004	
	unbekannt	Öl	3,08 mg/L	DI BELLA 2004	
	Produktion	(Öl)	520 ppm	DI BELLA 2001	
	unbekannt	(Babynahrung)	51 µg/kg	McNEAL 2000	
BBP 85-68-7	HDPE	Milch	2,88 µg/kg	LOYO-ROSALES 2004	östrogen
	Verbundverp.	Milch	2,93 µg/kg	LOYO-ROSALES 2004	
	unbekannt	Öl	4,45 mg/L	DI BELLA 2004	
DBP 84-74-2	PET	Polymer selbst	220 µg/g	KIM 1990	östrogen
	PCV	(Babynahrung)	11 µg/kg	McNEAL 2000	
	HDPE	Milch	50,3 µg/kg	LOYO-ROSALES 2004	
DIBP, 84-69-5	Verbundverp.	Milch	9,49 µg/kg	LOYO-ROSALES 2004	östrogen
	Produktion	(Öl)	490 ppm	DI BELLA 2001	
DEP 84-66-2	PET	Polymer direkt	120 µg/g	KIM 1990	östrogen
	HDPE	Milch	85,3 µg/kg	LOYO-ROSALES 2004	
	Verbundverp.	Milch	72 µg/kg	LOYO-ROSALES 2004	
DMP 131-11-3	HDPE	Milch	1,19 µg/kg	LOYO-ROSALES 2004	unbekannt
	Verbundverp.	Milch	1,75 µg/kg	LOYO-ROSALES 2004	

Tabelle 1: Fortsetzung

Substanz mit CAS	Migration aus	in Lebensmittel	maximale Konz.	Referenz	endokrine Aktivität
BHT	PET	(Öl)	5,62 ppm	TAWFIK 1999	unbekannt
128-37-0	PE (Deckel)	Mineralwasser	2,1 ppm	HIGUCHI 2004	
BHA, 25013-16-5	PET	(Öl)	5,1 ppm	TAWFIK 1999	östrogen
PET-Oligomere 25038-59-9	PET	(Olivenöl)	4,1 mg/dm ²	LÓPEZ-CERVANTES 2003	unbekannt
Terephthalsäure 100-21-0	PET	Polymer selbst	19,7 µg/g	KIM 1990	unbekannt
Pyrogallol, 87-66-1	PET	Polymer selbst	0,6 µg/g	KIM 1990	unbekannt
Tinuvin P	PET	(Sojaöl)	3,1 µg/L	MONTEIRO 1999	unbekannt
Tinuvin 234	PET	(Alkohol)	0,2 mg/kg	BEGLEY 2004	unbekannt
Acetaldehyd	PET	Mineralwasser	260 µg/L	SUGAYA 2001	unbekannt
Formaldehyd	PET	Mineralwasser	59 µg/L	SUGAYA 2001	unbekannt

In einem im Jahr 2009 erschienenen Übersichtsartikel zu endokrin wirksamen Substanzen in Kunststoffverpackungen (MUNCKE 2009) werden die potentiell aus dem Polymer migrierenden Substanzen wie folgt klassifiziert: Verunreinigungen (NIAS, non intentionally added substances), Ausgangsmaterialien (Monomere, Starter, Katalysatoren), Lösemittel und Additive (Abbildung 4). Hierbei sind die Kunststoffadditive eine besonders vielfältige Substanzgruppe, zu denen u.a. Antioxidantien, Farbstoffe, UV-Filtersubstanzen, Stabilisatoren und Weichmacher gehören. Als Weichmacher ist insbesondere die Stoffklasse der Phthalate von wissenschaftlichem Interesse, da diese nicht kovalent an das Polymer gebunden sind und aus dem Kunststoff auslaugen können. Viele Phthalate sind zudem Endokrine Disruptoren (UMWELTBUNDESAMT 2007).

**Abbildung 4: Klassifizierung potentiell migrierender Substanzen aus Kunststoffen (aus MUNCKE 2009).**

Auch Bisphenol A, das Monomer bei der Herstellung von Polycarbonat-Kunststoffen (PC), ist ein gut beschriebener Endokriner Disruptor (TALSNESS *et al.* 2009), der u.a. aus epoxydharzbeschichteten Konservendosen und PC-Trinkflaschen migrieren kann (UMWELTBUNDESAMT 2010). Über diese beiden gut untersuchten endokrin wirksamen Substanzen und Substanzgruppen hinaus legt MUNCKE (2009) eine Liste von 50 bekannten und potentiellen Endokrinen Disruptoren vor, deren Verwendung in Lebensmittelkontaktmaterialien behördlich

zugelassen ist. Da Lebensmittelkontaktmaterialien einer vergleichsweise strikten Regulation unterliegen, ist es wahrscheinlich, dass weniger stark regulierte Kunststoffe für andere Anwendungen (z.B. Verrohrung, Baustoffe, Einrichtungsgegenstände etc.) ebenfalls Substanzen enthalten, welche als endokrin aktiv klassifiziert werden.

Vor diesem Hintergrund wurden im vorliegenden Forschungs- und Entwicklungsprojekt Kunststoffe als Expositionsquelle für endokrin wirksame Substanzen charakterisiert. Anders als in bisherigen Studien wurde hier ein Forschungsansatz auf Basis von biologischen Testverfahren (Biotests) gewählt. Da viele der kunststoffassoziierten Chemikalien bisher analytisch und (öko)toxikologisch nicht untersucht sind, wird die endokrine Aktivität aus Kunststoffen v.a. mit Hilfe von In-vitro-Assays analysiert. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass potentielle Effekte unbekannter Substanzen und Kombinationswirkungen erfasst werden können.

2 Aufgaben und Ziele des Projektes

Vor dem oben genannten Hintergrund hat das Vorhaben folgende Ziele:

- (1) Untersuchung der Migration endokrin aktiver Komponenten aus Kunststoffen, insbesondere Lebensmittelverpackungen,
- (2) Erfassung und Charakterisierung der endokrinen Aktivität mittels biologischer Wirkungsanalytik sowie
- (3) ihre stoffliche Zuordnung durch chemische Analytik.

Prioritär sollen zur Erreichung dieser Ziele geeignete Testmethoden (Biotests) entwickelt und verifiziert werden. Neben der Optimierung der Biotests selbst, war hierfür auch die Entwicklung bzw. Anpassung geeigneter Migrationsverfahren und Methoden zur Probenaufbereitung notwendig. Die Arbeiten im Bereich der Methodenentwicklung und -optimierung werden im Kapitel 3 beschrieben. Zur Identifizierung von stofflichen Ursachen und Expositionspfaden für bisher nicht erklärbare endokrine Effekte wurden im Projekt verschiedene analytische Verfahren verwendet, die im Kapitel 6 dokumentiert sind. Zudem wurden verschiedene Strategien zur wirkbezogenen Analytik angewandt, um bisher nicht identifizierte endokrin aktive Substanzen zu charakterisieren (Abschnitte 6.3, 6.5). Die Relevanz von Kunststoffen als Expositionsquelle für Endokrine Disruptoren wird in einem breiteren Kontext im Kapitel 8 diskutiert. Möglichkeiten zur Einbindung der im Projekt gewonnenen Erkenntnisse in zukünftige Forschungsvorhaben und in die regulatorische Arbeit werden im Kapitel 9 aufgezeigt.

Das Projekt gliederte sich in drei Projektphasen: In-vitro-Screening von Lebensmittelverpackungen (Phase A), von Kunststoffrohformen (Phase B) und Identifizierung und Charakterisierung ausgewählter Substanzen (Phase C). Parallel zu diesen Projektphase wurden Arbeitspakete zur Methodenentwicklung im Bereich Migrationsstudien, Extraktion, Probenaufbereitung und Biotests ausgeführt. Folgende Diplomarbeiten wurden im Projekt oder angrenzenden Themenbereichen durchgeführt und sind z.T. in den vorliegenden Abschlussbericht eingeflossen: Julia Horak (HORAK 2006), Eva Luther (LUTHER 2007), Maximilian Behr (BEHR 2009) und Isabell Jersch (JERSCH 2010). Die chemische Analytik wurde im Rahmen einer Forschungskooperation mit der Bundesanstalt für Gewässerkunde (Dr. Thomas Ternes, Dr. Michael Schlüsener, Bianca Stolzenberger) realisiert.

3 Methodische Aspekte: Eignung von Biotests zur Untersuchung des endokrinen Potentials aus Kunststoffen

Eine zentrale Aufgabe des Projektes ist es, die Eignung von biologischen Testverfahren für die Untersuchung von Endokrinen Disruptoren aus Kunststoffen zu erproben und zu beurteilen. Im Projektverlauf wurden deshalb nicht nur entsprechende In-vitro-Verfahren für diese Fragestellung optimiert und etabliert, sondern auch diverse Migrations- und Extraktionsverfahren erprobt und verglichen, sowie Maßnahmen zur Qualitätssicherung evaluiert.

An dieser Stelle sollen kritische Aspekte beleuchtet und diskutiert werden, die bei der Untersuchung von Kunststoffen auf Endokrine Disruptoren relevant sind. Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Methoden ist als Anhang beigefügt.

3.1 Probenauswahl: Vielfalt vs. Repräsentativität

Die durch die hersteller- und anwendungsspezifische Veredelung bedingte Vielfalt macht es schwer, generalisierende Aussagen über die Freisetzung von Endokrinen Disruptoren aus einem bestimmten Kunststofftyp zu treffen. Dies ist nur dann möglich, wenn bekannte Endokrine Disruptoren essentiell für die Herstellung eines Kunststofftyps sind. Ein Beispiel hierfür ist Weich-PVC, bei dem Phthalate (insbesondere DEHP) als Weichmacher eingesetzt werden (UMWELTBUNDESAMT 2007). Repräsentativität kann vor dem Hintergrund der Vielfalt in Material, Verwendung und Formulierung daher nur schwer erreicht werden. Das vorliegende Projekt fokussiert deshalb auf Kunststoffe, die als Verpackungsmaterialien Verwendung finden, da diese mehr als ein Drittel des Kunststoffbedarfes ausmachen (PLASTICSEUROPE 2009). Lebensmittelverpackungen kommen in diesem Kontext eine besondere Bedeutung zu: Diese befinden sich als Bedarfsgegenstände nicht nur im unmittelbaren Kontakt mit Verbraucherinnen und Verbrauchern, sondern werden auch in relevanten Mengen in die Umwelt eingetragen (u.a. BROWNE *et al.* 2010).

Tabelle 2 liefert eine Übersicht über die im Rahmen des Projektes untersuchten Kunststofftypen. Es wurden sowohl Verpackungsmaterialien untersucht, welche direkt aus dem Einzelhandel bezogen wurden, als auch Rohmaterialien ausgewählter Kunststofftypen, welche in Granulatform von der kunststoffverarbeitenden Industrie bereitgestellt wurden. Diese Probenauswahl stellt sicher, dass (a) eine möglichst breite Auswahl an Kunststofftypen abgedeckt ist, (b) verbraucher- und umweltrelevante Bedarfsgegenständen (Verpackungen) untersucht werden und (c) ebenso die Vorformen dieser Produkte (Granulate) berücksichtigt werden.

Tabelle 2: Übersicht über die im Rahmen des Projektes untersuchten Kunststofftypen.

	PE	PET	PP	PS	PVC	others	total
packaging	10	12	7	4	0	4	37
raw material	4	7	1	3	1	5	21
total	14	19	8	7	1	9	58

Im Projekt werden Lebensmittelverpackungen in ihrer endgültigen Produktform, d.h. bedruckt, befüllt und verschlossen, verwendet, da diese Form mit Mensch und Umwelt in Kontakt kommt. Für die Aufklärung der im Folgenden beschriebenen Befunde wäre es zudem wünschenswert gewesen, den kompletten Lebenszyklus des Produktes von den Rohmaterialien (Granulat) über Vorformen (z.B. unbedruckte und unbefüllte Verpackung) bis

zum Endprodukt (Einzelhandel) zu untersuchen. Dies war aufgrund von Vorbehalten der Hersteller nicht zu realisieren und darüber hinaus im Projektzeitraum nicht leistbar. Für zukünftige Projekte sollte bereits im Vorfeld eine enge Kooperation mit den entsprechenden Herstellern etabliert werden. Dies würde die Probenbeschaffung erleichtern, den Austausch von Expertenwissen stimulieren und das Problembewusstsein auf Herstellerseite erhöhen.

3.2 Integrierte Betrachtung der endokrinen Aktivität

Der Einsatz von biologischen Testverfahren zur Untersuchung der endokrinen Aktivität aus Kunststoffen hat einen wesentlichen Vorteil: Anstelle einer isolierten Betrachtung von Einzelsubstanzen werden Biotests verwendet, um die gesamte endokrine Aktivität in Proben zu charakterisieren. Dieses Vorgehen erscheint angesichts des vorherrschenden Einsatzes der chemischen Analytik in diesem Forschungsfeld ungewöhnlich, bietet allerdings zahlreiche Vorteile:

- biologische Relevanz, da nicht die Konzentration einer Substanz, sondern deren biologischer Effekt bestimmt wird,
- Integration der Effekte komplexer Substanzgemische und somit die Betrachtung vom Mischtoxizität,
- Detektion der Effekte bisher unbekannter Endokriner Disruptoren, welche mittels gezielter Analytik nicht detektierbar wären.

Die hier vorgelegten Daten spiegeln alle drei Aspekte wider und verdeutlichen das große Potential von Biotests zur integrierten Betrachtung der endokrinen Aktivität (9.1). Es wird aber auch deutlich, dass die mit biologischen Testsystemen generierten Daten neue Herausforderungen an deren wissenschaftliche Interpretation und deren regulatorische Bewertung stellen (4.5, 9.3). Der Einsatz wirkorientierter Analytik im Projekt zeigt, dass die Kombination aus Biotests und instrumenteller Analytik ein leistungsfähiges Werkzeug zur Identifizierung von „neuen Problemstoffen“ darstellt (6.6).

3.3 Auswahl der In-vitro-Screens

Ebenso wie die Auswahl der Proben (3.1) ist die Wahl geeigneter Biotests essentiell für die Charakterisierung des endokrinen Potentials von Kunststoffen. Da der Fokus des Projektes auf der Charakterisierung des östrogenen Potentials von Kunststoffen liegt, werden insbesondere Biotests mit östrogen-abhängigen Endpunkten eingesetzt. In-vitro-Tests zur Bestimmung des östrogenen Potentials lassen sich in zwei große Kategorien einteilen:

(1) Reporterger-Assays für die Aktivierung des humanen Östrogenrezeptors α basieren auf dem Prinzip der rezeptorabhängigen Expression eines Reportergens (z.B. β -Galactosidase oder Luciferase), welches sich einfach quantifizieren lässt. Diese rekombinanten Systeme lassen sich entweder in Hefe (Yeast Estrogen Screen, YES) oder in verschiedenen Säugerzelllinien (ER-CALUX, MELN und T47D-KBluc) realisieren.

(2) Sogenannte Proliferationsassays basieren auf der hormonabhängigen Zellteilung bestimmter Krebszellen. Ein Beispiel hierfür ist der E-Screen, bei dem eine Brustkrebszelllinie (MCF7) rezeptorvermittelt und in Abhängigkeit von Östrogenen proliferiert. Endpunkt ist im Unterschied zu den Reporterger-Assays nicht die Aktivierung des Hormonrezeptors selbst, sondern die Veränderung der Proliferationsrate der Zellen.

Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die am häufigsten eingesetzten In-vitro-Tests zur Bestimmung der östrogenen Aktivität sowie eine Bewertung der Eigenschaften (nach LEUSCH *et al.* 2010).

Die Daten zur östrogenen Aktivität werden mit dem YES (ROUTLEDGE & SUMPTER 1996; WAGNER & OEHLMANN 2009) und dem E-Screen (SOTO *et al.* 1991; KÖRNER *et al.* 1999)

erhoben. Wann immer möglich, werden Proben in beiden Testsystemen untersucht, um die Möglichkeit von falsch-positiven und insbesondere falsch-negativen Ergebnissen zu minimieren. Die Assays werden ausgewählt, weil sie zu den am weitest verbreiteten Verfahren gehören und somit die Vergleichbarkeit der eigenen Resultate mit Literaturdaten gewährleistet ist. Zudem sind beide Verfahren robust, sensitiv und zur unentgeltlichen, nicht-kommerziellen Nutzung freigegeben.

Tabelle 3: Spezifische Aspekte verschiedener In-vitro-Assays zur Detektion östrogenen Aktivität (verändert nach LEUSCH *et al.* 2010).

assay	YES	ER-CALUX	MELN	KBluc	E-Screen
likeness to other assays	++	+++	-	+++	+++
ease of use	++	+	+	+	+
simple training	++	-	-	-	-
low maintenance and consumables cost	+++	-	+	+	+
free access/nonprofit use	+++	-	+++	++	+++
sensitivity	-	+++	++	++	++
robustness	-	++	++	++	++
reproducibility	++	+++	+	++	++
maturity (widespread use)	+++	++	+	+	+++
high-throughput screening	+++	+++	+++	+++	+++
quick results	++	++	++	++	-

Die Kombination verschiedener In-vitro-Assays ist vor dem Hintergrund Assay-spezifischer Vor- und Nachteile (Tabelle 3) sinnvoll. Allerdings kann nicht generell davon ausgegangen werden, dass die Daten aus verschiedenen In-vitro-Verfahren zu komplett konsistenten Ergebnissen führen. Ein Beispiel hierfür ist die Zellwand bei Hefe-basierten Systemen, welche unter Umständen das Eindringen von stark lipophilen Substanzen zum Wirkort verhindern kann und so zu falsch-negativen Befunden führt. Der zusätzliche Einsatz eines Säugerzell-basierten Systems überwindet diesen Nachteil.

Zusätzlich zu Rezeptoragonisten gelangen entsprechende Antagonisten verstärkt in den Fokus der Forschung. So kommen beispielsweise JOBLING *et al.* (2009) zu dem Ergebnis, dass v.a. Antiandrogene, also Androgenrezeptorantagonisten, neben den bereits bekannten Xenoöstrogenen für die Verweiblichung von Fischen verantwortlich sind. Die Studie belegt eindrucksvoll, dass eine Fokussierung auf Rezeptoragonisten ein nur unvollständiges Bild von der Expositionssituation mit Endokrinen Disruptoren liefert. Deshalb werden auch im vorliegenden Projekt In-vitro-Assays für antiöstrogene und antiandrogene Aktivität etabliert, optimiert (siehe Abs. 3.4) und eingesetzt. An Mineralwasserextrakten kann beispielhaft gezeigt werden, dass negative Ergebnisse im Test auf östrogene/androgene Aktivität keinesfalls die Abwesenheit endokrin aktiver Substanzen belegen: Vielmehr kann ein starkes antagonistisches Potential in einer Mehrzahl der Proben detektiert werden, das auf die Präsenz von potenten Antiöstrogenen und -androgenen schließen lässt (vgl. Abs. 5.2, 5.3). Dieses Beispiel macht deutlich, dass bei der Untersuchung des endokrinen Potentials von Umweltproben Rezeptoragonisten und -antagonisten gleichermaßen betrachtet werden müssen.

Weiterhin ist zu beachten, dass Östrogen- und Androgenrezeptoren lange Zeit eine herausragende Stellung bei der Erforschung Endokriner Disruptoren einnahmen. Jüngere Studien zeigen jedoch, dass eine ganze Reihe bekannter und neuer Endokriner Disruptoren in der Lage sind, weitere endokrine Systeme zu beeinflussen. Ein prominentes Beispiel ist Bisphenol A, welches anfänglich als Xenoöstrogen (KRISHNAN *et al.* 1993), später als

Antiandrogen (SOHONI & SUMPTER 1998) und schließlich als Thyroidrezeptorantagonist (MORIYAMA *et al.* 2002) beschrieben wird. Ähnlich wie das Thyroidsystem gewinnt auch die Untersuchung des Retinoid-X-Rezeptors (RXR) zunehmend an Bedeutung, da dieser an der Signaltransduktion vieler anderer endokriner Systeme beteiligt ist. Die Auslösung von Imposex bei marinen Prosobranchiern durch Organozinnverbindungen (OEHLMANN *et al.* 2007) könnte ebenso RXR-vermittelt sein (NAKANISHI 2008), wie Adipositas beim Menschen (GRUN & BLUMBERG 2009).

Um diesen Entwicklungen Rechnung zu tragen, werden im Projekt Hefe-basierte Testsysteme für Thyroidrezeptor α (TR α), Retinoid-X-Rezeptors α (RXR α) und Vitamin-D-Rezeptor (VDR) etabliert (Abs. 3.4.4). Diese werden im Rahmen einer exploratorischen Studie zur Untersuchung von Kunststoffextrakten verwendet (Abs. 4.6). Die Ergebnisse belegen, dass Kunststoffe durchaus auch Substanzen freisetzen, die diese „neuen“ Rezeptoren aktivieren können (Abs. 4.7). Dieses Beispiel verdeutlicht einmal mehr, dass eine möglichst breitgefächerte Herangehensweise bei der Untersuchung des endokrinen Potentials notwendig ist.

3.4 Etablierung und Optimierung der In-vitro-Verfahren

Im Rahmen des Projektes wurden eine Reihe von In-vitro-Assays etabliert, optimiert und an die spezifischen Bedingungen zur Testung von endokriner Aktivität aus Kunststoffen angepasst. Modifikationen werden vorgenommen, um die Empfindlichkeit der Assays zu steigern (YES), den Probendurchsatz und die Replikatzahl zu erhöhen (YES, E-Screen), eine Prüfung auf Antagonismus zu ermöglichen (YAES/YAAS) und bisher nicht untersuchte Rezeptoren in das Testprogramm zu integrieren (Yeast-Two-Hybrid-Assays). Ein weiterer Schwerpunkt der Optimierung liegt auf der Applikation der Proben im jeweiligen Biotest. Der YES wurde beispielsweise so modifiziert, dass unbehandelte Wasserproben untersucht werden können. Dieser Punkt wird ebenfalls in Abs. 5.3 diskutiert.

3.4.1 YES

Der verwendete YES-Stamm stammt von Prof. Dr. J. Sumpter (Brunel University) und basiert auf der von ROUTLEDGE & SUMPTER (1996) beschriebenen Methode. Für das vorliegende Projekt wurden einige Modifikationen vorgenommen, welche in WAGNER & OEHLMANN (2009) beschrieben sind. Durch die Verwendung von Lytikase (SCHULTIS & METZGER 2004) und CPRG als Substrat konnte die Empfindlichkeit des YES um eine Größenordnung im Vergleich zur ursprünglichen Methode gesteigert werden. Außerdem ermöglicht das entwickelte, zweistufige Verfahren die Bestimmung der Zellzahl vor der eigentlichen Messung der östrogenen Aktivität. Somit können im Gegensatz zur Originalmethode cytotoxische Effekte eindeutig quantifiziert und eine Verfälschung der Ergebnisse durch zusätzliche Toxizität ausgeschlossen werden. Zudem wurde die Replikatzahl pro Probe von ursprünglich vier auf acht erhöht, um eine höhere statistische Sicherheit zu erlangen.

Weitere Modifikationen haben es zudem ermöglicht, unbehandelte Wasserproben zu untersuchen. Dies hat im Gegensatz zur traditionellen Methode den Vorteil, dass keine Probenaufbereitung (z.B. SPE) nötig ist. Zwar ist es bei der direkten Testung von Wasserproben somit nicht mehr möglich, diese Proben in konzentrierter Form zu untersuchen, allerdings liefert eine Direkttestung wertvolle Zusatzinformationen, etwas über die Extraktionseffizienz bei der SPE (Abs. 5.3).

3.4.2 Antiscreens: YAES/YAAS

Yeast Antiestrogen/Antiandrogen Screen (YAES und YAAS) wurden im Projekt eingesetzt und optimiert, um Antagonisten am Östrogen- und Androgenrezeptor zu detektieren (vgl. Abs. 3.3). Die Versuchsdurchführung gleicht im Fall des YAES der des YES. Der YAAS wird mit einem rekombinanten Hefestamm durchgeführt, der den humanen Androgenrezeptor exprimiert (SOHONI & SUMPTER 1998). Das Prinzip der Antiscreens basiert auf der Koapplikation der natürlichen Liganden der Steroidrezeptoren mit den jeweiligen Proben.

Während 17 β -Östradiol und Testosteron im Antiscreen also die Aktivierung des Rezeptors und somit die Expression des Reportergens induzieren, wird deren Rezeptorbindung/-aktivierung durch potentielle Antagonisten blockiert. Entwicklungsarbeit bei den Antiscreens war v.a. im Bereich der optimalen Ligandenkonzentration und der Positivkontrollen nötig, da hierzu bei Projektbeginn keine geeigneten Literaturdaten vorlagen. Die methodischen Details der Antiscreens werden in (STALTER *et al.* 2010) beschrieben.

3.4.3 E-Screen

Die für den E-Screen verwendeten MCF7-Zellen stammen von Prof. Dr. A. Soto (Tufts University, Boston, MA). Der Test basiert auf der von ihr beschriebenen Methode (SOTO *et al.* 1991; SOTO *et al.* 1995) und zeichnet sich im Vergleich zum YES durch eine um eine Größenordnung höhere Sensitivität aus. Im Projekt konnte durch die Verwendung von 96-well-Mikrotiterplatten anstelle von ursprünglich 24-well-Platten Probendurchsatz und Replikatzahl deutlich erhöht werden (KÖRNER *et al.* 1998; KÖRNER *et al.* 1999).

Weiterhin wurden die Methoden zur Zellzahlbestimmung des Assays optimiert: Im Gegensatz zur traditionellen Quantifizierung mittels Zellkernzählung oder Sulforhodamin B-Färbung (Gesamtproteingehalt) wurde der MTT-Assay (metabolische Aktivität) eingesetzt, der bei geringerem Zeitaufwand eine höhere Sensitivität und Reproduzierbarkeit erzielt. In späteren Projektphasen wurde in Analogie zum sogenannten Alamar-Blue-Assay der Farbstoff Resurazin zur Quantifizierung verwendet (O'BRIEN *et al.* 2000; PALOMINO *et al.* 2002). Dieser erfordert bei gleicher Sensitivität deutlich weniger Ressourcen als der kommerziell erhältliche MTT-Assay. Eine detaillierte Methodenbeschreibung erfolgt in (WAGNER & OEHLMANN 2010).

3.4.4 Yeast-Two-Hybrid-Assays für RXR, TR und VDR

Um das Untersuchungsspektrum über das des Östrogen- und Androgenrezeptors hinaus auszuweiten, werden Testsysteme für zusätzliche nukleäre Rezeptoren (RXR α , TR α und VDR) aufgenommen. Die hierfür verwendeten Yeast-Two-Hybrid-Systeme stammen von Dr. D. Inoue (Osaka University) und sind in INOUE *et al.* (2009) beschrieben. Wenngleich hefebasiert, ist das Versuchsprinzip anders als das von YES und YAS (Abbildung 5): Die Hefestämme verfügen über ein Fusionsprotein aus dem jeweiligen Rezeptor mit einer DNA-Bindedomäne (DBD) sowie ein weiteres Fusionsprotein aus einem Aktivatorprotein (TIF2) mit einer Aktivator-domäne. Durch Ligandenbindung an den Rezeptor wird TIF2 rekrutiert, und das Reportergen LacZ kann exprimiert und wie beim YES/YAS quantifiziert werden. Im vorliegenden Projekt wurden die Yeast-Two-Hybrid-Assays abweichend von der beschriebenen Methode (NISHIKAWA *et al.* 1999) an die Methode des YES angepasst und durchgeführt (JERSCH 2010).

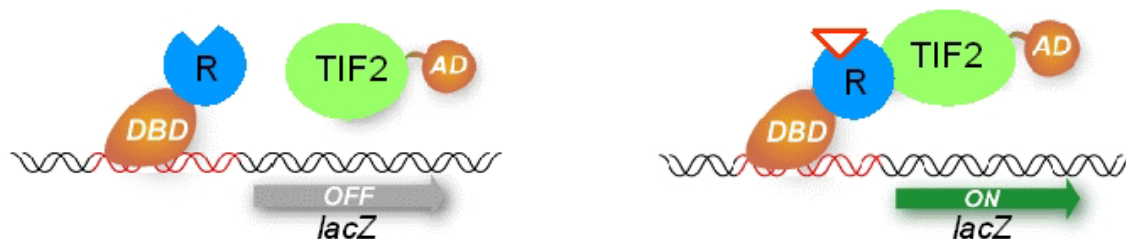


Abbildung 5: Funktionsprinzip der im Projekt verwendeten Yeast-Two-Hybrid-Systeme (aus JERSCH 2010).

3.5 Migrations- und Extraktionsverfahren für Kunststoffe

Migrationsversuche dienen der Bestimmung der spezifischen Migration von Chemikalien aus Lebensmittelkontaktmaterialien. Die Versuche werden auf Basis der Angaben der U.S. FDA

und der einschlägigen Direktive der Europäischen Kommission ausgeführt (EUROPEAN COMMISSION 2002; U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION 2002) und sind im Detail in den Anhängen A1 und A2 beschrieben. Hierbei wird Wasser als Simulanz verwendet (EUROPEAN COMMISSION 1985), weil davon auszugehen ist, dass Wasser das Auslaugen von Chemikalien aus Kunststoffen unter realen Umweltbedingungen gut simuliert. An dieser Stelle sei auf die Problematik des östrogen kontaminierten Reinstwassers verwiesen (LUTHER 2007). Aus diesem Grund wurde Leitungswasser, das keine detektierbare östrogene Aktivität aufweist, als Simulanz verwendet. In Abweichung zur Richtlinie werden zudem nicht nur am Ende der Migrationsversuche Proben entnommen und auf endokrine Aktivität untersucht, sondern zusätzliche Untersuchungen in kürzeren Zeitintervallen vorgenommen.

Obwohl die im Projekt durchgeführten Migrationsversuche wertvolle Informationen erbringen (siehe Abs. 4.5), ist deren Verwendung in der Rückschau durchaus kritisch zu betrachten: Die etablierten Methoden sind für die Untersuchung der Migration einzelner Chemikalien gut geeignet, allerdings integrieren Biotests die Effekte aller während des Versuches freigesetzten Substanzen. Vor dem Hintergrund der Mischtoxizität, insbesondere des Auslaugens von Rezeptoragonisten und -antagonisten aus dem gleichen Material, wird die Interpretation von Daten aus traditionellen Migrationsversuchen erschwert. Ein Beispiel wird in Abs. 5.2 diskutiert, bei dem aus PET auslaugende Antiöstrogene die Effekte der Östrogene überlagern. Die im Projekt erhobenen Daten zum Zeitverlauf während der Migration zeigen, dass sich das Auslaugen von endokrin aktiven Komponenten durchaus mit den gesetzlich festgelegten Methoden belegen lässt. Allerdings sind verschiedene Migrationskinetiken zu beobachten (siehe Abs. 4.1, 4.2 und 5.2), die darauf hin deuten, dass von einer komplexen Mischung endokrin aktiver Substanzen ausgegangen werden muss. Deshalb wurden weitere Migrationsmethoden (KATAOKA *et al.* 2002) erprobt (methodische Details in Anhang A3).

Im Gegensatz zur Migration wird bei der Extraktion eine deutlich höhere Substanzkonzentration aus der Probe herausgelöst. Extraktionsmethoden stellen also ein Worst-case-Szenario dar, mit dem sich die prinzipielle Präsenz von Endokrinen Disruptoren mit Hilfe von Biotests belegen lässt. Die Extraktion von Kunststoffen hat dabei den Vorteil, dass die gewonnenen Extrakte direkt im In-vitro-Assay untersucht werden können und keinerlei zeitliche Schwankungen (wie bei Migrationsversuchen) auftreten.

Verschiedene Extraktionsmethoden wurden im Projekt erprobt, da es in der Literatur nur wenige etablierte Verfahren zur Extraktion von Kunststoffen und Verpackungsmaterialien gibt. Neben Versuchen mit Soxhlet-Extraktion wurden hauptsächlich Ultraschall-assistierte Extraktionstechniken mit diversen Lösemitteln angewandt. Hierbei zeigte sich, dass nicht nur die generelle Wahl der Extraktionsmethode, sondern insbesondere die Wahl des Lösemittels entscheidend ist. Abbildung 6 dokumentiert dies am Beispiel der Extrakte einer Frischhaltefolie: Während sich mit den Lösemitteln Methanol, Acetonitril und Heptan östrogen aktive Substanzen aus der Probe (unmarkierter Kunststoff, wahrscheinlich PVC oder PE) herauslösen lassen, ist dies mit Dichlormethan nicht möglich. Acetonitril weist bei dieser Probe die höchste Extraktionseffizienz auf. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass zur Extraktion von unbekannten endokrin aktiven Substanzen immer ein Spektrum unterschiedlicher Lösemittel (von polar zu unpolar) verwendet werden sollte.

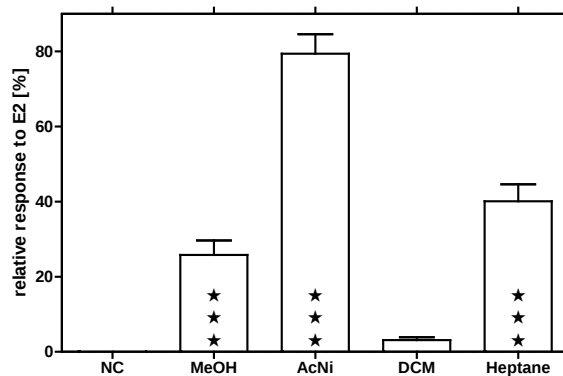


Abbildung 6: Östrogene Aktivität von verschiedenen Lösemittlextrakten (Methanol, Acetonitril, Dichlormethan und Heptan) einer Frischhaltefolie im YES. Kruskal-Wallis mit Dunn's post-Test, signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle (NC) *** $p < 0,0001$, $n = 8$.

3.6 Auswahl der Extraktionsmethode für Wasserproben

Ebenso wie die direkte Extraktion von Kunststoffen muss auch die Extraktion von Wasserproben für die Testung in Biotests optimiert und angepasst werden.

Extraktionsverfahren von wässrigen Umweltproben für die instrumentelle Analytik können in der Regel anhand des analytischen Nachweises der Zielsubstanzen so optimiert werden, dass hohe Wiederfindungsraten z.B. durch den Einsatz gespikter Proben erreicht werden. Bei der Untersuchung derartiger Extrakte in Biotests ist ein solches Verfahren nicht möglich, da die chemische Identität der Zielkomponenten oft unbekannt ist. Hilfsweise werden deshalb bereits etablierte Extraktionsverfahren zur Aufarbeitung von Umweltproben unbekannter Zusammensetzung verwendet. Im Fall der östrogenen Aktivität werden vereinzelt Extraktionsverfahren verwendet, die für einfach detektierbare Referenzsubstanzen (z.B. 17β -Östradiol oder Bisphenol A) optimiert sind. Für komplexe Mischungen (oft nicht identifizierter) endokrin aktiver Substanzen in Umweltproben ist dieses Vorgehen jedoch nicht optimal.

Im Projekt wurden deshalb umfangreiche Versuche zum Vergleich der Effizienz verschiedener Extraktionsmethoden und zu deren Optimierung vorgenommen. Abbildung 8 zeigt den Vergleich verschiedener Methoden und Matrices für die Festphasenextraktion von Mineralwasserproben im YAES. Hier wurden fünf verschiedene SPE-Matrices diverser Hersteller eingesetzt, um Wasserproben nach der Standardmethode des jeweiligen Herstellers zu extrahieren (methodische Details in WAGNER & OEHLMANN 2010). Die Extrakte unbelasteter Säulen sowie extrahiertes Leitungswasser (Blindwert) wies keine östrogene Aktivität in YES und E-Screen auf (Abbildung 7). Dies zeigt, dass die Säulenmaterialien selbst keine Quelle für endokrin aktive Komponenten darstellen. Die Untersuchung der Extrakte eines Mineralwassers zeigt weiterhin, dass keine Matrix/Methode geeignet ist, östrogen aktive Komponenten, die in den unaufgearbeiteten Wasserproben detektiert wurden, aufzureinigen (Details siehe 5.3).

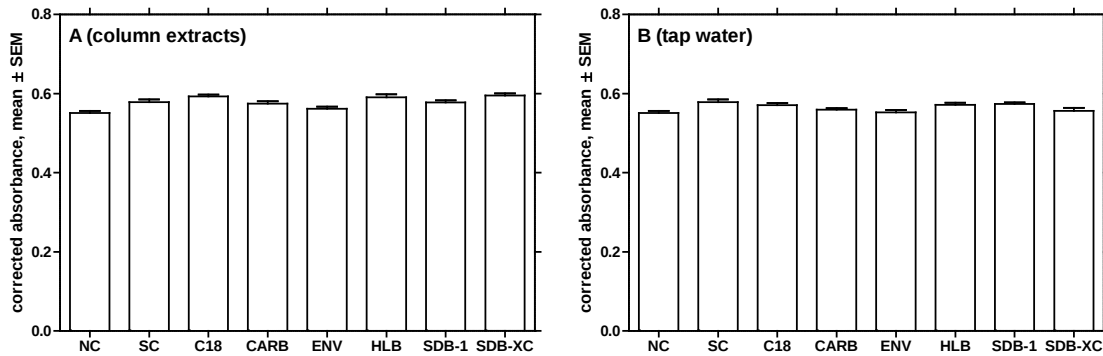


Abbildung 7: Östrogene Aktivität der Blindwerte bei der Festphasenextraktion (YES). A: Extrakte unbelasteter SPE-Säulen, B: extrahiertes Leitungswasser. Keine signifikanten Unterschiede zwischen Lösemittelkontrolle (SC) und Blindwerten (ANOVA mit Newman-Keuls Test), NC: n = 48, SC : n = 16, Proben: n = 8

Betrachtet man allerdings die antiöstrogene Aktivität der Extrakte im YAES (dargestellt als korrigierte Absorption in Abbildung 8 A), so werden deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Methoden sichtbar. Die allgemein als besonders leistungsfähig anerkannten Matrices der Hersteller Waters (Oasis HLB) und Bakerbond (SDB, beides Copolymere auf Basis von Divinylbenzol-N-Vinylpyrrolidon oder Styrene-divinylbenzene) sind offensichtlich nicht geeignet, Antiöstrogene aus den entsprechenden Wasserproben aufzureinigen. Interessanterweise zeigt sich bei Extraktion derselben Wasserprobe mit anderen Matrices (C18, sphärische Kohlenstoffpartikel (CARB) und einem weiteren Copolymer (ENV), dass diese deutlich besser zur Extraktion von Antiöstrogenen aus Wasser geeignet sind. Die beste Extraktionseffizienz erzielt die Methode mit ENV+-Säulen (Isolute), deren Matrix der der SDB-Säulen gleicht, welche allerdings zusätzlich hydroxyliert ist. Dies zeigt, dass geringfügige Veränderung der SPE-Matrix einen deutlichen Einfluss auf die Extraktionseffizienz haben können und dass allgemein anerkannte Methoden (HLB-Methode) im Fall der endokrinen Aktivität nicht immer die optimalen Ergebnisse liefern.

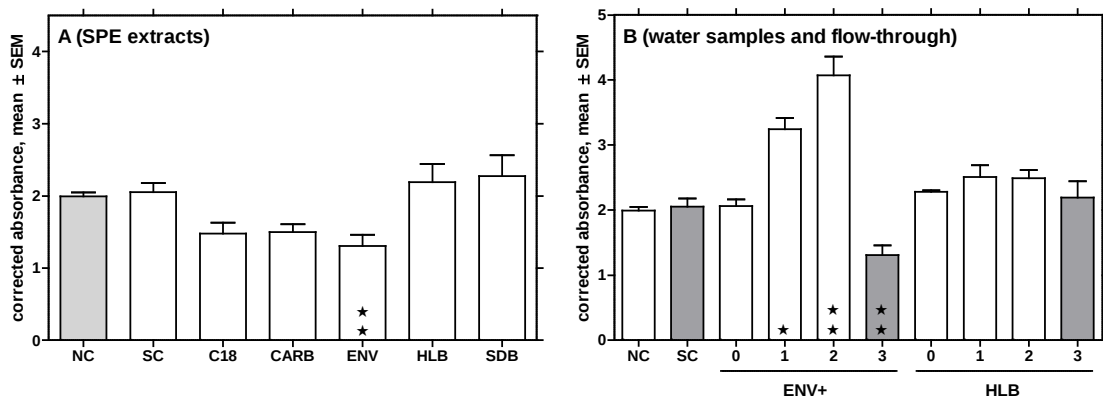


Abbildung 8: Vergleich verschiedener Methoden zu Festphasenextraktion (SPE) am Beispiel einer Mineralwasserprobe im YAES. Östrogene Aktivität der SPE-Extrakte (A) sowie der zugehörigen Wasserproben (B) im Original (0), Durchfluss (1+2) und den Extrakten (3). Kruskal-Wallis mit Dunn's post-Test, signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle (NC) bzw. Lösemittelkontrolle (SC) ★★ p < 0,01, ★ p < 0,05; n = 6-8.

Auch die im Projekt routinemäßig durchgeführte Testung von Durchflussproben der SPE erweist sich als hilfreich. Hierbei wird nicht nur das unaufgearbeitete Originalwasser auf endokrine Aktivität hin untersucht, sondern auch die Wasserprobe, die durch die SPE-Säule fließt, d.h. aus der die endokrin aktiven Bestandteile im Fall einer erfolgreichen Extraktion

entfernt sein müssten (Abbildung 8 B). Die Durchflussproben der HLB-Methode (1 und 2) zeigen im Vergleich zur Originalwasserprobe (0) keine veränderte östrogene Aktivität, auch das gewonnene SPE-Extrakt (3) ist nicht aktiv. Im Vergleich sind die Durchflussproben bei der ENV+-Methode deutlich stärker aktiv als die Ausgangsprobe, gleichzeitig weist das Extrakt antiöstrogene Aktivität auf. Dies bedeutet, dass es mit der ENV+-Methode gelungen ist, antiöstrogen aktive Komponenten aus der Wasserprobe aufzureinigen. Die erhöhte östrogene Aktivität im Durchfluss zeigt, dass östrogen wirksame Substanzen nicht zurückgehalten werden und somit in der Wasserphase verblieben sind. In der Originalprobe maskieren sich diese Östrogene und die von der Matrix zurückgehaltenen Antiöstrogene gegenseitig. Die optimierte SPE-Methode wird hier zur Aufreinigung, Detektion und Identifizierung von Antagonisten des Östrogen- und Androgenrezeptors in Mineralwasserproben verwendet (vgl. Abs. 6.5). Auch dieses Beispiel zeigt, dass für die Anwendung von Biotests zur Charakterisierung der endokrinen Aktivität von Umweltproben umfangreiche Maßnahmen zur Optimierung bestehender Methoden und die Entwicklung neuer Testdesigns notwendig sind.

3.7 Probenaufbereitung

Kritisch ist ferner die Aufbereitung und Applikation der gewonnenen Proben bei der Durchführung der Biotests selbst. Das Abdampfen von Probenextrakten auf den verwendeten Mikrotiterplatten ist weit verbreitet, da sowohl das Lösemittel entfernt werden kann, als auch höhere Konzentrationen des Extraktes eingesetzt werden können. Kontrollexperimente deuten im Fall der östrogenen Aktivität jedoch darauf hin, dass das Abdampfen von Extrakten zum Verlust der Aktivität führt. Abbildung 9 zeigt dies am Beispiel zweier Mineralwasserextrakte (C1, C2): Im ersten Versuch werden 25 µL der Extrakte vor Durchführung des E-Screens auf den Mikrotiterplatten abgedampft, so dass diese letztendlich in vierfacher Verdünnung vorliegen. Die östrogene Aktivität der beiden Proben ist im Vergleich zum mitgeführten Blindwert moderat. Im zweiten Versuch werden die gleichen Extrakte ohne Abdampfen direkt dem Medium zugegeben. Dies führt zu einer 200-fachen Verdünnung der Proben im Test. Im E-Screen weisen diese Proben nun eine deutliche östrogene Aktivität auf, die wegen des höheren Verdünnungsfaktors nicht zu erwarten war. Das Abdampfen des Lösemittels hat hier also auch zum Abdampfen der östrogen aktiven Substanzen geführt. Diese Daten belegen, dass es während der Applikation von Proben zum Verlust aktiver Komponenten kommen kann, die in der Folge zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

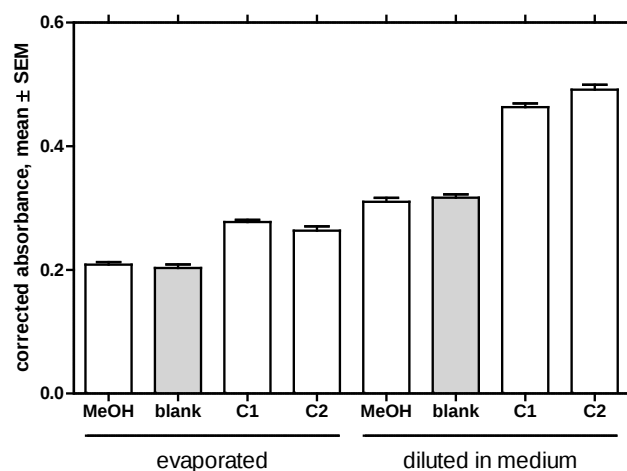


Abbildung 9: Vergleich der Auswirkung der Probenapplikation im E-Screen. Gezeigt ist die östrogene Aktivität zweier Mineralwasserextrakte (C1/2), welche entweder auf der Mikrotiterplatte abgedampft (vierfache Verdünnung) oder direkt mit dem Medium appliziert wurden (200-fache Verdünnung). n = 8.

Der Verlust aktiver, flüchtiger Substanzen während der Probenaufbereitung für In-vitro-Assay kann zur deutlichen Unterschätzung des endokrinen Potentials einer Probe beitragen. Das Einengen von lösemittelhaltigen Proben dient der Herstellung höher konzentrierter Extrakte und gehört zum Standardverfahren bei der Probenaufarbeitung. Hier wie auch in anderen Projekten (LAVES 2007) wird gezeigt, dass das komplette Einengen von Extrakten zu einem deutlichen Verlust der östrogenen Aktivität führen kann. Deshalb wurde in späteren Projektphasen DMSO als sogenannter „keeper“ bei der Probenaufbereitung zugegeben, da dieses schwer flüchtige Lösemittel volatile Komponenten zurückhält. Die Extraktion von Mineralwasserproben für den E-Screen (Abs. 5.4) ist ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung dieser Technik.

3.8 Qualitätssicherung

Ebenso wie bei der Untersuchung von Umweltproben mittels instrumenteller Analytik sind beim Einsatz von Biotests Maßnahmen zur Qualitätssicherung unabdingbar. Hierbei sind die Anforderungen an Biotests jedoch höher, da In-vitro-Verfahren oft nicht nur deutlich empfindlicher sind, sondern bei ihrer Anwendung auch mehr Kontaminationsquellen existieren. Die wichtigste Voraussetzung bei der Untersuchung der endokrinen Aktivität mit In-vitro-Assays ist ein stabiles Testsystem. Dies wird durch das Mitführen von adäquaten Positiv- und Negativkontrollen gewährleistet, die vordefinierten Validitätskriterien genügen müssen (WAGNER & OEHLMANN 2009). Standardisierte Versuchsdesigns sind für eine replizierbare Datenerhebung unabdingbar. Bisher existieren keine national oder international standardisierten In-vitro-Verfahren für die Untersuchung von Endokrinen Disruptoren. Im vorliegenden Projekt wurde dies deshalb durch den konsequenten Einsatz von laborinternen SOPs und ein intensives Training realisiert.

Eine große Herausforderung beim Einsatz von Biotests zur Charakterisierung des endokrinen Potentials stellen Kontaminationen während der Probenaufbereitung oder der Versuchsdurchführung dar. In einer Reihe von Versuchen wurden deshalb häufig verwendete Materialien auf ihre endokrine Belastung überprüft. So konnte beispielsweise das Auslaugen von (Anti)östrogenen aus den verwendeten Pipettenspitzen ausgeschlossen werden. Auch wurden in jedem Versuch alle verwendeten Lösemittel als Kontrollen mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen zu erkennen (methodische Details in WAGNER & OEHLMANN 2009). Das Problem der östrogen kontaminierten Reinstwässer ließ sich trotz intensiver Bemühungen im Projektverlauf nicht beheben (LUTHER 2007). SANFILIPPO *et al.* (2010) wiesen kürzlich eine Reihe von Phthalaten (insbesondere DEHP) und weiteren Substanzen in Reinstwasser nach, die einen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse des YES hatten. Diese Befunde sind wegen der häufigen Verwendung von Reinstwasser in (öko)toxikologischen Studien von großer Bedeutung. Im Projekt wurde deshalb auf den Einsatz von Reinstwasser zugunsten von Leitungswasser soweit wie möglich verzichtet.

Die wichtigste Maßnahme zur Qualitätssicherung bei der Probenaufarbeitung ist die konsequente Mitführung von Probenblindwerten (blanks), die genauso wie die eigentlichen Proben behandelt werden. Auch diese Maßnahme wird im vorliegenden Projekt umgesetzt.

3.9 Datenanalyse und Quantifizierung

Weder die Durchführung von In-vitro-Assays zur Bestimmung des endokrinen Potentials noch deren Auswertung ist international standardisiert. Zur Quantifizierung der In-vitro-Daten werden im Projekt sogenannte bio-Äquivalente eingesetzt. Hierbei wird der endokrine Effekt einer Probe als Konzentration einer geeigneten Referenzsubstanz angegeben, welche denselben Effekt entwickelt (z.B. Dioxinäquivalente (TEQ), Östradioläquivalente (EEQ) etc.). Gegenüber den traditionell eingesetzten Quantifizierungsmethoden (z.B. Relative Proliferationseffekte etc.) hat dieses Verfahren den Vorteil, dass es Assay-unabhängig ist und somit die Vergleichbarkeit von Daten aus unterschiedlichen Experimenten, Laboren und

Testsystemen verbessert. Auch für die umweltregulatorische Betrachtung bietet die Verwendung von bio-Äquivalenten Vorteile (Abs. 9.3).

Eine im Projekt durchgeführte Literaturstudie (WAGNER *et al.* subm.) zur Ableitung von bio-Äquivalenten hat ergeben, dass mehrere konkurrierende mathematische Modelle zu deren Berechnung verwendet werden. Ein Vergleich der Berechnungsmodelle zeigt, dass die am häufigsten verwendeten Methoden zur Ableitung von bio-Äquivalenten deutliche Unsicherheiten aufweisen. Von den 234 untersuchten Studien verwendeten 50% Ableitungsmodelle, die auf linearer Interpolation oder auf der Verrechnung von EC₅₀-Werten beruht. Für das letztgenannte Model konnte jedoch gezeigt werden, dass es je nach Datenqualität zu einer deutlichen Unter- oder Überschätzung der bio-Äquivalente führt. Im Projekt wurde deshalb ein nicht-lineares Model verwendet (WAGNER & OEHLMANN 2009), das die Unsicherheiten bei Ableitung von bio-Äquivalenten minimiert.

3.10 Zusammenfassung: Methodische Überlegungen

Repräsentativität bei der Probenauswahl

Angesichts der Vielfalt in Material und Anwendung ist bei der Untersuchung des endokrinen Potentials von Kunststoffen eine Fokussierung bei der Probenauswahl unabdingbar. Eine Priorisierung kann auf Grundlage der Produktionsmengen oder der Relevanz für Mensch und Umwelt vorgenommen werden. Beiden Aspekten trägt das Projekt Rechnung, indem sowohl HPV-Kunststoffe (Vorformen und Endprodukte), als auch eine ganze Reihe von Verpackungsmaterialien (Kontakt mit Mensch und Umwelt) untersucht werden. Allerdings fehlen oft Daten zu Eintrag, Quellen und Materialien von Kunststoffen in der Umwelt, auf Basis derer sich realistischere Expositionsszenarien modellieren lassen (Abs. 1.1). Um detaillierte Kenntnisse über das Auslaugen Endokriner Disruptoren aus Kunststoffen zu erlangen, werden zudem Mineralwasserproben und deren Verpackungen untersucht. Dieser Versuchsansatz hat Modellcharakter und soll Aufschluss über die Expositionssituation für Mensch und Umwelt geben (Kapitel 5).

Biotests zur integrierten Betrachtung der endokrinen Aktivität

Die im Projekt gewonnenen Daten belegen, dass Biotests und insbesondere In-vitro-Assays optimal für eine integrierte Charakterisierung des endokrinen Potentials von Proben unbekannter Zusammensetzung sind. Anders als die gezielte chemische Analytik bilden Biotests die biologischen Effekte aller aktiven Substanzen ab, auch wenn diese z.T. unbekannt sind. Weiterhin integrieren Biotests die Effekte von komplexen Stoffgemischen (Mischtoxizität), welche sich auf Basis beschränkter analytischer Daten nur ungenügend vorhersagen lässt. Deshalb sind In-vitro-Assays besonders für die Charakterisierung von Kunststoffen als Expositionsquelle für Endokrine Disruptoren geeignet, da hier nur wenige analytische Daten vorliegen.

Einsatz von In-vitro-„Batterien“

Die Verwendung mehrerer Biotests zur Untersuchung identischer Proben ist auf Basis der im Projekt gemachten Erfahrungen unabdingbar. Deshalb wurden zwei unabhängige Testsysteme für den gleichen Endpunkt (östrogene Aktivität: YES und E-Screen) verwendet. Dies ist sinnvoll um Assay-spezifische Vor- und Nachteile auszugleichen und die Gefahr falsch-negativer und -positiver Befunde zu minimieren. Zusätzlich sollten immer auch Versuchsdesigns gewählt werden, die antagonistische Substanzen detektieren (hier: YAES und YAAS). Zudem wurde im Projekt eine Pilotstudie zur Untersuchung der endokrinen Aktivität von Kunststoffextrakten an den bisher vernachlässigten Rezeptoren RXR, TR und VDR ausgeführt. Die gewonnenen Erkenntnisse machen deutlich, dass diesen endokrinen Systemen eine deutlich höhere Forschungspriorität eingeräumt werden muss.

Optimierung und Anpassung von Biotests und Probenaufbereitung

Für die vorliegende Fragestellung müssen vorhandene In-vitro-Methoden angepasst und modifiziert werden. Dies betrifft insbesondere die Erhöhung der Sensitivität und des Probendurchsatzes. Bei einem Vergleich der verschiedenen Methoden zur Probengewinnung und -aufbereitung wird deutlich, dass hier der gravierendste Entwicklungsbedarf besteht. Traditionelle Methoden werden insbesondere für die gezielte chemische Analytik verwendet und sind hierfür optimiert. Da Biotests jedoch alle aktiven Komponenten detektieren, mussten zahlreiche Modifikationen vorgenommen werden (Abs. 3.6 und 3.7). Auch standardisierte Migrationsverfahren zur Bestimmung des Auslaugens von Chemikalien aus Kunststoffbedarfsgegenständen sind für den Einsatz chemischer Analytik optimiert. Bei der Anwendung von Biotests liefern diese zwar wertvolle Informationen, stellen aber auch neue Herausforderungen an die Interpretation der gewonnenen Migrationskinetiken. Die erprobten Extraktionsmethoden sind für die vorliegende Fragestellung besser geeignet. Diese Verfahren müssen als Worst-case-Szenarien betrachtet werden und decken alle möglichen Verwendungssituationen für die untersuchten Kunststoffe/Verpackungen ab.

Qualitätssicherung und Datenanalyse

Zur Gewinnung valider und vergleichbarer Daten mit Hilfe von Biotests zur Untersuchung endokriner Aktivität sind hohe Ansprüche an die Qualitätssicherung zu stellen. Bei fehlenden standardisierten Verfahren wird dies im Projekt durch die Definition strenger Validitätskriterien und das Mitführen adäquater Kontrollen/Blindwerte gewährleistet. Eine (inter)nationale Validierung der gebräuchlichsten In-vitro-Assays zur Bestimmung endokriner Aktivität und das Aufstellen verbindlicher Maßnahmen zur Qualitätssicherung ist mittelfristig jedoch unabdingbar (Abs. 3.8 und 9.3). Auch die Datenanalyse ist methodisch anspruchsvoll. Hier konnte gezeigt werden, dass die gebräuchlichsten Methoden zur Ableitung von bio-Äquivalenten zusätzliche Unsicherheiten generieren können. Eine Vereinheitlichung, beispielsweise im Fall der bio-Äquivalente, wäre im behördlichen Interesse, da das große Potential derartiger Daten dann einfacher für regulatorische Verfahren genutzt werden könnten (Abs. 9.3).

4 Biologische Testsysteme: Integrierte Betrachtung des endokrinen Potentials von Kunststoffen

4.1 Östrogene Aktivität: Migrationsversuch nach EU mit Verpackungen

Im Folgenden sind Ergebnisse aus Migrationsversuchen nach EU-Verfahren dargestellt, welche mit Kunststoffverpackungen in der Projektphase A durchgeführt wurden. Wie in Abs. 3.5 beschrieben, handelt es sich bei dieser Methode um das einzige derzeit standardisierte Migrationsverfahren. Ziel der Untersuchungen ist es, das Verfahren für die In-vitro-Testung auf östrogene Aktivität zu überprüfen und Daten über den zeitlichen Verlauf des Auslaugens potentieller Endokriner Disruptoren zu gewinnen.

Als Lebensmittelsurrogat diente Leitungswasser, da dieses im Vergleich zu diversen Reinstwässern am geringsten östrogen belastet ist. 25 Lebensmittelverpackungen aus insgesamt zehn verschiedensten Materialien (plus unbekannte; methodische Details in Anhang A1) wurden in je drei Replikaten mit Wasser ausgewaschen und anschließend bis zur ursprünglichen Füllhöhe mit Wasser aufgefüllt. Zwischen dem Befüllen wurden drei Wasserproben abgenommen und sofort im YES getestet (Tag 0). Als Blindwerte dienten mit Aceton gewaschene, über Nacht bei 200°C ausgeglühte Bechergläser (Borosilikatglas 3.3), die mit 75 mL Wasser befüllt und mit einem Uhrglas abgedeckt wurden. Die Proben wurden über den Zeitraum von zehn Tagen bei 40°C gelagert. An den Tagen 1, 2, 5 und 10 wurde aus jeder Verpackungsprobe Wasser entnommen und direkt im YES getestet. Da in den verschiedenen Versuchen unterschiedliche Hintergrundaktivitäten in den jeweiligen Blindwerten gemessen wurden, sind die Daten als um die Aktivitäten der jeweiligen blanks korrigierte Östradioläquivalente (EEQ) dargestellt.

Abbildung 10 zeigt eine Auswahl an Migrationskinetiken verschiedener Proben, sortiert nach den jeweiligen Verpackungsmaterialien. In der Gesamtschau wird deutlich, dass während der zehntägigen Migrationsdauer keine übermäßig starke östrogene Aktivität detektiert werden kann. Bis auf wenige Ausnahmen liegen die gemessenen Aktivitäten bei maximal +/- 5 ng EEQ/L im Vergleich zum jeweiligen Blindwert. Dennoch sind einige interessante Tendenzen erkennbar: Viele Verpackungen scheinen beispielsweise zeitweise Antiöstrogene freizusetzen. Im YES werden in diesen Fällen Absorptionen beobachtet, die unter denen der jeweiligen Blindwerte liegen und deshalb zu negativen EEQ-Werten führen. Dies wird besonders deutlich bei Materialien auf PE- und PP-Basis.

Bei verschiedenen Materialien können im Versuchsverlauf jedoch auch „östrogene peaks“ detektiert werden, z.B. bei Verpackungen aus PET, PP und PS. Besonders auffällig sind Einzelreplikate, die von den anderen Replikaten abweichen (FX 3, orange in Abbildung 10) und über den Versuchsverlauf z.T. erhebliche östrogene Potenz zeigen (z.B. über 800 ng EEQ/L bei einer PP-Verpackung). Dieses uneinheitliche Verhalten deutet drauf hin, dass die gleichen Verpackungsmaterialien ein unterschiedliches Maß an endokrin aktiven Komponenten freisetzen. Das wiederum lässt darauf schließen, dass die Verpackungsmaterialien trotz gleichen Herstellers und Kaufdatums eine sehr heterogene Zusammensetzung (z.B. unterschiedliche Konzentrationen von Additiven) aufweisen.

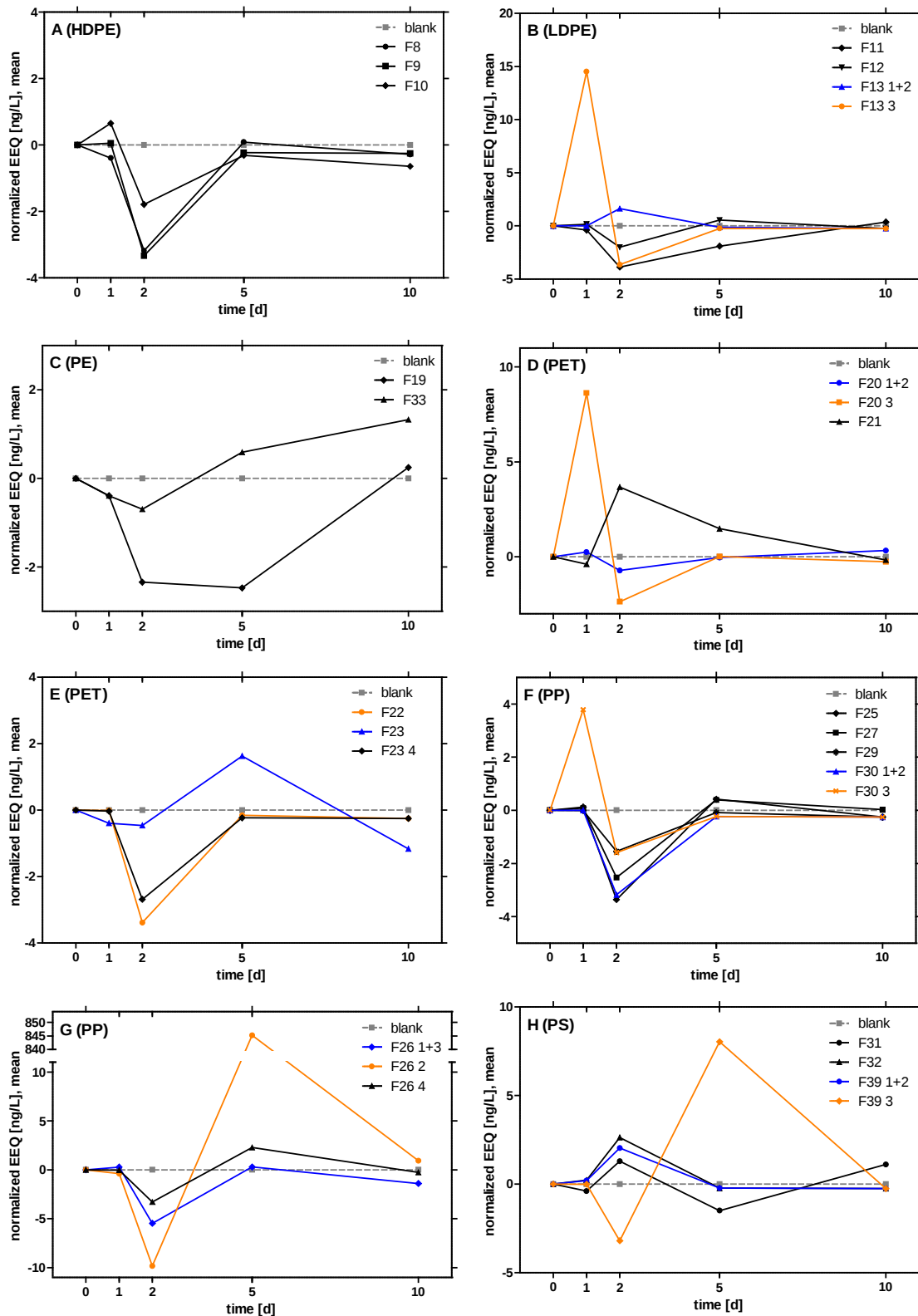


Abbildung 10: Östrogene Aktivität von Verpackungsmaterialien im Migrationsversuch nach EU (YES). Dargestellt sind Östradioläquivalente (EEQ, mean), die auf den jeweiligen Blindwert normalisiert sind. Blank: n = 22-24, Proben: n = 21-24 (3 Replikate), n = 14-16 (2 Replikate, FX 1+2), n = 7-8 (1 Replikat, FX 3).

Auch ist keine einheitliche Migrationskinetik zu erkennen: Beim Auslaugen einer einzigen östrogen aktiven Komponente wäre ein konstanter Anstieg der endokrinen Aktivität zu erwarten gewesen. Dies ist offensichtlich nicht der Fall. Stattdessen lassen sich erhöhte agonistische oder antagonistische Aktivitäten meist nach zwei oder fünf Tagen detektieren, die jedoch im weiteren Versuchsverlauf wieder auf null zurückgehen. Ein derartiges Migrationsverhalten ist auf Basis der vorliegenden Daten nur schwer zu interpretieren, jedoch wurden auch in anderen Studien ähnliche Migrationsmuster beobachtet (WAGNER 2006). Dass es sich um ein Assay-spezifisches Phänomen handelt, kann ausgeschlossen werden, da im Migrationsversuch mit Mineralwasser (Abs. 5.2) bei der Testung von entsprechenden SPE-Extrakten in E-Screen vergleichbare Migrationskinetiken gemessen werden.

Dies bedeutet, dass die Migrationsprozesse komplexer sind als zunächst angenommen. Es wäre z.B. möglich, dass auslaugende Substanzen im wässrigen Surrogat schnell abgebaut werden und so ihre endokrine Aktivität verlieren. Am wahrscheinlichsten ist jedoch das Auslaugen eines komplexen Substanzgemisches, welches – bedingt durch die jeweils individuelle Migrationskinetik der Einzelkomponenten – zu jedem Versuchszeitraum eine andere Mischtoxizität aufweist. Verkompliziert wird diese Überlegung durch die Präsenz potentieller Rezeptorantagonisten: Am Beispiel von Mineralwasser konnte gezeigt werden (siehe Abs. 5.2), dass potente Antiöstrogene vorhandene östrogene Effekte maskieren können.

4.2 Östrogene Aktivität: Migrationsversuch nach EU mit Granulaten

Für die Migrationsversuche mit Kunststoffrohformen werden jeweils 10 g Kunststoffgranulat bzw. je ein Kunststoffstäbchen der Maße 1,2 x 7,5 x 0,2 cm (Proben 15-21, methodische Details in Anhang A2) in mit Aceton gewaschene und über Nacht bei 200°C ausgeglühte 100 mL-Bechergläser (Borosilikatglas 3.3) mit 75 mL Referenzwasser (Aq. R 320) bedeckt. Ein übermäßiges Verdunsten des Wassers wird durch eine Abdeckung mit Uhrgläsern minimiert. Die Versuche werden über 10 bzw. 30 Tage bei 40°C durchgeführt. Die EU-Richtlinie sieht 10 Tage pro Versuch vor, erweitert diese aber bei Bedarf auf 30 Tage. Nach 0, 2, 5, 10, 20 und 30 Tagen werden aus den Gläsern je 1-2 ml Wasser entnommen und im YES direkt auf östrogene Aktivität untersucht.

Die 21 untersuchten Materialien umfassen elf verschiedene Kunststofftypen, die entweder von diversen mittelständischen Herstellern bezogen wurden (Proben 1-14, 22) oder aus der Kunststoffprobensammlung der Industrievereinigung PlasticsEurope (Proben 15-21) stammen. Bei den Granulaten handelt es sich sowohl um Neuware als auch um recycelte Kunststoffe („Regranulat“).

Abbildung 11 zeigt exemplarisch den Zeitverlauf der östrogenen Aktivität für eine Auswahl repräsentativer Kunststoffvorformen. Wie schon in den vorangegangenen Versuchen mit Kunststoffverpackungen werden unterschiedliche Migrationsmuster detektiert, allerdings ist die östrogene Potenz in diesen Versuchen deutlich stärker. Aus PP- und PMMA-Granulaten laugen bereits nach zwei Tagen ca. 70 ng EEQ/L aus (Abbildung 11 D, F). Auch für PE kann eine Migration östrogen aktiver Komponenten nach fünf Tagen belegt werden (Abbildung 11 A), während die untersuchten PET-Materialien sowohl östrogene als auch antiöstrogene Migrationsverläufe aufzeigen. Das Auslaugen von antiöstrogen aktiven Substanzen kann im Fall zweier Granulate auf LDPE-Basis beobachtet werden. Probe 5 ist hierfür stellvertretend in Abbildung 11 B dargestellt. Bereits nach zwei Tagen zeigt sich ein Abfall der Östrogenität unter das Niveau der Negativkontrolle. Neben den LDPE-Proben konnte das Auslaugen von Antiöstrogenen bei zwei PET-Granulaten (7, 13) und bei einer Probe aus PE (12) detektiert werden. Da eine geringere östrogene Aktivität im YES nur als Hinweis auf antiöstrogene Potenz gewertet werden kann, werden Antiscreens (YAES) durchgeführt, in dem die Hemmung des durch 17 β -Östradiol aktivierten Östrogenrezeptors untersucht wird. Diese Versuche erhärten die Vermutung, dass aus den LDPE-Proben Antiöstrogene auslaugen (LUTHER 2007).

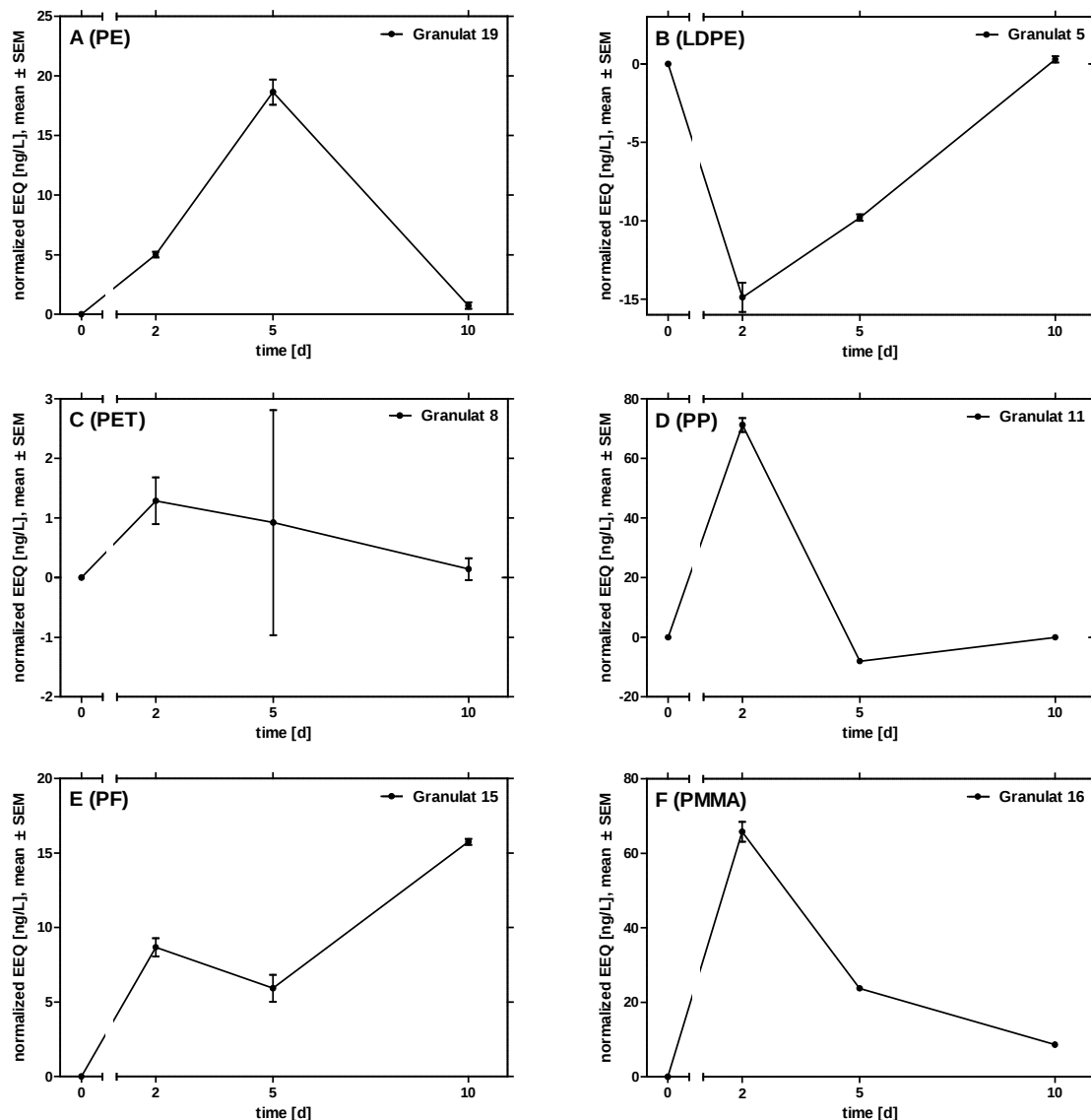


Abbildung 11: Östrogene Aktivität von Kunststoffgranulaten im Migrationsversuch nach EU (YES). Dargestellt sind Östradioläquivalente (EEQ, mean), die auf den jeweiligen Blindwert normalisiert sind. n = 8.

In der Gesamtschau setzen nur sechs der 21 Proben keine bzw. eine sehr geringe endokrine Aktivität frei. Für die Mehrzahl der Proben konnte ein Auslaugen von Antiöstrogenen festgestellt werden, darunter auch die in Vorversuchen bereits zweimal „positiv“ getesteten Proben 5, 6 und 7. Auch der Befund für die Proben 12 und 13 ließ sich bestätigen. Eine zusammenfassende Bewertung der Versuche wird in Tabelle 4 dargestellt. Wie bereits für die Verpackungsmaterialien diskutiert (Abs. 4.1), wird offenbar auch bei von Kunststoffvorformen ein komplexes Substanzgemisch aus Agonisten und Antagonisten des Östrogenrezeptors freigesetzt.

4.3 Migrationsversuche nach EU: Verpackungen und Granulate im Vergleich

Ein Vergleich der Migrationsstudien mit Verpackungen und Granulaten ist nur bedingt möglich, weil die untersuchten Kunststoffvorformen nicht direkt in der Herstellung der untersuchten Verpackungen eingesetzt werden. Hier wäre eine gezielte Studie zu den im

kompletten Lebenszyklus eines Produktes verwendeten Materialien nötig gewesen, die im vorliegenden Projekt jedoch nicht leistbar war (vgl. Abs. 3.1).

Eine Gesamtübersicht über die Migrationsversuche ist in Abbildung 12 gezeigt. Sowohl bei den Verpackungen als auch bei den Granulaten ist eine breite Streuung der endokrinen Aktivität der Einzelproben zu verzeichnen. Dies erschwert allgemeingültige Aussagen über die „endokrinen Eigenschaften“ eines bestimmten Materials (vgl. Abs. 3.1). Bei den Verpackungen lässt sich bei Materialien auf PE- und PP-Basis häufiger ein antiöstrogenes Potential detektieren, während Verpackungen aus PET, PS und nicht gekennzeichneten Materialien eine deutliche östrogene Potenz besitzen. Im Fall der Granulate sind es v.a. die zusätzlich getesteten Materialien (jene, die nicht zu den „großen fünf“ gehören) und die PP-Probe, welche östrogene Aktivität aufweisen. Für alle anderen untersuchten Rohmaterialien deuten die Daten auf eine Freisetzung von Antiöstrogenen hin.

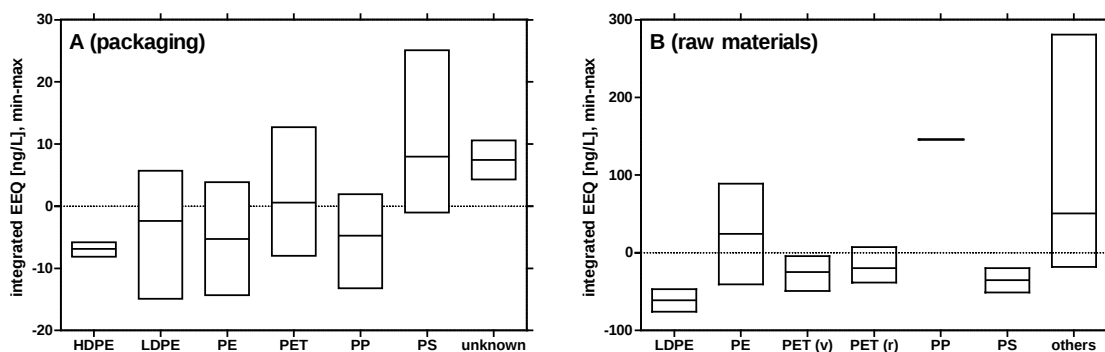


Abbildung 12: Übersicht über die östrogene Aktivität von Kunststoffproben in verschiedenen Migrationsstudien nach EU. Dargestellt sind die integrierten Östradioläquivalente über die gesamte Versuchsdauer für den jeweiligen Kunststofftyp (Minimum-Mittelwert-Maximum). n = 1-8.

Der Unterschied in der Aktivität (deutlich höher in Granulaten) ist durch die Menge an Material bestimmt, welche im jeweiligen Migrationsversuch eingesetzt wird. Die Verpackungen werden bis zur ursprünglichen Füllhöhe mit Surrogat befüllt, so dass die Migration der östrogene Aktivität eher der Verbrauchersituation entspricht (v.a. anhängig von der Oberfläche der Verpackung). In den Versuchen mit Kunststoffvorformen werden hingegen 10 g Granulat eingesetzt, also deutlich mehr Material als bei der Untersuchung der Verpackungen selbst. Während die Untersuchung von Verpackungen also eher Relevanz für den Verbraucher besitzt, kann die der Granulate als umweltrelevant angesehen werden. Immerhin besteht ein Großteil des in der Umwelt, insbesondere in marinen Ökosystemen, gefundenen Kunststoffs aus unverarbeiteten Kunststoffgranulaten (Abs. 1.1).

Bei der Anwendung der Migrationsmethode nach EU ergeben sich für die Untersuchung auf endokrine Aktivität eine Reihe von Schwierigkeiten. So ist die Auswahl des geeigneten „Reinstwassers“ schwierig, da diese meist östrogenkontaminiert sind. Auch diverse Aufreinigungsversuche erbrachten keine Verbesserung (LUTHER 2007). Deshalb wurde Leitungswasser als Migrationsmedium und Blindwert verwendet. Im Verlauf der Migrationsversuche treten z.T. erhebliche Schwankungen in den endokrinen Aktivitäten der Blindwerte auf. Diese könnten unter Umständen durch mikrobielle Aktivität im Leitungswasser verursacht worden sein. Um diese Probleme zu umgehen, wurde ein modifizierter Migrationsversuch mit Mineralwasser durchgeführt (Abs. 5.2).

Trotz dieser Nachteile können aus den durchgeführten Migrationsversuchen nach vorliegender Methode wichtige Informationen gewonnen werden. Im Versuchsverlauf lassen sich z.T. erhebliche östrogene und antiöstrogene Aktivitäten detektieren. Die Freisetzung einer komplexen Mischung von Rezeptoragonisten und -antagonisten aus verschiedensten Materialien könnte hierbei zu komplexen Migrationsmustern bei der östrogenen Aktivität führen. Die Aufklärung dieser Kinetik würde ein komplexeres Versuchsdesign erfordern, welche die Extraktion der Surrogate, deren parallele Testung auf Agonismus und

Antagonismus sowie eine leistungsfähige non-target-Analytik beinhaltet. Erste Schritte in diese Richtung werden am Beispiel von Mineralwasser erprobt (Abs. 6.5).

4.4 Migrationsversuche nach Kataoka

Als Alternative zu dem Verfahren nach EU wird die Methode nach KATAOKA *et al.* (2002) erprobt (methodische Details in Anhang A3). Die Migration wird hier bei erhöhten Temperaturen durchgeführt (60°C), so dass das Verfahren nicht so zeitintensiv ist. Im Gegensatz zur EU-Methode werden vier verschiedene Surrogate (Wasser, 40% Ethanol, 2% Essigsäure und n-Heptan) eingesetzt, um unterschiedliche Migrationsbedingungen zu simulieren. Da diese abschließend mit Ether extrahiert werden und in Methanol umgelöst werden, können die Proben zusätzlich zum YES auch im E-Screen untersucht werden, in dem nur die Testung von lösemittelbasierten Proben möglich ist.

Aus den vier durchgeführten Migrationsversuchen wurden exemplarisch sechs Proben aus zwei Versuchen ausgewählt, deren Extrakte im YES untersucht wurden (siehe Abbildung 13). Im Fall von vier Proben konnte das Auslaugen von Östrogenen in mindestens einem Surrogat detektiert werden. Das wässrige Surrogat (ELGA) löste Komponenten mit einer östrogenen Potenz von ca. 10 ng/L EEQ aus den Proben 1 (PET Mahlgut) und 19 (PE). Aus den Proben 15 (PF) und 16 (PMMA) laugen vermehrt Östrogene in die alkoholischen und sauren Surrogate (20% Ethanol und 4% Essigsäure). Diese Proben wurden in den vorangegangenen Versuchen nach EU mindestens einmal als östrogen aktiv eingestuft. Für die Proben 8 (PET Regranulat) und 21 (PVC) kann kein bzw. ein geringfügiges Auslaugen östrogenen Aktivität nachgewiesen werden, so dass diese – wie schon in den Versuchen nach EU – als nicht bzw. schwach östrogen aktiv bewertet werden.

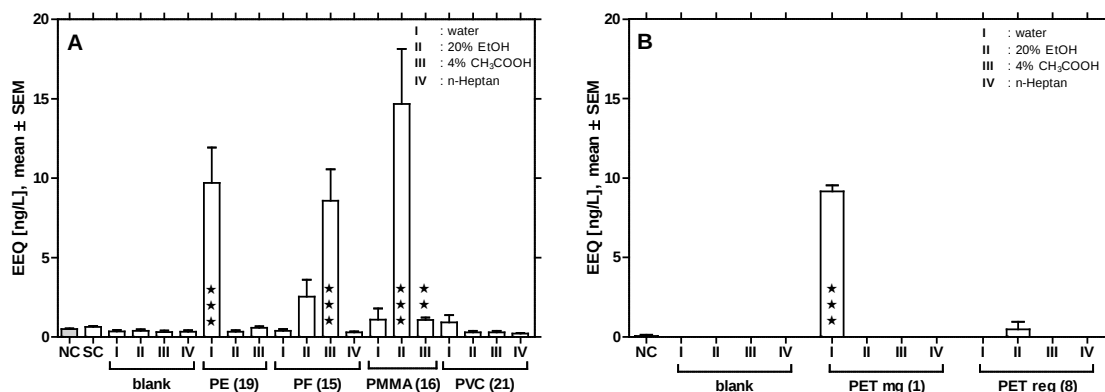


Abbildung 13: Östrogene Aktivität von Kunststoffgranulaten im Migrationsversuch nach KATAOKA *et al.* (2002). Dargestellt sind Östradioläquivalente (EEQ, mean), die im YES ermittelt wurden. Signifikante Unterschiede zur jeweilige Lösemittelkontrolle (blank I-IV). Kruskal-Wallis mit Dunn's Post-Test: ★★ ★ $p < 0,001$, ★ $p < 0,01$. (A) NC: $n = 63$, SC: $n = 8$, Proben: $n = 16$. (B) NC: $n = 15$, Proben: $n = 8$.

Da der E-Screen zeitaufwändiger (siebentägige Versuchsdauer) ist als der YES, werden nur ausgewählte Proben aus den vier Migrationsversuchen untersucht (LUTHER 2007). Eine Auswahl aus zwei Versuchen ist in Abbildung 14 dargestellt. Im Gegensatz zu den YES-Daten weisen die Proben im E-Screen keine signifikant erhöhte Östrogenaktivität auf. Dennoch sind gesteigerte Hormonaktivitäten bei den Proben 1 (PET Mahlgut) und 21 (PVC) zu erkennen. Im Fall des PET löst das wässrige Surrogat (ELGA) östrogenaktive Komponenten aus dem Granulat. Dies konnte schon im YES dokumentiert werden (vgl. Abbildung 13 B). Bei der PVC-Probe sind es wiederum die alkoholischen (20% Ethanol) und sauren (4% Essigsäure) Surrogate, die Östrogene auswaschen. Ein ähnliches Migrationsprofil konnte für diese Probe schon im YES gemessen werden. Eine schwache Hormonaktivität wird bei der Nachtestung (1b) des wässrigen Surrogats von Probe 19 (PE,

vgl. Abbildung 14 A) detektiert. Auch diese Probe war bereits im YES aktiv (vgl. Abbildung 13 A).

Bei einer Reihe von Proben proliferieren die MCF-7-Zellen weniger stark als in der Kontrolle, was sich in Östradioläquivalenten widerspiegelt, die unter denen der Kontrolle liegen. Im Fall der Proben 13 (PET), 15 (PF), 16 (PMMA) und 22 (PET) sind diese Unterschiede signifikant, so dass von einer potentiell antiöstrogenen Wirkung ausgegangen werden könnte. Anders als im YES (reine Rezeptorinteraktion) ist diese Schlussfolgerung beim E-Screen jedoch schwierig, da verschiedene andere Faktoren das Wachstum der Brustkrebszellen beeinflussen können. So können z.B. cytostatische oder -toxische Effekte – anders als beim YES – im E-Screen nicht von antiöstrogenen Effekten unterschieden werden. Die Unterschiede zu den Ergebnissen des YES liegen in dem höheren Komplexitätsgrad des E-Screen begründet: Sowohl die Permeation der Substanzen durch die Zellmembran, als auch deren Metabolisierung in der Zelle selbst können zu abweichenden Ergebnissen gegenüber dem YES führen. Auch sind humane Zellen Proben gegenüber nicht so robust, wie die im YES eingesetzten Hefen.

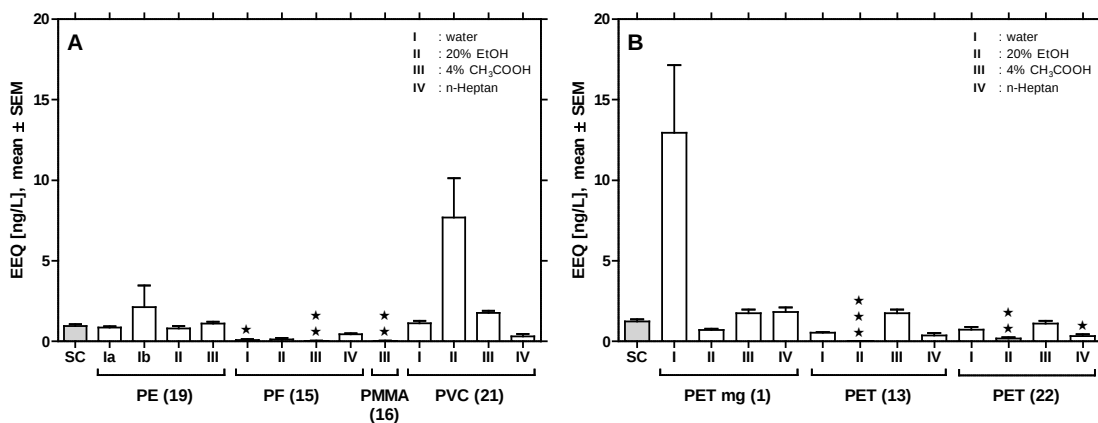


Abbildung 14: Östrogene Aktivität von Kunststoffgranulaten im Migrationsversuch nach KATAOKA et al. (2002). Dargestellt sind Östradioläquivalente (EEQ, mean), die im E-Screen ermittelt wurden. Signifikante Unterschiede zur jeweiligen Lösemittelkontrolle (blank I-IV). Kruskal-Wallis mit Dunn's Post-Test: ★★★ $p < 0,001$, ★★ $p < 0,01$, ★ $p < 0,05$. (A) SC: $n = 56$, Proben: $n = 8$. (B) SC: $n = 40$, Proben: $n = 8$.

4.5 Zusammenfassung: Migrationsversuche

Eine Zusammenfassung der Daten aller Migrationsversuche ist in Tabelle 4 dargestellt. Hierbei werden die Zeitverläufe der endokrinen Aktivität in dem Versuchen nach der EU-Methode, sowie die Aktivität der Surrogatextrakte aus der Methode nach Kataoka evaluiert. Für Verpackungen wird so z.B. ein Schwellenwert von 2 ng EEQ/L im Vergleich zum Blindwert definiert (ca. 10x Standardabweichung einer üblichen Negativkontrolle). Überschreitet die östrogene Aktivität einer Probe diesen Wert zu einem Zeitpunkt während der Migration, wird diese als „östrogen aktiv“ eingestuft, unterschreitet sie einen Wert von -2 ng EEQ/L im Vergleich zum blank, wird die Probe als „antiöstrogen aktiv“ bewertet.

Beim Vergleich der Materialien wird deutlich, dass die antiöstrogenen Befunde die östrogenen im Fall der Proben aus PE, PET, PP und PS überwiegen. Die Dominanz antiöstrogenen Befunde macht deutlich, dass bei der Betrachtung des endokrinen Potentials immer auch die Untersuchung potentieller antagonistischer Effekte eingeschlossen werden muss (Abs. 3.3). Demnach sind Antiöstrogene in Kunststoffen deutlich präsenter als aufgrund der Literaturdaten zu erwarten war. Der Mangel an Substanzdaten zur antiöstrogenen Aktivität von Umweltchemikalien liegt in der traditionell bedingten Fokussierung der Forschung auf östrogen und antiandrogen wirkende Substanzen

begründet. Jüngste Studien zeigen (DI BENEDETTO 2009; ORTON *et al.* 2009), dass die Mehrheit der untersuchten Umweltchemikalien (in diesem Fall Flamm- und Pflanzenschutzmittel) antiöstrogene Eigenschaften aufweist. Mit einem IC_{50} von ca. 7×10^{-5} M ist das v.a. in Polyurethan eingesetzte Flamschutzmittel TCPP (CAS 13674-84-5) beispielsweise ein äußerst potenter Inhibitor des Östrogenrezeptors (SARAC 2006; DI BENEDETTO 2009). Ähnliches gilt für weitere untersuchte Organophosphate. Da diese und ähnliche Substanzen auch als Stabilisatoren in der Kunststoffherstellung eingesetzt werden können, ist nicht auszuschließen, dass die hier beobachtete antiöstrogene Aktivität von migrierenden Kunststoffadditiven ausgelöst wird. Flamschutzmittel auf Organophosphatbasis werden regelmäßig in relevanten Konzentrationen in Biota und humanen Proben (SUNDKVIST *et al.* 2010) sowie in der Umwelt (QUEDNOW & PUTTMANN 2009; REGNERY & PUTTMANN 2009) nachgewiesen. Zu erwarten ist weiterhin, dass die in den Migrationsversuchen detektierten antagonistischen Substanzen potentiell vorhandene östrogene Effekte maskieren (vgl. Abs. 5.2). Ein derartiges Phänomen wäre allerdings nur durch die parallele Untersuchung aller Proben im YAES und eine anschließende Fraktionierung (Abs. 6.3) zu entschlüsseln. Da ein solcher Versuchsansatz mit einem erheblichen Mehraufwand verbunden ist, konnte er im Rahmen der Migrationsversuche nicht realisiert werden.

Tabelle 4: Freisetzung von endokriner Aktivität in den durchgeführten Migrationsstudien.
Angabe ist die Anzahl positiver Befunde in den jeweiligen Einzelstudien.

method	EU		Kataoka et al. (2002)	
material	packaging	pellets	pellets	evaluation
PE (incl. HDPE/LDPE)	0/8 estrogen	1/4 estrogen	1/1 estrogen (YES)	21.4% estrogen
	4/8 antiestrogen	3/4 antiestrogen	1/1 estrogen (E-Screen)	58.3% antiestrogen
PET	1/4 estrogen	2/7 estrogen	1/4 estrogen (YES)	26.7% estrogen
	1/4 antiestrogen	5/7 antiestrogen	1/4 estrogen (E-Screen)	46.7% antiestrogen
PP	0/6 estrogen	1/1 estrogen	n.a.	14.3% estrogen
	5/6 antiestrogen	1/1 antiestrogen		85.7% antiestrogen
PS	2/3 estrogen	0/3 estrogen	n.a.	26.7% estrogen
	0/3 antiestrogen	2/3 antiestrogen		46.7% antiestrogen
PVC	n.a.	0/1 estrogen	0/1 estrogen (YES)	33.3% estrogen
		0/1 antiestrogen	1/1 estrogen (E-Screen)	0% antiestrogen
misc.	1/2 estrogen	3/5 estrogen	2/2 estrogen (YES)	54.5% estrogen
	0/2 antiestrogen	2/5 antiestrogen	0/2 estrogen (E-Screen)	28.6% antiestrogen
evaluation	17.4% estrogen	33.3% estrogen	50% estrogen (YES)	
	43.5% antiestrogen	61.9% antiestrogen	37.5% estrogen (E-Screen)	

Die Methode nach Kataoka scheint bei der Herauslösung östrogener Aktivität effizienter zu sein als die Methode nach EU. Dies kann an der höheren Temperatur während der Migration liegen. Auch kann durch die kurze Migrationsdauer ein Abbau der migrierten Substanzen minimiert werden. Ein eindeutiger Nachteil dieser Methode ist allerdings der beschränkte Probendurchsatz, da aus jeder Einzelprobe vier Subproben gewonnen werden, und die Flüssig-Flüssig-Extraktion der Surrogate, bei der Zielkomponenten verloren gehen können (vgl. Abs. 3.7).

Im vorliegenden Projekt werden erstmals etablierte Migrationsverfahren für die Untersuchung der endokrinen Aktivität mit Hilfe von In-vitro-Assays eingesetzt. Entsprechende

Modifikationen der Methoden sind v.a. aufgrund der Unterschiede zur eigentlichen Anwendung dieser Migrationsverfahren für die chemische Analytik notwendig und wurden hier erfolgreich umgesetzt. Insbesondere die Verkürzung der Untersuchungsintervalle bei der Methode nach EU (1, 2, 5 und 10 Tage statt nur nach 10 Tagen) ermöglicht die Detektion komplexer Migrationsprozesse, die wahrscheinlich von einer Mischung von endokrin aktiven Substanzen ausgelöst werden.

Die beobachteten Migrationskinetiken werfen zwar in vielerlei Hinsicht Fragen auf, verdeutlichen aber auch den Wert des Einsatzes von Biotests zur integrierten Betrachtung des endokrinen Potentials von Kunststoffen im engeren und Umweltprobe im weiteren Sinne. Bei der Betrachtung einiger ausgewählter Komponenten mittels chemischer Analytik wäre die Freisetzung unbekannter Antiöstrogene unentdeckt geblieben. Insofern bieten die mit Hilfe von Biotests gewonnenen Daten die Chance zur Identifizierung bisher unbekannter Endokriner Disruptoren und unterstützen die Generierung neuer Hypothesen für zukünftige Forschungsansätze.

4.6 Yeast-Two-Hybrid: Extrakte verschiedener Kunststoffverpackungen

Im Vergleich zu den oben beschriebenen Migrationsverfahren bietet die lösemittelbasierte Extraktion von Kunststoffproben eine Reihe von Vorteilen: Bei erheblich verkürztem Zeitaufwand extrahieren Lösemittel größere Mengen an Substanzen aus den Proben. Derartige Verfahren können als „worst case“ angesehen werden und bilden die maximale Migration von Komponenten aus Kunststoffen ab (Abs. 3.5). Von den verschiedenen verfügbaren Extraktionstechniken (Soxhlet, Accelerated Solvent Extraction etc.) ist keine für den Einsatz zur Untersuchung von Kunststoffproben standardisiert. Im vorliegenden Projekt wird ein Ultraschall-assistiertes Extraktionsverfahren eingesetzt, bei dem die verschiedenen Kunststoffproben in Borosilikatgefäßen mit Lösemittel versetzt und im Ultraschallbad extrahiert werden. Bei ausgezeichneter Extraktionseffizienz hat dieses Verfahren gegenüber anderen Techniken den Vorteil, dass die Lösemittelmenge minimiert werden kann und dass auf den Einsatz sogenannter heißer Lösemittel verzichtet werden kann. Wie in Abs. 3.5 beschrieben, wird bei der Extraktion von Kunststoffproben ein Spektrum verschiedener Lösemittel eingesetzt, da die Zielanalyten (und deren Extrahierbarkeit) unbekannt sind.

Als Beispiel für die Untersuchung von Kunststoffextrakten sollen an dieser Stelle Daten aus einer exploratorischen Studie zur endokrinen Aktivität von Lebensmittelverpackungen am ER, RXR, TR und VDR dienen. Die Untersuchung soll der Frage nachgehen, ob neben östrogenen Aktivität auch endokrin aktive Komponenten detektiert werden können, die bisher nicht untersuchte nukleäre Rezeptoren aktivieren. Hierzu werden 3 g Probe (2 g im Fall der Frischhaltefolie) mit verschiedenen Lösemitteln extrahiert und im YES und den entsprechenden Two-Hybrid-Systemen untersucht (Details in JERSCH 2010 und Anhang A4 und A5). Abbildung 15 zeigt die Mittelwerte der endokrinen Aktivität von je vier verschiedenen Lösemittelextrakten pro Probe. Die verschiedenen Lösemittel wiesen eine unterschiedliche Extraktionseffizienz auf (siehe Abs. 3.5).

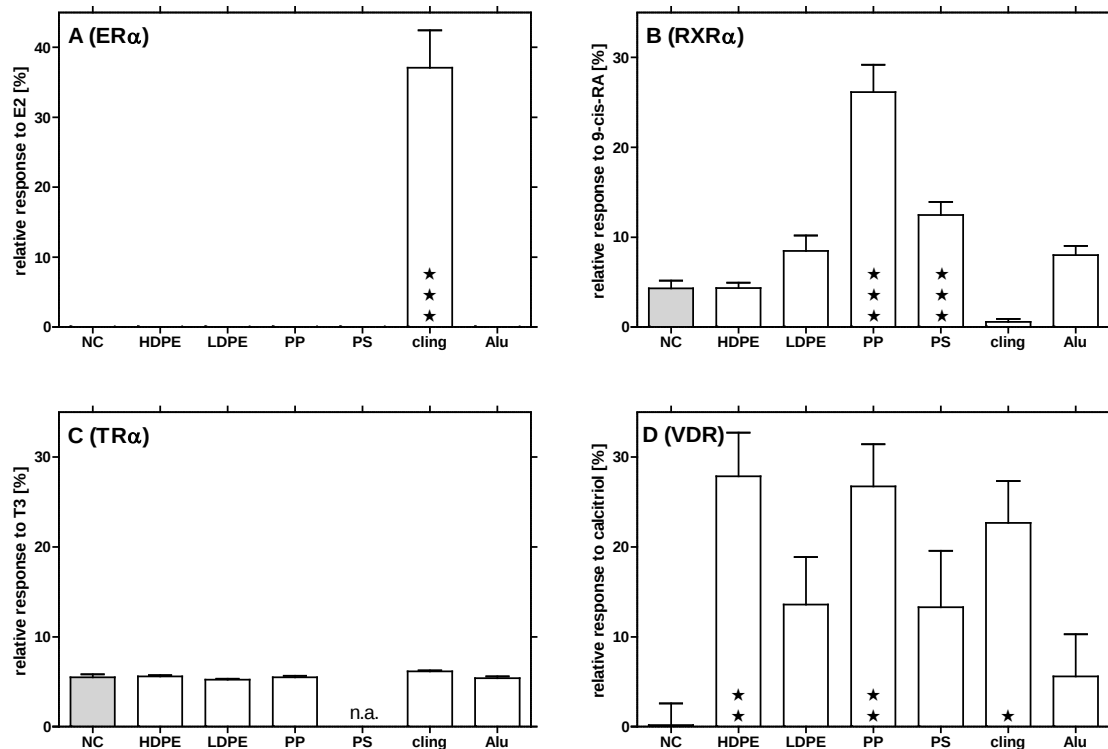


Abbildung 15: Aktivität von Kunststoffextrakten am Östrogenrezeptor (A), RXR-Rezeptor (B), Thyroidrezeptor (C) und Vitamin-D-Rezeptor (D). Dargestellt ist die relative Aktivität im Vergleich zum natürlichen Liganden. Kruskal-Wallis mit Dunn's Post-Test: signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle (NC) ★★★ p < 0,001, ★★ p < 0,01, ★ p < 0,05. NC: n = 32-56, Proben: n = 23-32. n.a. = nicht analysiert.

Bis auf die Frischhaltefolie (cling) zeigt keine der Kunststoffproben eine erhöhte östrogene Aktivität im YES (Abbildung 15 A). Der Kunststofftyp der Folie war nicht gekennzeichnet, es handelt sich wahrscheinlich entweder um PVC oder um PE. Im Fall von PVC ist das Auslaugen von 4-Nonylphenol aus Frischhaltefolien dokumentiert (INOUE *et al.* 2001). Da derartige Produkte hohe Menge an Nonylphenol enthalten können (0,5-3,3 mg/g), könnte diese Substanz auch in dieser Probe für die östrogene Aktivität verantwortlich sein. Gleiches gilt für Verpackungen auf PE-Basis: Auch hier konnten hohe Mengen an Nonylphenolen nachgewiesen werden, insbesondere in Produkten aus China (Prof. H. Takada, Tokyo, pers. Mitteilung). Außereuropäisch hergestellte Bedarfsgegenstände können trotz des EU-weiten Verbotes im Jahr 2003 hohe Mengen an Nonylphenolen enthalten. Somit könnten importierte Kunststoffe und Produkte aus PE eine relevante Expositionsquelle für die Stoffklasse der Alkylphenole darstellen und bedürfen einer intensiveren Untersuchung.

Keine der Proben zeigt Aktivität am Thyroidrezeptor (Abbildung 15 C), obwohl durchaus eine Reihe von Kunststoffadditiven bekannt ist, die Thyroidaktivität aufweist (GHISARI & BONEFELD-JORGENSEN 2009), so z.B. einige Phthalate (DEHP, BBP, DiNP) und Alkylphenole (tert-Octylphenol). Auch wenn in keiner der im Projekt untersuchten Proben eine Aktivität gefunden wurde, sollte aufgrund der besonderen Bedeutung des Thyroidsystems für die neuronale Entwicklung (ZOELLER 2005) die Thyroidaktivität von Kunststoffen und Kunststoffadditiven zukünftig verstärkt untersucht werden.

Am RXR und VDR können erstmals agonistische Effekte durch Extrakte verschiedener Kunststoffmaterialien beschrieben werden (Abbildung 15 B und D). Der Vitamin-D-Rezeptor wird durch Extrakte von Verpackungen aus HDPE, PP sowie der Frischhaltefolie signifikant aktiviert. Die Rezeptoraktivierung ist wiederum für verschiedene Lösemittel unterschiedlich hoch, liegt im Mittel jedoch in allen Proben zwischen 20 und 30% der maximalen Aktivität des natürlichen Liganden des VDR Calcitriol. Die quantitative Auswertung dieser Proben ergibt für diese Proben Calcitrioläquivalente (CEQ) von 4-8 μ g CEQ/g Verpackungsmaterial (JERSCH 2010). Der Vitamin-D-Rezeptor ist in die Entwicklung (zelluläre Differenzierung),

Homeostase (Calcium-Metabolismus) und Immunregulation involviert. Disruptive Effekte durch Umweltchemikalien am Rezeptor selbst oder im Vitamin-D-System könnten daher weitreichende Folgen haben. In Robbenpopulationen aus der Ostsee konnten ROUTTI *et al.* (2008) einen negativen Zusammenhang zwischen PCB- und DDT-Konzentrationen in der Leber und der Konzentration an Vitamin D₃, Calcium, Phosphat und Thyroidhormon in Blutproben feststellen. Die Autoren vertreten die Hypothese, dass die in den Robben beobachteten Knochenläsionen auf eine Disruption des Vitamin-D- und Thyroidsystems durch PCB und DDT zurückzuführen ist. Derzeit liegen weder Substanz- und Expositionsdaten, noch Studien zur Umweltrelevanz von Vitamin-D-Disruptoren vor.

Signifikante Aktivität am RXR konnte im Rahmen des Projektes erstmals für PP- und PS-Extrakten detektiert werden (Abbildung 15 B). Zudem wurden bekannte Umweltchemikalien auf deren Aktivität am RXR untersucht. Die Organozinnverbindungen TBT und TPT erwiesen sich als äußerst potente Agonisten des RXR und erreichten (TBT) oder übertrafen (TPT) die Aktivität des natürlichen Liganden 9-cis-Retinsäure (JERSCH 2010). NISHIKAWA *et al.* (2004) konnten zeigen, dass die tributylierten Organozinnverbindungen ebenfalls eine hohe Affinität zum RXR-Ortholog in *Thais clavigera* haben und schlagen vor, dass das durch TBT induzierte Impossexphänomen in Mollusken (OEHLMANN *et al.* 2007) über den RX-Rezeptor vermittelt ist (NISHIKAWA 2006).

Im Zusammenhang mit den hier präsentierten In-vitro-Daten ergibt sich eine interessante Hypothese: Unter der Annahme, dass die RXR-aktiven Substanzen aus PP Impossex auslösen können, lässt sich ein Expositionsszenario für marine Mollusken und Kunststoffmikrofragmente (< 1 mm) ableiten (Tabelle 5). Dieses theoretische Szenario basiert auch auf Studien, die zeigen konnten, dass von Mollusken aufgenommene Kunststoffmikrofragmenten vom Magen in die Hämolymphe transferiert werden und dort eine erstaunlich lange Aufenthaltszeit aufweisen (BROWNE *et al.* 2008).

Tabelle 5: Expositionsszenario für RXR-Aktivität (TBT-Äquivalente) aus Kunststoffmikrofragmenten am Beispiel von *Hydrobia ulvae*.

exposure	maximum RXR activity detected in PP	33.1 µg TBT-EQ/g
	ingestion of 50 µg PP microfragments	1.66 ng TBT-EQ
	internal exposure (25%)	0.42 ng TBT-EQ
effect	threshold for imposex induction	100 ng TBT/g tissue
	threshold for a specimen (5 mg weight)	0.5 ng TBT/individual
margin of safety		0.84

Die in Kunststoff gemessene RXR-Aktivität lässt sich anhand eigener Daten in TBT-Äquivalente umrechnen. Im Fall der PP-Extrakte kann eine maximale Aktivität von 33,1 µg TBT-EQ/g Material detektiert werden (JERSCH 2010). Die Aufnahme eines 50 µg schweren Mikrofragmentes aus PP durch *Hydrobia ulvae* würde so beispielsweise unter konservativen Bedingungen (25% Resorption) zu einer internen Exposition mit 0,42 ng TBT-Äquivalenten führen. Die Schwelle für die Impossexinduktion bei *H. ulvae* liegt bei 100 ng TBT/g Gewebe (SCHULTE-OEHLMANN *et al.* 1998), so dass sich für ein Individuum von 5 mg Gewicht ein Schwellenwert von 0,5 ng TBT ergibt. Der Vergleich der Exposition (0,42 ng TBT-EQ pro Individuum) mit der toxikologisch wirksamen Konzentration (0,5 ng TBT pro Individuum) macht deutlich, dass zwischen beiden ein äußerst geringer Sicherheitsbereich (margin of safety) liegt.

Dieses rein theoretische Szenario verdeutlicht den Wert von In-vitro-Daten für die integrierte Expositionsanalyse und v.a. auch die Hypothesengenerierung. Es macht auch deutlich, dass Kunststoffe eine relevante Expositionsquelle für Endokrine Disruptoren in der Umwelt sein

können. Ein solches Szenario bedarf jedoch der Überprüfung *in vivo*; auch ist die Datenbasis zum Vorkommen von Kunststoffen in der Umwelt mehr als lückenhaft. Insbesondere Herkunft, Material und Menge der Mikrofragmente sind unzureichend charakterisiert und sollten in zukünftigen Forschungsvorhaben untersucht werden (Abs. 9.1 und 9.2).

4.7 Zusammenfassung: Extraktion und Yeast-Two-Hybrid

Aus den Daten lässt sich ableiten, dass trotz des begrenzten Probenumfangs Substanzen mit agonistischer Aktivität am Östrogenrezeptor (PE oder PVC), RXR (PP, PS) und Vitamin-D-Rezeptor (HDPE, PP, PE oder PVC) aus Kunststoffverpackungen extrahiert werden können. Die Extrakte weisen z.T. eine erhebliche Potenz auf, wie z.B. über 30 µg TBT-EQ/g Kunststoff im Fall von PP. Am Thyroidrezeptor war für die untersuchten Proben keine agonistische Aktivität feststellbar. Es ist aber notwendig, weitere, bisher vernachlässigte Hormonrezeptoren bei der Charakterisierung des endokrinen Potentials einzubeziehen (vgl. Abs. 3.3), da viele Umweltchemikalien nicht nur die bisher hauptsächlich untersuchten Steroidrezeptoren beeinflussen.

Die Extraktion von Kunststoffproben bildet ein Worst-case-Szenario zur Freisetzung von endokrin aktiven Substanzen. Aufgrund der vielen Vorteile (Verringerung von Ressourcenaufwand, Variabilität etc.) könnte sich für zukünftige Forschungsvorhaben ein gestuftes Verfahren zur Charakterisierung der endokrinen Aktivität aus Kunststoffen anbieten: Im ersten Schritt sollten die Proben lösemittelbasiert extrahiert und *in vitro* getestet werden. Bei positiven Proben könnten im zweiten Schritt Migrationsverfahren eine realistische Betrachtung der Auslaugens der entsprechenden Komponenten *in vitro* ermöglichen, während auf der dritten Stufe In-vivo-Studien mit sensitiven aquatischen Invertebraten Aufschluss darüber geben können, inwiefern die Kunststoffexposition tatsächlich zu umweltrelevanten Effekten führt. Voraussetzung für die Etablierung der letzten beiden Stufen wäre die Etablierung eines standardisierten Migrationsverfahrens, welches eine realistische Umweltsituation widerspiegelt. Hierfür fehlen derzeit zuverlässige Daten zum Umweltverhalten von Kunststoffen und deren Inhaltsstoffen. Weiterhin werden Expositionsdaten für Kunststoffe in der Umwelt (insbesondere Mikrofragmente) benötigt, um realistische In-vivo-Studien durchführen zu können.

5 Modell Mineralwasser

Zur Erprobung der im Projekt entwickelten und optimierten Methoden soll ein reales Beispiel gewählt werden. Wegen der Vielfalt im Bereich Kunststoff- und Verpackungsmaterial (vgl. Abs. 3.1) ist eine Fokussierung auf ein ausgewähltes und überschaubares Modell notwendig. Hierfür wird verpacktes Mineralwasser ausgewählt, wobei sowohl die endokrine Aktivität des Produktes selbst (Abs. 5.1), als auch die Migration aus verschiedenen Verpackungsmaterialien (Glas, PET, Karton) charakterisiert werden (Abs. 5.2). Zudem sollen verschiedene Ansätze zur wirkbezogenen Analytik am Modell Mineralwasser erprobt werden (u.a. Abs. 6.3 und 6.5).

Für die Fokussierung auf Mineralwasser als Modell sprechen, neben der Relevanz für den Verbraucher (Produkt) und für die Umwelt (Verpackung), eine Reihe von Argumenten:

- Lebensmittelverpackungen stellen den Hauptteil der Kunststofffragmente dar, die in marinen Ökosystemen gefunden werden (BROWNE *et al.* 2010),
- 80% der in marinen Sedimenten gefundenen Mikrofragmente bestehen aus dichten Polymeren ($>1,3 \text{ g/cm}^3$), zu denen auch PET gehört (BROWNE *et al.* 2010),
- Mineralwasser ist eine einfach handhabbare Matrix, die wie andere wässrige Umweltproben gut aufgearbeitet und *in vitro* untersucht werden kann,
- Mineralwasser ist in verschiedenen Verpackungstypen erhältlich, so dass der Vergleich zwischen den einzelnen Materialien (Glas, PET Einweg, PET Mehrweg, Karton) möglich ist,
- eigene Vorversuche belegen die östrogene Aktivität diverser Mineralwasserproben (WAGNER 2006)
- die im Projekt untersuchten PET-Materialien sind häufig östrogen aktiv (Tabelle 4, ca. 30% positive Befunde in den Migrationsstudien),
- die endokrinen Eigenschaften von PET sind zu Beginn des Projektes nicht untersucht.

Vor diesem Hintergrund hat die systematische Untersuchung der endokrinen Aktivität von Mineralwasserproben und -verpackungen Modellcharakter für die Charakterisierung von Kunststoffen als Expositionsquelle für Endokrine Disruptoren.

5.1 Ausgangslage: Östrogene Aktivität in Mineralwasser und aus PET

Die in WAGNER & OEHLMANN (2009) dokumentierten Befunde zur östrogenen Aktivität in Mineralwasser bilden die Ausgangslage für weiterführende Untersuchungen in diesem Bereich. In dieser Publikation werden In-vitro-Daten zur östrogenen Aktivität von unaufgearbeiteten Mineralwasserproben präsentiert, die mit dem YES erhoben wurden. Die Datenlage deutet auf eine weitreichende östrogene Kontamination dieses Lebensmittels hin, wobei 60% der 20 untersuchten Mineralwassermarken eine signifikant erhöhte östrogene Aktivität aufweisen. Bei der Quantifizierung des endokrinen Potentials wird deutlich, dass die Mineralwasserproben mit einer mittleren Aktivität von 18 ng EEQ/L und einer maximalen Aktivität von 75 ng EEQ/L deutlich stärker aktiv sind, als viele andere mit dem gleichen Testsystem untersuchte wässrige Umweltproben. Quantitative Daten über die östrogene Belastung von Mineralwasser standen zum Zeitpunkt der Veröffentlichung nicht zum Vergleich zur Verfügung, allerdings unterstützen eine Reihe von unabhängig durchgeführten Studien die hier gemachten Befunde.

BOEHMLER *et al.* (2006) dokumentieren die östrogene Aktivität von Mineralwasserextrakten im E-Screen und stufen etwa ein Viertel der untersuchten Mineralwässer als östrogen aktiv ein. Die von den Autoren verwendete Quantifizierungsmethode (Relative

Proliferationseffekte, RPE) ist zwar nicht direkt mit den hier angewandten EEQ vergleichbar, zeigt allerdings z.T. erhebliche östrogene Potenzen. Eine Neuberechnung der Rohdaten in EEQ mit dem von WAGNER & OEHLMANN (2009) verwendeten Verfahren ergibt östrogene Aktivitäten im Bereich von 5 bis 15 ng EEQ/L. Die mit dem E-Screen erhobenen Daten befinden sich somit in Übereinstimmung mit den im YES gemachten Befunden. Auch entkräftet die Verwendung eines anderen In-vitro-Systems durch BOEHLER *et al.* (2006) Bedenken, es könnte sich um YES-spezifische Artefakte handeln.

In einer parallel zur hier beschriebenen Studie erschienenen Arbeit untersuchen PINTO & REALI (2009) SPE-Extrakte italienischer Mineralwasser im YES und detektieren in den neun untersuchten Proben eine östrogene Aktivität im Bereich von 1 bis 23 ng EEQ/L. Insofern liegt eine dritte peer-review-Studie zur östrogenen Belastung von Mineralwasser vor. Bedingt durch den Einsatz eines cut-off-Wertes bei 10% der Aktivität der Positivkontrolle gelangen die Autoren zu der Schlussfolgerung, dass nur 10% der Proben östrogen aktiv sind. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass das von PINTO & REALI (2009) eingesetzte Hefesystem im Vergleich zu dem im Projekt verwendeten um eine Größenordnung weniger empfindlich ist. Dies könnte bedeuten, dass die Zahl der östrogen positiven Befunde durch den Einsatz eines insensitiven Testsystems herabgesetzt wurde.

Neben den vorgestellten peer-review-Studien existieren weitere, nicht in Fachzeitschriften veröffentlichte Untersuchungen, welche die Existenz von östrogen aktiven Substanzen in Mineralwasser weiter untermauern: Ein von der Environmental Working Group in Auftrag gegebene Studie weist die östrogene Aktivität von US-amerikanischem Mineralwasser im E-Screen nach (NAIDENKO *et al.* 2008). Die östrogene Aktivität von deutschen Mineralwässern wird durch eine unabhängige Studie an der RWTH Aachen mit dem von WAGNER & OEHLMANN (2009) verwendeten In-vitro- und Quantifizierungsmethoden bestätigt (Prof. H. Hollert, Aachen, pers. Mitteilung).

Zur Frage der Herkunft der östrogenen Aktivität werden drei potentielle Quellen postuliert und in WAGNER & OEHLMANN (2009) eingehend diskutiert. Zunächst kommt ein Eintrag aus dem Mineralbrunnen selbst in Betracht, der von BOEHLER *et al.* (2006) diskutiert und z.T. anhand der Untersuchung von Rohwässern belegt wird. Im vorliegenden Projekt konnte dieser Hypothese nicht nachgegangen werden, da keine entsprechenden Proben zur Verfügung standen. Eine Kontamination der Brunnen würde jedoch implizieren, dass bereits das Grundwasser östrogen belastet ist. Derzeit sind jedoch keine grundwassergängigen Substanzen mit östrogenen Aktivität nachgewiesen. Auch widersprechen die wiederholten Befunde, dass Leitungswasser (das zumindest teilweise unter Verwendung von Grundwasser hergestellt wird) keine östrogene Aktivität aufweist, dieser Hypothese. Die Überlegung, dass natürliche Substanzen (diskutiert werden Huminsäuren oder Phytoöstrogene) im Grundwasser für die endokrine Aktivität verantwortlich sind, kann als unwahrscheinlich angesehen werden, da die Halbwertszeit von Phytoöstrogenen zu kurz und die Molekülstruktur von Huminsäuren zu groß für eine Bindung an einen Hormonrezeptor ist. Denkbar wäre jedoch eine Kontamination der Brunnenköpfe aus Verbauungsmaßnahmen; so werden hier z.B. Korrosionsschutzfarben eingesetzt (Dr. R. Müller, Frankfurt, pers. Mitteilung). Einer potentiellen Kontamination des Grundwassers mit endokrin aktiven Substanzen sollte in zukünftigen Forschungsvorhaben prioritär nachgegangen werden, da ein Reflux von anthropogenen Umweltchemikalien ins Grundwasser weitreichende Folgen für die Exposition großer Bevölkerungsteile haben kann.

Auch der Herstellungsprozess von Lebensmitteln kann zur Kontamination mit Endokrinen Disruptoren führen, wie DI BELLA *et al.* (2001) am Beispiel von Zitrusöl zeigen konnten. Die Autoren weisen das Auslaugen von Weichmachern (u.a. DEHP) aus Kunststoffteilen nach, welche in den Produktionsanlagen eingesetzt werden. Auch Rückstände von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln könnten im Rahmen der Produktion zur Verunreinigung von Lebensmitteln mit Endokrinen Disruptoren führen (GUENTHER *et al.* 2002). Kunststoffteile in der Produktion könnten eine relevante Quelle für Endokrine Disruptoren sein, jedoch existieren hierzu keine systematischen Untersuchungen. Insbesondere die Freisetzung von endokrin aktiven Substanzen aus Kunststoffverrohrungen sollte untersucht werden, da mit

Epoxydharz beschichtete Rohrleitungen z.B. erhebliche Mengen Bisphenol A freisetzen können (Prof. G. Schönfelder, Berlin, pers. Mitteilung). Im vorliegenden Projekt wurden Kunststoffrohre aus dem Polymer PVDF untersucht, welche als Ersatz für Edelstahlrohre eingesetzt werden. Extrakte dieses Materials waren im YES stark östrogen aktiv.

Als dritte Quelle der im Mineralwasser detektierten östrogenen Aktivität kommt die Verpackung selbst in Betracht. Bei der Analyse der in WAGNER & OEHLMANN (2009) vorgestellten In-vitro-Daten wird deutlich, dass Mineralwasser aus PET-Flaschen im Vergleich zu Wasser aus Glasflaschen häufiger und stärker östrogen belastet ist: Sieben von neun Proben aus PET sind signifikant östrogen aktiv, wohingegen dies nur auf drei von neun Proben aus Glasflaschen zutrifft. Die mittlere Östrogenität von Mineralwasser aus PET-Flaschen ist etwa doppelt so hoch wie die von Proben aus Glasflaschen. Beide Aspekte deuten darauf hin, dass das Verpackungsmaterial PET eine Quelle für die östrogene Aktivität darstellen könnte. Um dieser Hypothese weiter nachzugehen, wurde ein In-vivo-Versuch mit *Potamopyrgus antipodarum* durchgeführt, der im Detail in WAGNER & OEHLMANN (2009) beschrieben ist. Im Rahmen dieser Studie wurden die östrogenen Effekte untersucht, welche von Substanzen ausgelöst werden, die aus verschiedenen Flaschenmaterialien auslaugen. Nach 56 Tagen ist die Reproduktion von *P. antipodarum*, welche in PET-Flaschen gehältert wurden, verdoppelt verglichen mit den Negativkontrollen (Borosilikatglas 3.3) und den Individuen in Mineralwasserflaschen aus Glas (Abbildung 16). Da die Reproduktion von *P. antipodarum* östrogenabhängig ist (DUFT *et al.* 2003a; DUFT *et al.* 2003b; JOBLING *et al.* 2004; SCHMITT *et al.* 2008), belegen diese Ergebnisse, dass östrogen wirksame Substanzen aus dem Verpackungsmaterial PET ausgelaugt sind.

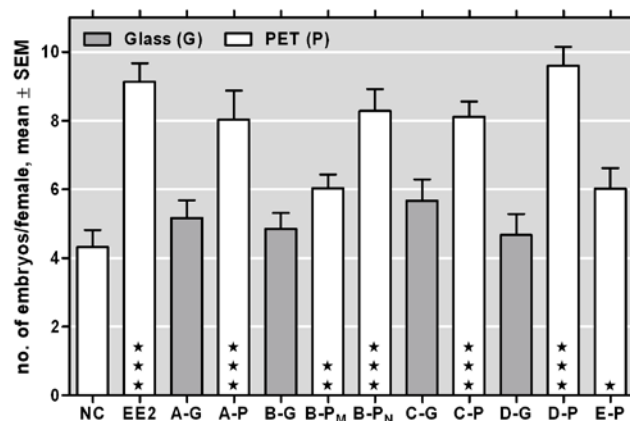


Abbildung 16: Reproduktion von *Potamopyrgus antipodarum* nach achtwöchiger Hälterung in Glas und PET-Flaschen (aus WAGNER & OEHLMANN 2009). Mann-Whitney U-Test: signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle (NC) *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. $n=60$.

Diese Daten verdeutlichen den Wert des Einsatzes von Biotests zur Charakterisierung des endokrinen Potentials: Während routinemäßige analytische Untersuchungen von Mineralwasser und Verpackungsmaterial keine Hinweise auf eine Kontamination geben konnten, lassen sich die biologischen Effekte unbekannter Endokriner Disruptoren mit Hilfe von Biotests beschreiben. Auch bilden Biotests die integrierten Effekte einer Probe unbekannter Zusammensetzung ab: Komplexe Mixtureffekte – etwa durch mehrere östrogen aktive Komponenten – können so charakterisiert werden.

Diese Abbildung von Mischungseffekten ist für die Expositionsanalyse von großem Wert, da unter Realbedingungen immer eine Exposition mit einer komplexen Mischung von Substanzen gegeben ist. Die in WAGNER & OEHLMANN (2009) vorgestellten Daten sind hierfür ein Beispiel, da es auch im Fall des Mineralwassers als wahrscheinlich angesehen werden kann, dass die beobachteten Effekte von einer Mischung von Substanzen ausgelöst werden. Das Konzept der Mischtoxizität in der Toxikologie ist lange etabliert (LOEWE & MUISCHNEK 1926; BLISS 1939), experimentell überprüft und anerkannt, wird aber nicht immer

konsequent angewendet. So kommen FRANZ & WELLE (2009) in einer theoretischen Studie zu dem Schluss, dass die Migration einer einzelnen Substanz aus PET die von WAGNER & OEHLMANN (2009) beobachteten Effekte nicht erklären kann. Diese Schlussfolgerung liegt aufgrund der hohen östrogenen Aktivitäten nahe und wurde bereits in der Originalarbeit diskutiert (WAGNER & OEHLMANN 2009). Dass jedoch auch eine Mischung von mehreren schwach östrogen aktiven Chemikalien in sehr niedrigen Konzentrationen (< NOEC) signifikante Effekte erzeugt, konnten SILVA *et al.* (2002) *in vitro* zeigen. Inzwischen existieren in der Literatur unzählige Mixturstudien, welche *in vitro* und *in vivo* belegen, dass Mischungen von Endokrinen Disruptoren in jeweils niedrigen Einzelkonzentrationen deutliche Effekte auslösen können (u.a. CHRISTIANSEN *et al.* 2009). Es ist somit wahrscheinlich, dass auch die im Mineralwasser detektierte östrogene Aktivität von einer Mischung aus mehreren, niedrig konzentrierten endokrin aktiven Substanzen ausgelöst wird.

5.2 Migrationsdaten: Mischung aus Östrogenen und Antiöstrogenen

Die Mischtoxizität spielt auch bei der Interpretation des im Folgenden dargestellten Migrationsversuches eine wichtige Rolle. Um Variabilitäten aufgrund von potentiellen Kontaminationen des Surrogates (Abs. 4.3) zu vermeiden, werden in diesem Versuchsdesign ungeöffnete Mineralwasserflaschen verschiedener Marken verwendet. Insgesamt werden 13 Proben á fünf Flaschen untersucht, welche aus jeweils derselben Charge stammen. Diese werden dem Migrationsansatz bei 40°C jeweils nach 1, 5, 10, 20 und 40 Tagen entnommen, extrahiert und in YES, E-Screen und YAES untersucht. YES und E-Screen werden verwendet, um die östrogene Aktivität im Verlauf des Migrationsexperimentes aufzuzeichnen. Der YAES soll Auskunft darüber geben, ob eventuell vorhandene Antiöstrogene die östrogene Aktivität über den Zeitverlauf maskieren und so für die bereits beobachteten Migrationsprofile verantwortlich sind (vgl. Abs. 4.1 und 4.2).

Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 17 beispielhaft dargestellt. Auch mit dem E-Screen können Migrationsprofile detektiert werden, die denen aus vorangegangenen Migrationsstudien ähneln. Während Mineralwasser aus Glasflaschen der Marke A (Abbildung 17 A) über den gesamten Zeitraum nur eine geringe östrogene Aktivität aufweist, weist das gleiche Wasser in PET-Flaschen und Kartonverpackungen zu unterschiedlichen Zeiten östrogene peaks auf. Abbildung 17 B zeigt die über den gesamten Versuchszeitraum integrierten Östradioläquivalente. Es wird wiederum deutlich, dass im direkten Vergleich der unterschiedlich verpackten Proben eines Herstellers, Mineralwasser aus Glasflaschen meist deutlich geringere östrogene Aktivitäten aufweist. Die einzige Ausnahme bilden Proben der Marke B, bei denen Wasser aus Glasflaschen und zwei verschiedenen Typen von PET-Einwegflaschen (B-PC) vergleichbar niedrige endokrine Aktivität hat. Diese mit dem E-Screen erhobenen Daten untermauern die Hypothese, dass das Verpackungsmaterial zur östrogene Kontamination des Produktes beitragen kann.

Auch Antiöstrogene können in dieser Migrationsstudie nachgewiesen werden. Abbildung 17 C zeigt den Zeitverlauf stellvertretend für Probe der Marke B. Wiederum zeigt Wasser aus Glasflaschen nur eine geringe endokrine Aktivität, während bei dem gleichen Mineralwasser aus PET-Flaschen z.T. erhebliche antiöstrogene Potenzen detektiert werden. Bei zwei Flaschentypen lässt sich diese nach 20 Tagen mit ca. 75% Inhibition quantifizieren. Die integrierte Betrachtung des antiöstrogenen Potentials zeigt, dass sich die Aktivität von Mineralwasser desselben Herstellers in Abhängigkeit vom Verpackungsmaterial unterscheidet: In den meisten Fällen ist auch hier das antagonistische Potential in PET-verpacktem Wasser deutlich größer. Ausnahmen bilden die Proben von Mehrweg-PET-Flaschen der Marken A sowie Einweg-PET-Flaschen der Marken B und D.

Ein direkter Vergleich der östrogenen und antiöstrogenen Migrationsprofile einer unaufgearbeiteten Wasserprobe ist beispielhaft in Abbildung 17 E dargestellt. Zu Beginn des Experimentes ist diese Probe im YES östrogen aktiv, was in einer negativen Inhibition im YAES resultiert. Im weiteren Zeitverlauf nimmt die Östrogenaktivität ab, während gleichzeitig Antiöstrogene zu detektieren sind, welche nach 40 Tagen so dominant sind, dass keine

östrogene Aktivität mehr messbar ist. Dieses Wechselspiel von Agonisten und Antagonisten am Östrogenrezeptor belegt, dass die in Mineralwasser vorhandenen Antiöstrogene die östrogene Antwort maskieren können und so zu den beobachteten Migrationsprofilen führen können. Aufgrund der gewonnenen Daten ist es wahrscheinlich, dass eine Mischung aus mehreren östrogen und mindestens einer antiöstrogen aktiven Komponenten im Mineralwasser vorliegt. Die Herkunft letzterer könnte wiederum in der Verpackung liegen, allerdings ist hierbei der Einfluss weniger deutlich wie bei der östrogenen Aktivität (vgl. Abbildung 17 D).

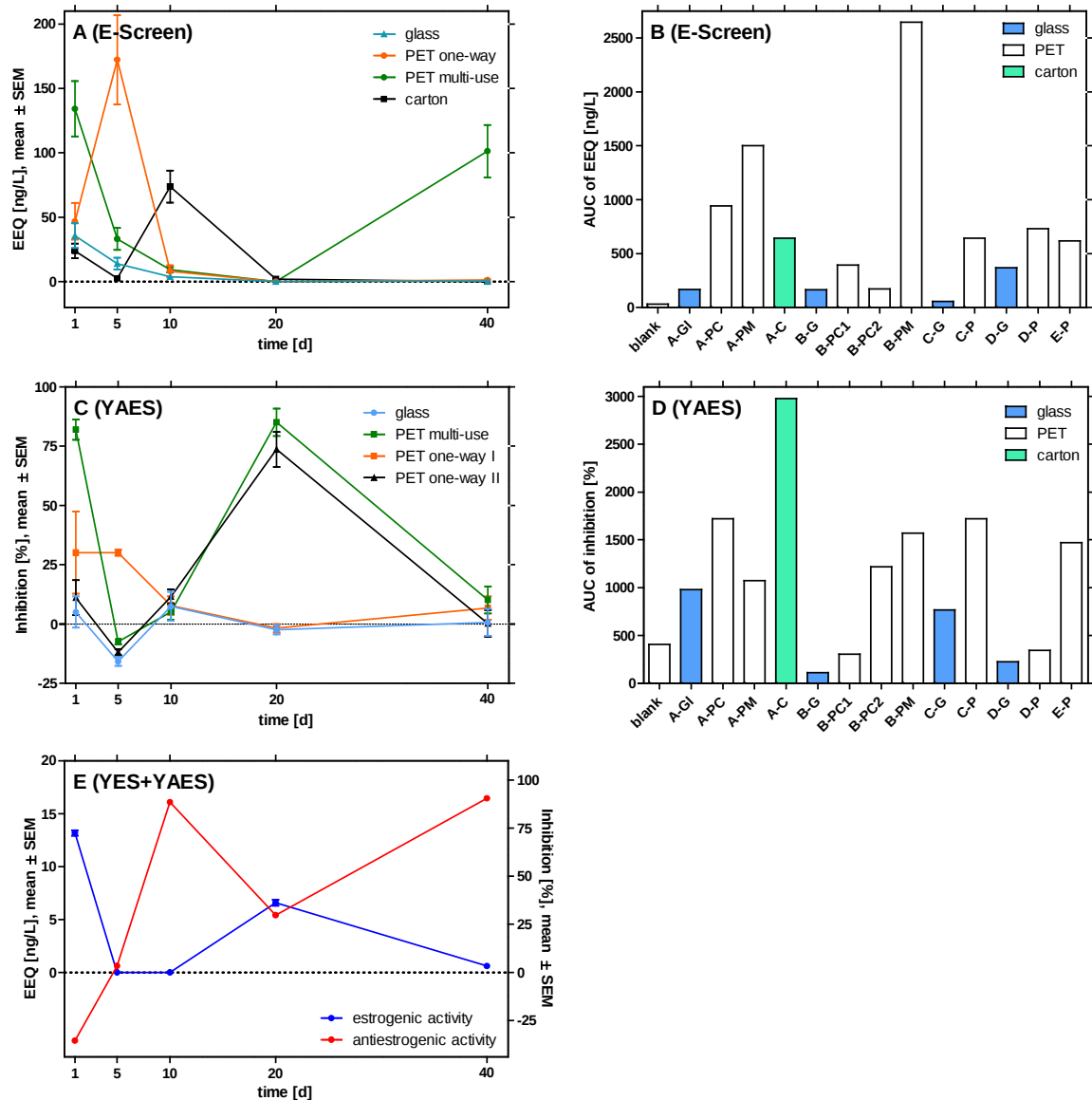


Abbildung 17: Endokrine Aktivität im Migrationsversuch mit Mineralwasser. Dargestellt ist die östrogene Aktivität von Extrakten im E-Screen (EEQ, Zeitverlauf einer Marke in A, integrierte Aktivität in B) und deren antiöstrogene Aktivität im YAES (Inhibition, Zeitverlauf einer Marke in C, integrierte Aktivität in D). In E ist der direkte Vergleich von östrogenen und antiöstrogenen Aktivitäten am Beispiel einer Wasserprobe gezeigt.

5.3 Festphasenextraktion: Selektive Aufreinigung verschiedener endokrin aktiver Bestandteile

Wie bereits in Abs. 3.6 ausgeführt, ist die Wahl der Extraktionsmethode entscheidend für die Aufreinigung von unbekannten endokrin aktiven Substanzen aus Wasserproben. Von diversen Versuchen zur Optimierung der Festphasenextraktion für Mineralwasser ist hier beispielhaft der Vergleich von fünf verschiedenen SPE-Verfahren dargestellt (WAGNER & OEHLMANN 2010). Abbildung 18 A zeigt, dass keine der angewandten Methoden in der Lage ist, östrogen aktive Substanzen aus einer Mineralwasserprobe zu isolieren, die in unaufgearbeiteter Form östrogen aktiv war (vgl. Abs. 3.6). Dies ist insofern problematisch, als es sich in der Mehrheit um standardmäßig zur Aufreinigung von Umweltproben verwendete Methoden handelt (u.a. C18- und Oasis HLB-Matrizes). Selbst ein Extraktionsverfahren, welches auf einer Aktivkohlematrix basiert (CARB) und somit alle organischen Komponenten zurückhalten sollte, ist nicht in der Lage, Östrogene anzureichern. Das Unvermögen dieser Methoden, östrogen aktive Komponenten aus Mineralwasser zu extrahieren, verhindert nicht nur deren analytische Identifizierung, sondern kann zu falsch-negativen Befunden führen, wenn nicht parallel unbehandelte Wasserproben untersucht werden. Dies könnte auch ein Grund für die niedrigen Aktivitäten sein, die PINTO & REALI (2009) in ihrer Studie detektieren. Als ein möglicher Erklärungsansatz für die ungenügende Extraktionseffizienz können spezifische chemische Eigenschaften der östrogen aktiven Zielkomponenten postuliert werden: Diese könnten entweder leicht flüchtig sein (dies wurde in den hier gezeigten Versuchen berücksichtigt) oder so polar, dass sie nicht an gängige SPE-Matrizes binden.

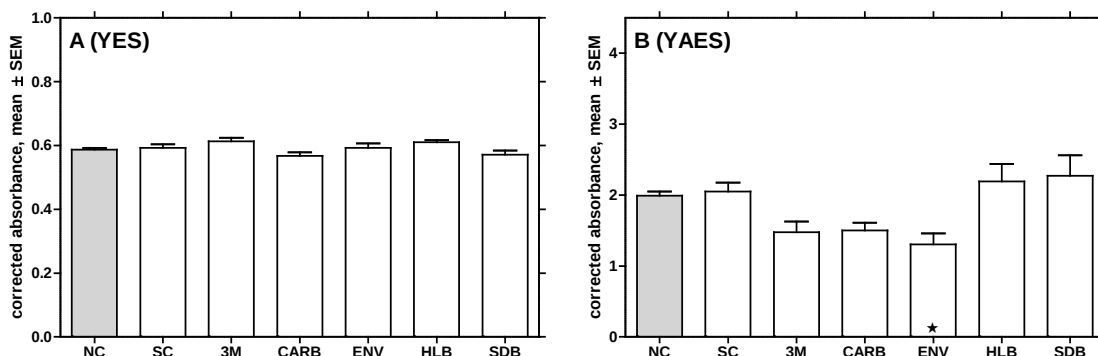


Abbildung 18: Vergleich verschiedener Methoden zu Festphasenextraktion (SPE) am Beispiel einer Mineralwasserprobe im YES und im YAES. Östrogene Aktivität (A) und antiöstrogene Aktivität (B) der SPE-Extrakte. Kruskal-Wallis mit Dunn's post-Test, signifikante Unterschiede gegenüber der Negativkontrolle (NC) ★ $p < 0,05$; NC: $n = 72$, SC: $n = 16$, Proben: $n = 7-8$.

Die gleichzeitige Analyse der antagonistischen Aktivität der verschiedenen SPE-Extrakte ist in Abbildung 18 B gezeigt. Die Methode mit Isolute ENV+-Säulen ist geeignet, antiöstrogen aktive Substanzen aus Mineralwasser anzureichern und wird in der Folge verwendet, um eine größere Anzahl von Proben zu untersuchen. In dieser Studie mit SPE-Extrakten 18 verschiedener Mineralwasserproben weisen 50% der Proben eine signifikant erhöhte antiöstrogene Aktivität im YAES auf (Abbildung 19 A). Diese Proben enthalten somit Substanzen, die 30-60% des durch 17β -Östradiol induzierten Effektes inhibieren. Zu beachten ist, dass sich die dargestellte Inhibition auf die Aktivität des Extraktes im YAES bezieht. Im Versuch werden Extrakte eingesetzt, welche einem Probenvolumen von 3,75 mL Mineralwasser entsprechen. Ein inhibitorischer Effekt von 60% durch ein solch kleines Probenvolumen kann demnach als äußerst potent eingestuft werden. Er ist mit dem des als Positivkontrolle eingesetzten synthetischen Antiöstrogens (Hydroxytamoxifen, 80 μ M) vergleichbar.

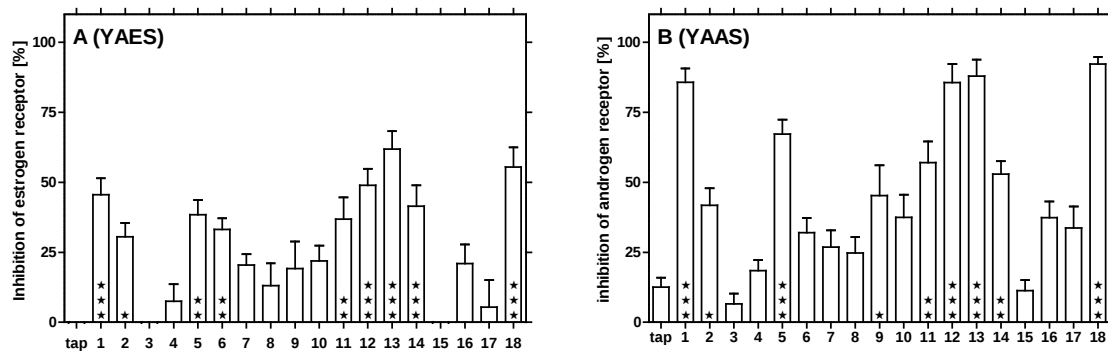


Abbildung 19: Antiöstrogene (A) und antiandrogene Aktivität (B) von SPE-Extrakten 18 verschiedener Mineralwassermarken. Dargestellt ist die Inhibition des jeweiligen Rezeptors, welche in drei Extrakten pro Probe in je drei Versuchen bestimmt wurde. Kruskal-Wallis mit Dunn's post-Test, signifikante Unterschiede gegenüber der Negativkontrolle (NC) ★★★ $p < 0,001$, ★★ $p < 0,01$, ★ $p < 0,05$. $n = 9$.

Die Ergebnisse der Untersuchung derselben Proben im YAAS wird in Abbildung 19 B dargestellt. Auch im Test auf antiandrogene Effekte weist die Hälfte der Mineralwasserextrakte eine signifikant erhöhte Aktivität auf. Die detektierte Antiandrogenität ist stärker als die zuvor beschriebene antiöstrogene Aktivität: Sie reicht von 40-90% Inhibition am Androgenrezeptor. Interessant ist der Vergleich von Antiöstrogenität und -androgenität: Beide sind hochsignifikant positiv miteinander korreliert (Abbildung 20), was darauf hindeutet, dass die gleiche Substanz oder Mischung für die antagonistischen Effekte am Östrogen- und Androgenrezeptor verantwortlich ist.

Dass Umweltchemikalien Antagonisten beider Steroidrezeptoren sein können, weisen ORTON *et al.* (2009) für diverse Pflanzenschutzmittel nach: Hier waren u.a. Isoproturon und Pentachlorphenol gleichzeitig potente Antiöstrogene und -androgene. Über die chemische Identität der hier erstmals beschriebenen antagonistischen Aktivität in Mineralwasser sollen weiterführende Untersuchungen Aufschluss geben (siehe Abs. 6.5).

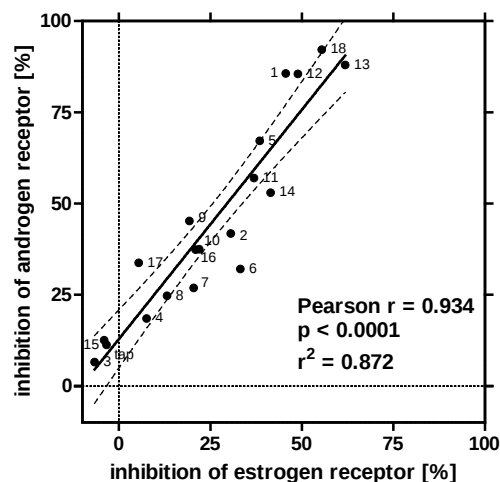


Abbildung 20: Korrelation der antiöstrogenen und antiandrogenen Aktivität von Mineralwasserextrakten. Lineare Regression (mit 95%-Konfidenzintervall), die Parameter der Korrelation sind in der Abb. vermerkt. $n = 19$.

5.4 Aktivität von Mineralwasserextrakten im E-Screen

Die mit der ENV+-Methode gewonnenen Mineralwasserextrakte werden ebenfalls im E-Screen untersucht. Wie zu erwarten war, weisen die Proben hierbei kaum östrogene Aktivität auf (Abbildung 21 A), da diese – wie im YAES belegt – vor allem antiöstrogen aktive Komponenten enthalten. Demgemäss proliferieren die MCF7-Zellen bei Exposition mit den Extrakten weniger stark als die Kontrollen (negative relative Antwort). Besonders auffällig ist Mineralwasserprobe 1, welche stark antiöstrogen im YAES und stark antiproliferativ im E-Screen ist. Dies deutet darauf hin, dass die in den Proben vorhandenen Antiöstrogene durch Inhibition des Östrogenrezeptors im E-Screen ein langsames Zellwachstum bewirken. Bei der Korrelation der Parameter aus beiden In-vitro-Assays zeigt sich ein Zusammenhang von Antiöstrogenität und verringertem Wachstum, der allerdings nicht statistisch signifikant ist. Hier ist zu beachten, dass der E-Screen im Gegensatz zum YAES nicht für die Untersuchung von Antiöstrogenen geeignet ist, da auch cytotoxische Effekte die Zellzahl verringern können. Diese sind im Fall von zwei Extrakten (5 und 11) so deutlich, dass sich die Toxizität durch optische Kontrolle der Zellen bestätigen lässt. Insgesamt bilden die Daten aus beiden In-vitro-Assays hinsichtlich der antiöstrogenen Aktivität jedoch ein konsistentes Bild.

Um abschließend die von BOEHMLER *et al.* (2006) angewandte SPE-Methode im E-Screen zu überprüfen, werden die selben Mineralwasserproben wie im vorangegangenen Versuch mit C18-Säulen aufgearbeitet. Beim Einengen der Extrakte wird DMSO als *keeper* verwendet, um leicht flüchtige Substanzen zurückzubehalten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 B dargestellt. In Übereinstimmung mit früheren Befunden (BOEHMLER *et al.* 2006; WAGNER & OEHLMANN 2009) weisen ca. 60% der untersuchten Mineralwasserproben eine signifikant erhöhte östrogene Aktivität auf. Auch die detektierte östrogene Potenz (16-40% relative Proliferationseffekte) ist vergleichbar mit den von BOEHMLER *et al.* (2006) publizierten Daten. Insofern können diese Daten sowohl frühere Studien bestätigen, als auch die eigenen Daten zur östrogenen Aktivität von unaufgearbeitetem Mineralwasser untermauern.

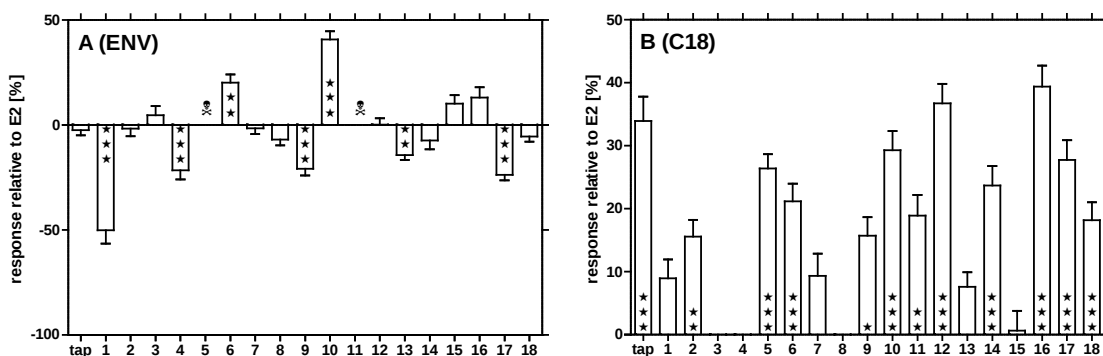


Abbildung 21: Östrogene Aktivität von SPE-Extrakten 18 verschiedener Mineralwassermarken im E-Screen. Relative Antwort im Vergleich zu 17β-Östradiol in Extrakten aus zwei verschiedenen SPE-Methoden (ENV und C18). Daten aus drei unabhängigen Versuchen, Kruskal-Wallis mit Dunn's post-Test, signifikante Unterschiede gegenüber der Negativkontrolle (NC) *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. $n = 23-24$.

Ein Vergleich der Verpackung stand hierbei nicht Fokus, allerdings wurden fünf Mineralwassermarken untersucht, die jeweils in Glas und PET abgepackt waren. Zwei dieser Probenpaare sind im E-Screen nicht aktiv (3+4, 7+8). Bei den restlichen Paaren (9+10, 11+12, 15+17) zeigt sich, dass Mineralwasser aus PET in allen Fällen signifikant erhöhte östrogene Aktivitäten im Vergleich zur zugehörigen Glasprobe aufweist (Mann-Whitney U-Test, $p < 0,005$). Diese Daten bestätigen die in WAGNER & OEHLMANN (2009) aufgestellte Hypothese, dass PET eine Quelle für östrogen aktive Komponenten sein kann. Dass es weitere Quellen der östrogenen Kontamination gibt, bleibt unbestritten: Die vorliegenden

Daten zeigen, dass Mineralwasser aus Glasflaschen auch östrogen aktive Substanzen enthalten kann (insb. Proben 9+11).

5.5 Zusammenfassung: Mineralwasser

Die am Modell Mineralwasser durchgeführten Studien bestätigen eine Reihe der im methodischen Bereich diskutierten kritischen Punkte (Kapitel 3) und zeigen, dass die entwickelten und optimierten Methoden für die Anwendung auf ein reales Modell geeignet sind. Die integrierte Betrachtung der endokrinen Aktivität mit Hilfe von In-vitro-Assays (Abs. 3.2) ist vorteilhaft, da sowohl unbekannte endokrin aktive Substanzen detektiert werden, als auch Mischungseffekte integriert werden. Die in den Biotests gewonnenen Daten zeigen, dass die Zusammensetzung der Proben deutlich komplexer ist als bei traditionellen Betrachtung einzelner bekannter Chemikalien zunächst zu erwarten war. Auch hat sich der Einsatz mehrerer In-vitro-Systeme für den gleichen toxikologischen Wirkmechanismus (Abs. 3.3) bewährt. Am Beispiel von SPE-Extrakten von Mineralwasser konnte gezeigt werden, dass diese im E-Screen deutlich östrogen aktiv sind, während die Aktivität im YES aufgrund der geringeren Empfindlichkeit nicht zu detektieren war. Eine Charakterisierung der endokrinen Aktivität auf Basis nur eines Biotests kann somit zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Die spezifische Optimierung und Modifizierung der In-vitro-Verfahren (Abs. 3.4) ist zur Untersuchung der endokrinen Aktivität von Umweltproben unabdingbar. Dies verdeutlicht u.a. der Vergleich der Daten von PINTO & REALI (2009) und WAGNER & OEHLMANN (2009): Der Einsatz eines In-vitro-Assays mit zu geringer Sensitivität kann unter Umständen ebenfalls zu falsch-negativen Befunden führen. Ein weiterer Aspekt der Methodenanpassung ist die Untersuchung von potentiellen Rezeptorantagonisten. Durch die Aufnahme von YAAS und YAES ins Untersuchungsprogramm konnte belegt werden, dass Mineralwasser potente Antiöstrogene und -androgene enthält. Die Probenaufbereitung (Abs. 3.7) ist auch beim Modellfall Mineralwasser kritisch. Es zeigte sich, dass viele anerkannte Extraktionsmethoden nicht geeignet sind, endokrin aktive Komponenten anzureichern. Auch die Probenbehandlung ist beim Einsatz von In-vitro-Verfahren entscheidend, da z.B. flüchtige östrogen aktive Substanzen durch das Einengen von Mineralwasserextrakten verloren gehen können. Der Einsatz eines *keepers* (DMSO) konnte diese flüchtigen Komponenten zurückhalten, so dass die östrogene Aktivität im E-Screen detektiert werden kann.

Die östrogene Kontamination von Mineralwasser wird in diversen peer-review-Studien nachgewiesen (BOEHMLER *et al.* 2006; PINTO & REALI 2009; WAGNER & OEHLMANN 2009). Die Frage nach der Quelle dieser Verunreinigung kann jedoch nicht abschließend geklärt werden. Verschiedene Autoren legen Daten vor, die den Eintrag der östrogen aktiven Komponenten aus dem Brunnen selbst (BOEHMLER *et al.* 2006), dem Produktionsprozess (DI BELLA *et al.* 2001) und der Kunststoffverpackung (WAGNER & OEHLMANN 2009) belegen. Die hier vorgestellten Daten (Migrationsstudie und E-Screen) untermauern die Hypothese, dass Lebensmittelverpackungen aus PET eine Quelle der östrogenen Kontamination sein können. Alle drei Kontaminationsquellen sollten in weiteren Untersuchungen charakterisiert werden, da sie abseits des spezifischen Falls Mineralwasser relevant für die Exposition von Mensch und Umwelt mit Endokrinen Disruptoren sind.

Die präsentierten Daten verdeutlichen zudem, dass In-vitro-Assays eine umfassendere endokrine Charakterisierung von Mineralwasser ermöglichen als die gezielte chemische Analytik. So konnte in Migrationsstudien gezeigt werden, dass sich die östrogene Aktivität in komplexen Migrationsprofilen über die Zeit verändert. Ein monokausaler Zusammenhang – wie z.B. bei der Betrachtung einer Einzelsubstanz – bietet keine ausreichende Erklärung für derart komplexe Vorgänge. Mit Hilfe von Biotests für Rezeptorantagonisten kann so z.B. nachgewiesen werden, dass Antiöstrogene die östrogene Aktivität des Mineralwassers teilweise überlagern und maskieren. Auch die erstmals gelungene Aufreinigung von potenten Antiöstrogenen und Antiandrogenen aus Mineralwasser macht deutlich, dass ein komplexes Gemisch verschiedener endokrin aktiver Substanzen vorliegt. Hierbei widerspricht der Nachweis von östrogen aktiven Substanzen im YES (Wasserproben) und im E-Screen (C18-

Extrakte) keineswegs der Detektion der entsprechenden Antiöstrogene im YAES (ENV+-Extrakte). Wie gezeigt werden konnte, ist die Wahl der Extraktionsmethode ausschlaggebend für die Ergebnisse der jeweiligen In-vitro-Assays. Die im Mineralwasser selbst detektierten Östrogene sind zu polar, um mit traditionellen SPE-Methoden in genügenden Mengen aufgereinigt zu werden und können somit nicht im YES detektiert werden. Im sensitiveren E-Screen hingegen gelingt der Nachweis dieser Komponenten. Eine zweite SPE-Methode wird zur Aufreinigung von Rezeptorantagonisten optimiert und reinigt diese selektiv aus Mineralwasser auf. Dies führt zu den in YAES und YAAS gemachten Befunden.

6 Wirkbezogene Analytik: Kombination aus Biotests und chemischer Analytik zur Identifizierung der stofflichen Ursachen

Die gezielte chemische Analytik mittels GC-MS und LC-MS wird im Projekt am Modell Mineralwasser durchgeführt. Hierbei werden sowohl Extrakte des PET-Materials als auch des Mineralwassers selbst analytisch untersucht. Weiterhin werden verschiedene Strategien zur wirkbezogenen Analytik und hochauflösenden Massenspektrometrie (LC-HRMS) erprobt.

6.1 Gezielte chemische Analytik: GC-MS und LC-MS/MS-Untersuchungen von PET- und Mineralwasserextrakten

6.1.1 GC-MS-Untersuchungen von PET-Material

Um eine Übersicht über die in PET enthaltenen Substanzen zu gewinnen, werden zwei verschiedenen Flaschen Ultraschall-assistiert mit Methanol extrahiert und in zwei GC-MS-Systemen untersucht (methodische Details in Anhang A6 und A7). Die in den Extrakten detektierten Komponenten sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Qualitative Ergebnisse der chemischen Analytik von MeOH-Extrakten zwei verschiedener PET-Flaschen in zwei unterschiedlichen GC-MS-Systemen. RT = Retentionszeit.

	RT [min]	mass [m/z]	analyte	brand 1	brand 2	remarks
GC-MS-1	8.64	163 + 194 + 135	dimethylterephthalate	X	X	PET synthesis
	11.4	149 + 57	diisobutylphthalate (DIBP)	?	?	plasticiser
	14.7	145	no hits found	X	X	
	13.4	241 + 256 + 133	bisphenol A?	X	X	derivatized
	8.64	163 + 135 + (194)	nonylphenole (techn. mix.)	?		derivatized
	8.64	149 + 121 + 91	4-tert-octylphenole	?	?	derivatized
GC-MS-2	6.31	57	C11 (undecan)	?	?	
	7.31	128	naphthaline	X		
	10.1	57	C14 (tetradecan)		?	
	12.1	191	2,4-di-tert.-butylphenole	X	X	present in blank
	13.9	57	C16 (hexadecan)		X	
	18.6	57	C18 (octadecan)		X	
	20.2	149	diisobutylphthalate (DIBP)	X	X	plasticiser, ~25% present in blank
	22.4	149	dibutylphthalate (DBP)	X	X	plasticiser
	23.2	57	C20 (eicosan)		X	
	34.6	149	diethylhexylphthalate (DEHP)	X	X	plasticiser

Das bei der MeOH-Extraktion detektierte Dimethylterephthalat ist neben Ethylenglycol einer der Hauptausgangsstoffe für die PET-Herstellung und wird aus Paraxylo (ein Rohölzwischenprodukt) durch Oxidation mit Luft und Veresterung mit Methanol gewonnen. 2,4-di-tert-Butylphenol ist als Kontaminant in internen Blindwerten bekannt und stammt somit nicht aus der Probe. Wahrscheinlich stammen einige Phthalate, wie Diisobutylphthalat (DIBP), Dibutylphthalat (DBP) und Diethylhexylphthalat (DEHP) aus dem PET. Berücksichtigt werden müssen hierbei jedoch die durch Blindwertmessungen belegten Einträge aus dem Lösungsmittel, welche in Tabelle 6 angegeben sind (vgl. Anhang A7).

Tabelle 7: Qualitative Ergebnisse der chemischen Analytik des Soxhlet-Extraktes einer PET-Flasche mittels GC-MS. RT = Retentionszeit; prob. = Wahrscheinlichkeit laut NIST-Datenbank.

no.	RT [min]	mass [m/z]	NIST database 05	prob. [%]	CAS	remarks/use
1	8.44	135/150	para-tert-Butylphenol	92	98-54-4	antioxidant, present in blank
2	11.7	191/206	phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	97	96-76-4	antioxidant, present in blank
3	13.4	149/177	diethylphthalat	Stand.	084-66-2	5% present in blank
4	14.3	173/133	no hits found			
5	14.6	99/155/211	tributylphosphat	72	126-73-8	plasticiser
6	15.7-17.2	135/149/121	nonylphenole (techn. mix)		84852-15-3	ID via masses and isomers
7	19.4	149/223	diisobutylphthalat (DIBP)	Stand.	1000308-94-2	plasticiser, 40% present in blank
8	21.6	149/223/205	dibutylphthalat (DBP)	Stand.	84-74-2	plasticiser, 50% present in blank
9	26.4	59/41	9-octadecenamide, (Z)	76	301-02-0	
			tetradecanamide	72	638-58-4	
			hexadecanamide	59	629-54-9	
10	27.0	43/83/111	cyclohexadecan	91	295-65-8	
11	29.3	178/281/161/296	benzenamine	64	17951-64-3	aniline, dye?
12	30.0	343.3	4-pentylbicyclohexyl-4-carboxamide	49	68077-63-4	
13	30.1	59/72	9-octadecenamide, (Z)	93	301-02-0	
14	30.7	59/72	octadecanamid	96	124-26-5	PET production?
15	30.9	128.9/83/113	1-trimethylsilyl-2-(dimethyl-n-pentylsilyl)ethene	43	136935-49-4	
16	31.1	83/69/97	1-eicosene	95	3452-07-1	
17	33.7	149/167/279	diethylhexylphthalat (DEHP)	Stand.	27554-26-3	20% present in blank
18	41.0	296/341/324	no hits found			
19	44.8	341/76/104	bifenox	46	42576-02-3	
20	47.7	385/104/296	dylchicine, 3-demethyl	40	7336-34-7	
21	52	460.4/57/446	no hits found			
22	40.53	73/281/253/341	Octasiloxan		19095-24-0	~ 9 peaks octasiloxane

Zusätzlich zur Methanolextraktion wird Kunststoffmaterial aus einer PET-Flasche mittels Soxhlet-Extraktion aufgearbeitet und ebenfalls in der GC-MS untersucht (Tabelle 7). Die Messungen bestätigen die Präsenz der Phthalate DIBP, DBP und DEHP. Zudem wird technisches Nonylphenol eindeutig identifiziert. Auch der Weichmacher Tributylphosphat ist mit großer Sicherheit in der Probe enthalten. Die detektierten Benzenamide lassen auf Farbstoffe in der blau gefärbten PET-Flasche zurückschließen. Auch die Substanzklasse der Decanamide ist in der Soxhlet-Probe in großer Vielzahl und Menge enthalten. Daneben werden Substanzpeaks identifiziert, die von der NIST-Datenbank nicht zugeordnet werden konnten. Dass es sich hierbei um peaks des Säulenblutens (häufig Siloxane) handelt, kann ausgeschlossen werden.

6.1.2 GC-MS- und LC-MS-Untersuchungen von Mineralwasser

Um die aus Kunststoffextrakten gewonnenen Informationen mit der chemischen Zusammensetzung von Mineralwasser abzugleichen und so Hinweise auf potentiell migrierende Komponenten zu erhalten, werden 10,5 Liter eines Mineralwassers mittels SPE

aufgearbeitet (methodische Details in Anhang A6). Die Untersuchung erfolgt in der GC-MS (Tabelle 8) und LC-MS/MS.

Tabelle 8: SPE-Anreicherung einer derivatisierten Mineralwasserprobe gemessen mittels GC-MS. RT = Retentionszeit; prob. = Wahrscheinlichkeit laut NIST-Datenbank; stand. = Substanz über die Injektion einer Standardlösung eindeutig identifiziert.

no.	RT [min]	Mass [m/z]	NIST database 98	prob. [%]	CAS	remarks/use
1	5.70	138/153/67	1H-Pyrrol-1-yloxy,3(aminocarbonyl)....	8	3229-73-0	
2	7.96	205.2/177/ 220/149/121	2,4-di-tert-butyl-6-methylphenol	25	616-55-7	antioxidant
3	8.22	163/133/77	Dimethylphthalate (DMP)	stand.	131-11-3	plasticiser
4	8.31	161/147/180	Testoster-3,11-dione, 9-thiocyanato-,acetate	20	NA	
5	8.88	163/135/179	Terephthalic acid, dimethylester	41	120-61-6	PET synthesis
6	8.92	205/161/177/ 203/220	2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol	stand.	128-37-0	BHT, Antioxidanz
7	8.97	191.1/206/163	2,3-di-tert-butylphenol	22	26746-38-3	antioxidant
8	9.66	219.1/191/234/175	3,5-di-tert-Butyl-4-hydroxybenzaldehyd	41	1620-98-0	
9	15.4	149/121	Di-isobutylphthalat (DIBP)	stand.	84-69-5	plasticiser
10	16.9	143/227/55/101	Hexadecanoic acid, methyl ester	24	112-39-0	
11	17.5	149/252/415/ 163/121	Dibutylphthalat (DBP)	stand.	84-74-2	plasticiser
12	18.7	67/95/250/83	1,2-Dihydrobenzoe (b)fluoranthen	36	NA	
13	19.6	252/139/270/219	3-Methoxy-flavone	43	NA	
14	21.3	143/199/255/ 298/101	Heptadecanoic acid, 9-methyl, methyl ester	34	57274-45-0	
15	21.5	149	Dihexylphthalat (D-HexP)	stand.	84-75-3	plasticiser

Die LC-MS/MS-Messung des Mineralwasserextraktes wird v.a. eingesetzt, um spezifische PET-Additive zu detektieren (methodische Details in Anhang A10). Die Standards der PET-Additive (Antioxidantien und UV-Filtersubstanzen) Hostavin VSU, Hostavin PR 25, Hostavin PR 31, Hostanox PAR 24 und Nyostab-SEED sind bei optimierten chromatographischen und massenspektrometrischen Bedingungen LC-MS/MS-gängig. Sie werden bei der über die SPE angereicherten Wasserprobe nicht oberhalb der Nachweisgrenze (~5 ng/L) detektiert. Das Screening mit der LC-MS/MS im Full-Scan-Modus führt hingegen zu Positivbefunden: Demnach ist davon auszugehen, dass eine Vielzahl von PET-Oligomeren in der aufkonzentrierten und angereicherten Probe enthalten ist. Abbildung 22 zeigt das Chromatogramm dieser Messung im TIC mit den Massenübergängen im Zeitfenster der PET-Oligomere.

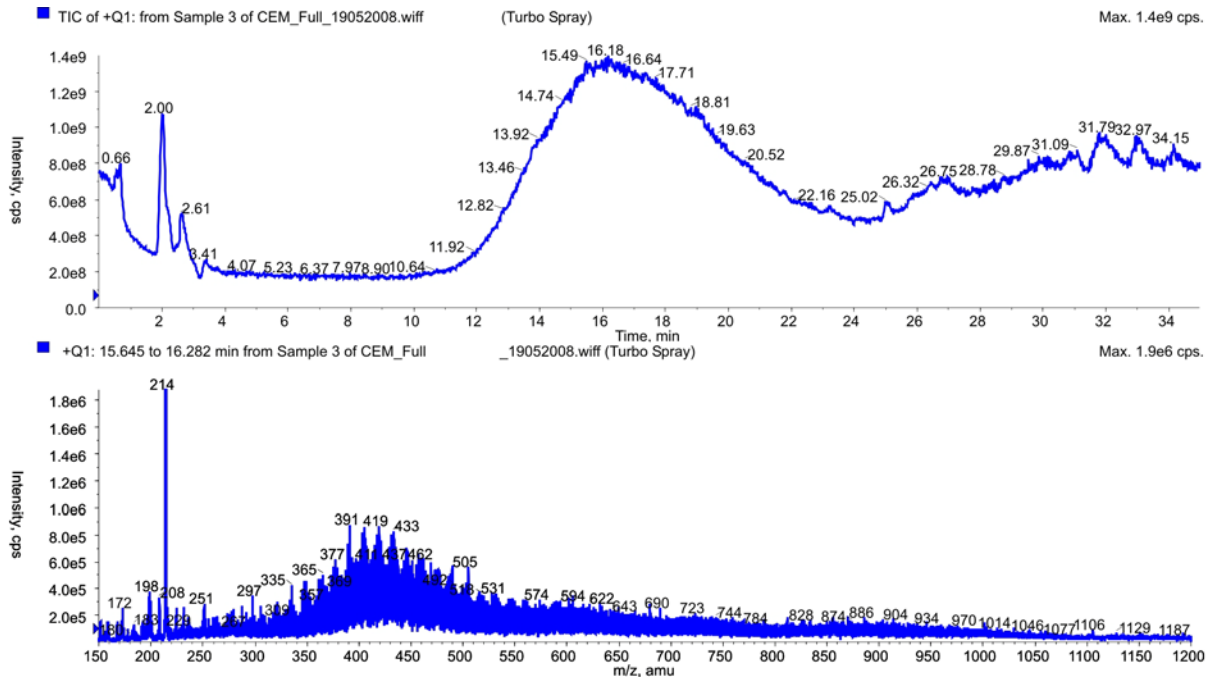


Abbildung 22: Chromatogramm (oben) und Massenspektrum (unten) der aufsummierten Massenübergänge im Elutionszeitraum von 15,3 bis 16,3 Minuten des LC-MS/MS-Screenings.

6.2 Zusammenfassung: Gezielte Analytik

Bei der analytischen Untersuchung von PET- und Mineralwasserextrakten auf spezifische Zielkomponenten konnten einige Substanzen identifiziert werden, welche bekanntermaßen endokrin aktiv sind. Die am häufigsten gefundenen Substanzen gehören zur Substanzklasse der ortho-Phthalsäureester (allgemein als Phthalate bezeichnet). Qualitativ können hier die Phthalate DEP, DIBP, DBP und DEHP in Extrakten von PET, sowie DMP, DIBP, DBP und D-HexP in Mineralwasser selbst nachgewiesen werden. Die Präsenz der Phthalate in PET-Extrakten zeigt, dass diese Substanzen aus dem Kunststoff stammen. Die entsprechenden Funde im Mineralwasser belegen, dass es zu einer Migration dieser Substanzen kommen kann. Dies widerspricht einerseits der Aussage der Kunststoffhersteller, dass Phthalate nicht in der Herstellung von PET verwendet werden (ENNEKING 2006; VASAMI 2010), steht andererseits aber in Einklang mit einer Reihe weiterer Studien: KIM *et al.* (1990) extrahierten verschiedene Phthalate aus PET, darunter auch das hier gefundene DEP, DBP und DEHP. BISCARDI *et al.* (2003) wiesen die Migration von DEHP in Mineralwasser nach; die Migration von DEHP aus PET-Verpackungen wurde von FARHOODI *et al.* (2008) bestätigt. CASAJUANA & LACORTE (2003) untersuchten ebenfalls Mineralwasser in PET-Flaschen und fanden nach zehnwöchiger Lagerung erhöhte Konzentrationen von DMP, DEP, DBP und DEHP. In einer neueren Studie verglichen MONTUORI *et al.* (2008) Mineralwasser aus Glas- und PET-Flaschen und fanden in der Summe zwölfmal höhere Konzentrationen von Phthalaten (DMP, DEP, DiBP, DBP und DEHP) im Wasser aus PET-Flaschen. Schließlich wiesen BOSNIR *et al.* (2007) die o.g. Phthalate in Getränken und Mineralwasser aus PET-Flaschen nach. Die Frage, ob reines PET tatsächlich die Quelle dieser Substanzen ist, bedarf weiterer wissenschaftlicher Bearbeitung. So stellt SAX (2010a; 2010b) die Hypothese auf, dass die Verwendung von recyceltem PET zur Kontamination mit Phthalaten führen kann. PET aus Verpackungen für Körperpflegeprodukte könnte die enthaltenen Phthalate absorbieren und schließlich als recycelter Bestandteil der Lebensmittelverpackung wieder freisetzen.

Neben den Phthalaten wird eine Reihe von Phenolen in PET-Extrakten und im Mineralwasser detektiert. Im Material selbst werden die östrogen aktiven Alkylphenole Nonylphenol (technische Mischung) und 4-tert-Octylphenol sowie die Antioxidantien para-tert-Butylphenol und 2,4-Di-tert-butylphenol detektiert. Im Mineralwasser werden eine Reihe

weiterer phenolischer Antioxidantien gefunden, u.a. butyliertes Hydroxytoluol (BHT, 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol) und verwandte Substanzen. Die Literaturdaten für Phenole in PET und PET-verpackten Produkten sind nicht so zahlreich wie für Phthalate. BHT wurde bereits von HIGUCHI *et al.* (2004) in Mineralwasser aus Glasflaschen nachgewiesen. Die Autoren schlussfolgern, dass die Substanz aus dem Deckelmaterial stammt. Nonylphenole werden in zwei Studien mit japanischen und chinesischen Mineralwässern (in PET bzw. Kunststoffflaschen verpackt) detektiert (TOYO'OKA & OSHIGE 2000; SHAO *et al.* 2005), allerdings ist es nicht möglich, Rückschlüsse über deren Herkunft zu ziehen. Der Einsatz von Tris(nonylphenyl)phosphite (TNPP) als Acetaldehydfänger in PET-Mineralwasserflaschen ist eine potentielle Quelle für die Kontamination mit Nonylphenol (MCNEAL *et al.* 2000; HOWE *et al.* 2001).

Des Weiteren können einige PET-Ausgangssubstanzen und -bestandteile nachgewiesen werden. Das erstmals in PET-Extrakten und Mineralwasser gefundene Dimethylterephthalat (DMT) ist ein Grundbestandteil bei der PET-Synthese. Unpolymerisierte Reste könnten somit aus der PET-Verpackung ins Produkt migrieren. Zu den endokrinen Eigenschaften von DMT sind derzeit keine Studien verfügbar, allerdings zeigen eigene Untersuchungen, dass DMT *in vitro* nicht östrogen aktiv ist (Kapitel 7). Die Präsenz großer Mengen von PET-Oligomeren im Mineralwasser deutet auf eine unvollständige Polymerisation oder eine Degradation des Verpackungsmaterials hin und ist (öko)toxikologisch schwer zu bewerten, da keine entsprechenden Studien verfügbar sind. Dass recyceltes PET Ethylterephthalat-Dimere und -Trimere enthalten kann, ist allerdings bekannt (BENTAYEB *et al.* 2007). Ebenfalls beschrieben ist die Migration verschiedener Oligomere aus PET in Olivenöl (LÓPEZ-CERVANTES *et al.* 2003).

Von den zahlreichen weiteren detektierten Kontaminanten sind insbesondere 9-Octadecenamide und Tributylphosphat (TBP) erwähnenswert, da diese bioaktiv sind. 9-Octadecenamide, ein Oleamid, das in industriellen Prozessen als Schmiermittel eingesetzt wird, wird von McDONALD *et al.* (2008) in diversen Labormaterialien aus Kunststoff nachgewiesen. Das Oleamid beeinträchtigte die Enzymaktivität in biochemischen Experimenten. Für das hier in PET gefundene TBP ist eine potente antiöstrogene Wirkung beschrieben (DI BENEDETTO 2009).

6.3 Fraktionierung östrogen aktiver Proben und Kombination mit GC-MS

Die sogenannte Bioassay- oder Effekt-geleitete Analytik (effect-directed analysis, EDA) wird verwendet, um Substanzen mit biologischer Aktivität (i.d.R. Schadstoffe) aus komplexen Umweltprobe zu isolieren und zu identifizieren (Review in REEMTSMA 2001; BRACK 2003; HECKER & HOLLERT 2009). Dabei wird ein gekoppeltes Verfahren aus Biotests, Probenaufbereitung/-separation und chemischer Analytik verwendet, um die biologisch aktive Zielkomponente anzureichern, zu isolieren und zu identifizieren. Abbildung 23 zeigt eine schematische Übersicht über die EDA.

Eine Reihe von Autoren setzen die EDA ein, um unbekannte östrogen aktive Komponenten aus Proben mit komplexer Zusammensetzung zu isolieren und identifizieren (DESBROW *et al.* 1998; SNYDER *et al.* 2001; THOMAS *et al.* 2001; TAKAMURA-ENYA *et al.* 2003; HEISTERKAMP *et al.* 2004; NAKADA *et al.* 2004). Schon DESBROW *et al.* (1998) setzen eine semipräparative HPLC-Technik ein, um Xenoöstrogene aus Kläranlagenabflüssen zu charakterisieren. Ein vergleichbarer Ansatz zur Fraktionierung wird im Projekt verwendet.

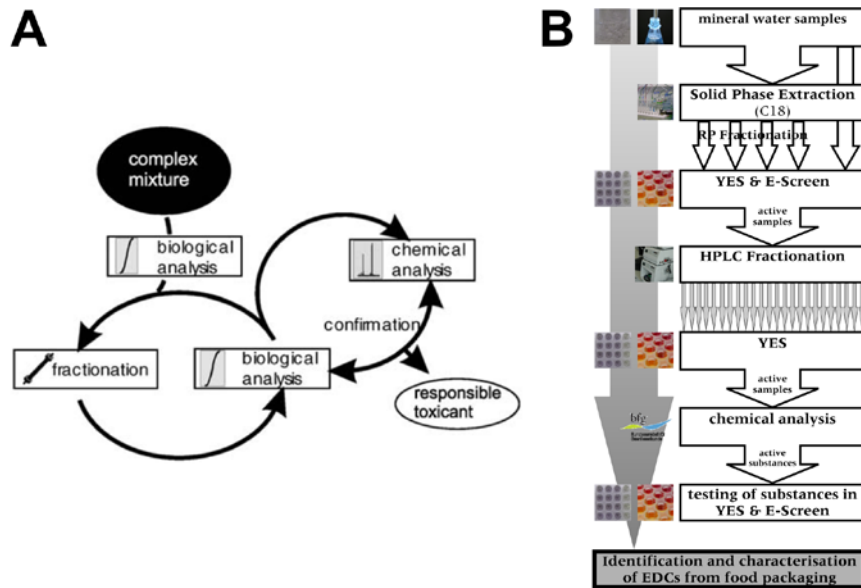


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Effekt-geleiteten Analytik (A, aus BRACK 2003) und Adaption für das vorliegende Projekt (B).

Zur Optimierung und Erprobung der EDA werden östrogen aktive SPE-Extrakte von Mineralwasserproben verwendet (methodische Details in Anhang A8). Zunächst werden die Separationstechniken optimiert: Mit Hilfe einer semipräparativen RP-HPLC werden östrogen aktive Extrakte mit verschiedenen Operationsparametern fraktioniert. Die gewonnenen Subproben werden erneut im YES untersucht. Die Ergebnisse des Vergleichs zweier Fraktionierungsmethoden ist in Abbildung 24 dargestellt.

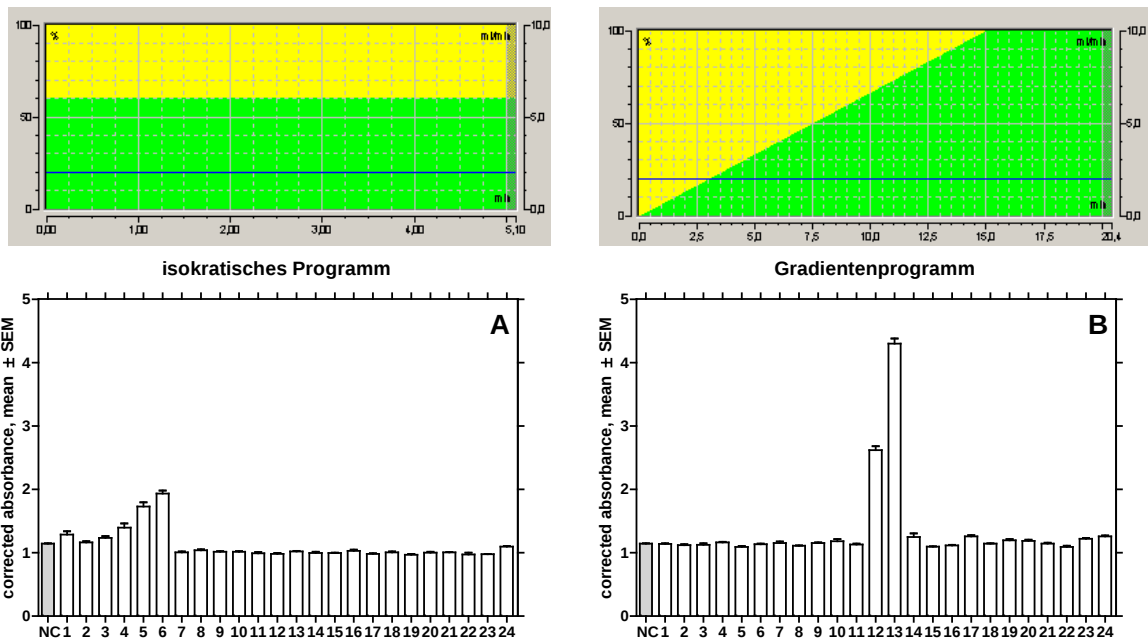


Abbildung 24: Vergleich zweier verschiedener HPLC-Programme zur Fraktionierung östrogen aktiver SPE-Extrakte am Beispiel einer Mineralwasserprobe. Östrogene Aktivität der minütlich abgenommenen Fraktionen im YES. NC: n = 48, Proben: n = 7-8.

Abbildung 25 zeigt beispielhaft die Ergebnisse der Kombination von Fraktionierung, YES und GC-MS am Beispiel einer östrogen aktiven Wasserprobe (methodische Details in Anhang A7 bis A9). Hierbei wurden die östrogen aktiven Fraktionen 1 und 9-14 analysiert, die nicht

aktive Fraktion 18 diente als Vergleich. Bereits aus der Untersuchung der fraktionierten Probe im Biotest lassen sich wichtige Informationen gewinnen (BRACK 2003). Im vorliegenden Fall weist das östrogene Profil des Mineralwasserextraktes auf die Präsenz von zwei östrogen aktiven Komponenten hin: In Fraktion 1 sind sehr polare Substanzen enthalten, während in den Fraktionen 9-14 eher unpolare Komponenten fraktioniert werden. Identische Fraktionierungsprofile wurden für 15 weitere Wasserproben aufgezeichnet. Insofern belegen die Fraktionierungsversuche, dass eine Mischung aus mindestens zwei östrogen aktiven Komponenten im Mineralwasser vorliegt.

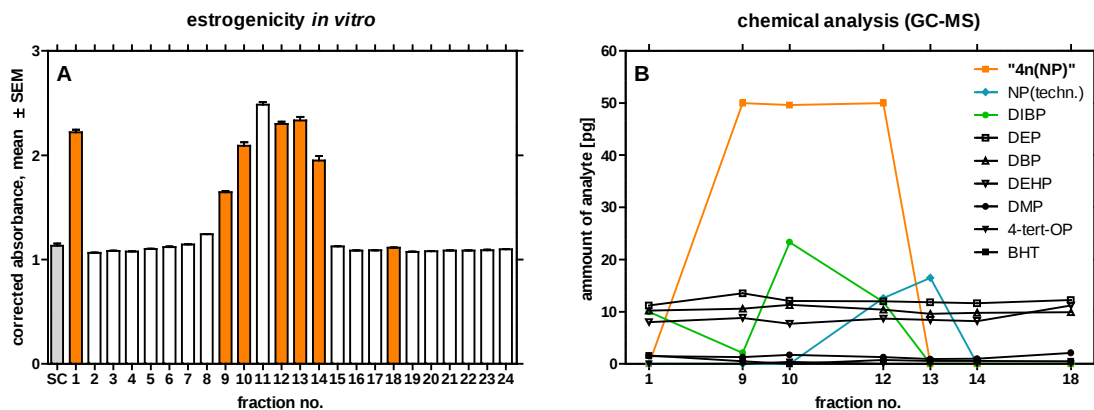


Abbildung 25: Östrogene Aktivität eines fraktionierten Mineralwasserextraktes (Marke C) im YES (A) und mittels GC-MS in der jeweiligen Fraktion gefundene Substanzen (B).

In einer gezielten Analytik mittels GC-MS werden die entsprechenden Fraktionen auf 23 bekannte Endokrine Disruptoren untersucht. Neben verschiedenen Phthalaten (DMP, DEP, DiBP, DBP, DMGP, DiHexP, DEHP, DPP, DHP, BBP, HEHP, DBEP, DCHP, DEHP, DNP und DOP) werden Phenole (4-tert-Octylphenol, technisches Nonylphenol, 4-n-Nonylphenol und Bisphenol A) und die Antioxidantien BHA und BHT untersucht. Die Phthalate DEHP, DEP, DBP und DMP sind in gleichbleibenden Mengen in allen Fraktionen zu finden, auch in der nicht östrogen aktiven Fraktion 18. Es ist also davon auszugehen, dass es sich um eine Hintergrundbelastung mit Weichmachern handelt, die beispielsweise aus den Lösemitteln und den verwendeten Labormaterialien etc. stammen kann. Gleiches gilt für das Antioxidans BHT und 4-tert-Octylphenol.

Erhöhte Konzentrationen des Phthalats DiBP in den östrogen aktiven Fraktionen 1, 10 und 12 und von technischem Nonylphenol (Fraktionen 12 und 13) deuten darauf hin, dass diese beiden Xenoöstrogene zumindest teilweise für die gemessene Hormonaktivität verantwortlich sein könnten. Technisches Nonylphenol kann als Verunreinigung im Organophosphat-Stabilisator TNPP vorliegen (K. Pfaff, BfR, pers. Mitteilung) und so zur Kontamination des Mineralwassers führen (HOWE *et al.* 2001). Bei der als 4-n-Nonylphenol eingestuft Substanz in den Fraktionen 9 und 12 handelt es sich um einen Artefakt aufgrund einer fehlerhaften Kalibrierung.

6.4 Zusammenfassung: gezielte Analytik und EDA

Wie oben gezeigt, lassen sich mit Hilfe der gezielten Analytik eine Reihe von Substanzen in PET-Material und Mineralwasser selbst nachweisen, die z.T. bekannte Endokrine Disruptoren sind (u.a. DEHP, Nonylphenol). Die Fraktionierung von Mineralwasserproben kann erfolgreich angewendet werden, um verschiedene östrogen aktive Komponenten der komplexen Mischung voneinander zu trennen. Bei der im Rahmen der EDA anschließenden zielgerichteten Analytik mittels GC-MS können wiederum östrogen aktive Komponenten (DiBP und Nonylphenol) nachgewiesen werden.

Auch wenn hier keine quantitativen Untersuchungen der Zielkomponenten durchgeführt werden, sind die in der EDA detektierten Mengen der Zielkomponenten (Picogramm-Bereich) viel zu gering, um die östrogene Antwort im YES zu erklären. Dieses Phänomen ist aus der sogenannten *mass-balance analysis* bekannt, bei der die gemessenen Konzentrationen der Zielsubstanzen in Umweltproben mit deren biologischer Aktivität verglichen werden. Auch wenn hierbei mathematische Modelle zur Integration der Mischungseffekte angewendet werden können (BRACK *et al.* 2008), bleibt ein großer Teil der Aktivität häufig unerklärt (z.B. HOLLERT *et al.* 2005). Die gezielte chemische Analytik hat zwar entscheidende Vorteile bei der Untersuchung von Umweltproben (Genauigkeit, Sensitivität und Replizierbarkeit), in Kombination mit Biotests wird jedoch ein entscheidender Nachteil deutlich: Nur die Substanzen, welche *a priori* als bioaktiv bekannt sind und deren Detektion methodisch möglich ist, werden erkannt.

Im vorliegenden Fall wird zwar ein breites Spektrum von Zielkomponenten untersucht (diverse Phthalate, Phenole, Kunststoffadditive und Organozinnverbindungen) und z.T. detektiert, allerdings erscheint es unwahrscheinlich, dass die Kombination der niedrigen Konzentrationen der detektierten östrogen wirksamen Komponenten die endokrine Gesamtaktivität der Proben erklärt. BOEHLER *et al.* (LAVES 2007) untersuchten die Mixtureffekte von Kombinationen der in Mineralwasser detektierten Phthalate und Pflanzenschutzmittel und stellten fest, dass eine repräsentative Mischung dieser Substanzen die *in vitro* gemessene östrogene Aktivität nicht erklärt. Die vorgestellten Ergebnisse belegen insofern, dass das hier untersuchte Mineralwasser zwar z.T. mit bekannten Endokrinen Disruptoren kontaminiert ist, dass aber zusätzliche unbekannte östrogen wirksamen Substanzen vorhanden sein müssen, welche mittels gezielter chemischer Analytik nicht nachweisbar sind.

6.5 Aufreinigung antiandrogen aktiver Proben und Kombination mit Orbitrap-MS

Aufgrund der Nachteile der gezielten chemischen Analytik bei der Identifikation unbekannter endokrin aktiver Komponenten (vgl. Abs. 6.4) wird im Projekt eine non-target Screening-Verfahren eingesetzt. Hierzu werden Mineralwasserextrakte herangezogen, die eine starke antiandrogene Aktivität aufweisen (Abs. 5.3). Die LC-MS-Methoden ist bestens geeignet, um polare, thermolabile Mikroschadstoffe in Umweltproben zu identifizieren, wobei die in den letzten Jahren entwickelten hochauflösenden MS-Technologien (HRMS) ein besonders leistungsfähiges Werkzeug darstellen (KRAUSS *et al.* 2010).

Im Projekt wird die Orbitrap-Technologie zur Identifizierung von antiandrogenen Substanzen in Mineralwasserproben eingesetzt. Gegenüber herkömmlichen LC-MS-Methoden hat die Orbitrap eine höhere Genauigkeit bei der Bestimmung der exakten Masse und eine höhere Auflösung. Die LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific) wird für die vorliegende Untersuchung im positiven Modus gekoppelt mit einem LC-System betrieben. Ziel der Untersuchung der Mineralwasserextrakte mit der Orbitrap-Technologie ist die Bestimmung der exakten Massen der in den Proben enthaltenen organischen Substanzen. Im darauffolgenden Schritt soll die Abundanz jeder gefundenen Masse mit den in den Biotests gewonnenen Daten (hier antiandrogene Aktivität) korreliert werden, um potentielle Substanzen zu identifizieren, welche für die Antiandrogenität verantwortlich sind. Im abschließenden Schritt soll die Struktur dieser Substanzen in MSⁿ-Studien aufgeklärt werden.

Die mit dem ENV+-Verfahren aufgereinigten 18 Mineralwasserproben werden zunächst im YAAS auf antiandrogene Aktivität überprüft (Abbildung 26 A, vgl. Abs. 5.3). Da in den verschiedenen Proben ein breites Spektrum an antiandrogener Potenz detektiert werden kann, sind diese besonders für die Korrelation mit chemischen Daten geeignet. Für die Untersuchung der Proben mittels Orbitrap werden diese mit Methanol verdünnt und über ein LC-System chromatographisch getrennt. Hierzu wird ein Gradientenprogramm verwendet, welches dem in Abs. 6.3 beschriebenen ähnelt. Die Proben werden anschließend direkt über

ESI ionisiert und in die Ionenfalle überführt. Die exakten Massen (m/z) der enthaltenen Ionen werden schließlich im eigentlichen Orbitrap (50-1000 Da mit einer Auflösung von 100000) gemessen.

Die Analyse der für die 18 Mineralwasserextrakte und den Blindwert (Leitungswasser) gewonnen MS-Daten erfolgt mit drei verschiedenen Verfahren. Bei der manuellen Auswertung werden die Massenspuren (100-2000 Da) stark aktiver Proben (13 und 18) mit denen des nicht aktiven Blindwertes verglichen. Massen, welche in den aktiven Proben, nicht aber im Blindwert enthalten sind, werden über deren Abundanz in Chromatogramm (SIC) in allen Proben quantifiziert. Die integrierten Peakflächen jeder Masse werden schließlich mit der antiandrogenen Aktivität korreliert. Die zwei zusätzlich verwendeten Strategien zur Datenanalyse basieren auf Softwarelösungen von Thermo Fisher Scientific. Die eigentlich für Proteomics-Anwendungen entwickelte Software SIEVE wird verwendet, um peaks von Massen zu extrahieren, welche in den verschiedenen Proben unterschiedlich exprimiert werden. Der chro-search-Algorithmus der Metabolomics-Software MetWorks wird eingesetzt, um die 500 größten peaks jeder Probe zu identifizieren. Die mit beiden Programmen extrahierten Daten werden ebenfalls mit der biologischen Aktivität korreliert.

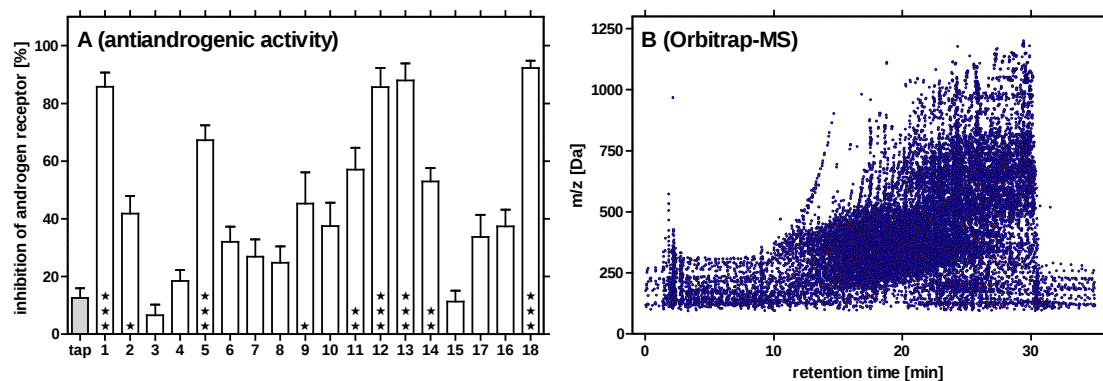


Abbildung 26: Antiandrogene Aktivität von SPE-Extrakten 18 verschiedener Mineralwässer im YAES (A) und Massen der in diesen Proben mittels Orbitrap detektierten Substanzen (B). A: Dargestellt ist die Inhibition des Androgenrezeptors, welche in drei Extrakten pro Probe in je drei Versuchen bestimmt wurde. Kruskal-Wallis mit Dunn's post-Test, signifikante Unterschiede gegenüber der Negativkontrolle (NC) ★★★ $p < 0,001$, ★★ $p < 0,01$, ★ $p < 0,05$. $n = 9$. B: Im Vergleich zum Blindwert unterschiedlich exprimierte Substanzen.

Die unterschiedlichen Auswertungsstrategien erbringen eine unterschiedliche Anzahl an zu korrelierenden Massen: Während bei der manuellen Strategie 204 verschiedene Massen quantifiziert werden, erbringen die Softwarelösungen 500 (MetWorks) bzw. 20.000 (SIEVE) unterschiedliche Massen. Die Anzahl an identifizierten Massen im Mineralwasserproben verdeutlicht einerseits die überragende analytische Leistung der Orbitrap-Technologie, zeigt aber auch die Vielzahl der organischen Substanzen, die in Mineralwasserproben detektiert werden können (Abbildung 26 B).

Durch die Korrelation dieser Datensätze mit der antiandrogenen Aktivität können verschiedene Kandidatenmassen identifiziert werden: Bei der manuellen Strategie korrelieren 64 Massen signifikant mit der biologischen Aktivität ($p < 0.05$, Pearson), bei den Software-basierten Verfahren sind es 24 (MetWorks) bzw. 63 (SIEVE). Diese Kandidaten werden nun einzeln in Scatterplots dargestellt und grafisch auf Plausibilität überprüft. So kann die Anzahl der ursprünglich über 150 signifikant korrelierten Kandidaten auf 60 eingengt werden. Bei der Überprüfung der Scatterplots zeigt ein Kandidat besonders gute Übereinstimmungen mit der biologischen Aktivität: eine Substanz mit einer exakten Masse von 363,1992 $[M+H^+]$ (Abbildung 27 A). Aus der exakten Masse kann eine theoretische Summenformel abgeleitet (Mass Frontier, Thermo Fisher Scientific) werden, welche in diesem Fall mit einer sehr geringen Abweichung $C_{13}H_{27}N_6O_6$ (δ ppm = 0,000028) ist. Diese theoretische Molekülzusammensetzung basiert allerdings auf der Beschränkung der

verfügbaren Elemente aus C, H, N und O. Aus der Isotopenverteilung des Mutterions kann geschlussfolgert werden, dass das Molekül weder Chlor noch Brom enthält. Es kann aber durchaus andere Elemente enthalten, so dass die theoretische Summenformel einer weiteren Überprüfung bedarf.

Der Abgleich der exakten Molekülmasse mit verschiedenen verfügbaren Datenbanken (u.a. PubChem, Reaxys) erbrachte keinen Treffer, so dass mit hoher Sicherheit davon ausgegangen werden kann, dass es sich um eine bisher nicht bekannte Substanz oder den Metaboliten einer bekannten Chemikalie handeln muss.

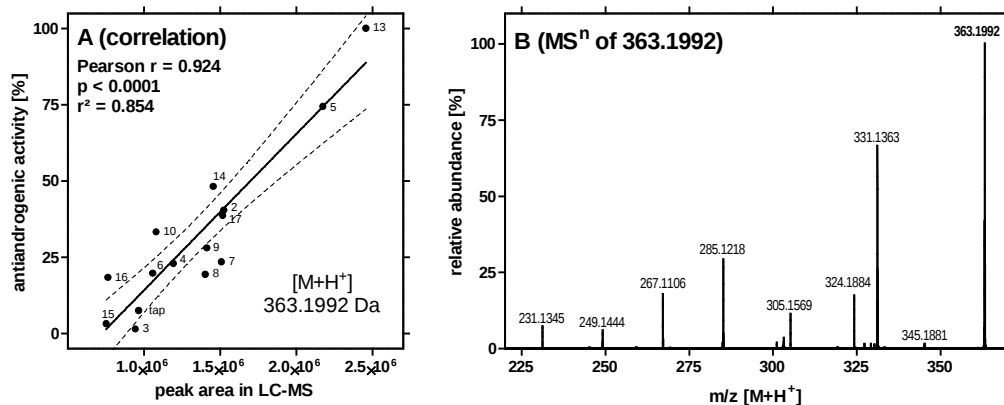


Abbildung 27: Korrelation der Abundanz der Substanz mit der Masse 363,1992 Da mit der antiandrogenen Aktivität in 18 verschiedenen Mineralwasserextrakten (A) und Massenspektrum dieser Substanz in einem MS⁵-Experiment. A: Dargestellt ist die lineare Regression (mit 95%-Konfidenzintervall), die Parameter der Korrelation sind in der Abbildung vermerkt. $n = 15$.

Da die Korrelation und Plausibilitätsprüfung für die Substanz mit der exakten Masse von 363,1992 Da als potentielles Antiandrogen in Mineralwasser sprechen, werden anschließend MSⁿ-Experimente zur Strukturaufklärung durchgeführt. Hierzu wird eine besonders stark aktive Probe (Probe 13) direkt in die Ionenfalle injiziert, das Zielion isoliert und in der Kollisionszelle fragmentiert (MS-MS). Die entstehenden Tochterionen werden wiederum isoliert und weiter fragmentiert (MSⁿ). Abbildung 27 B zeigt das integrierte Massenspektrum des Ions mit der Masse 363,1992 Da, welches in einem MS⁵-Experiment aufgezeichnet wurde. Deutlich zu erkennen ist der Verlust von Wasser in verschiedenen Fragmentierungsschritten (-18,0153 Da), etwa vom Mutterion zum Tochterion mit der Masse 345,1881. Dies deutet auf das Vorhandensein von Hydroxylgruppen im Molekül hin, welche wiederum für die Bindung an Steroidrezeptoren wichtig sind.

Da es sich bei der verwendeten Orbitrap-Methode um eine sehr neue Technologie handelt, die erst zum Projektende zur Verfügung stand, können die in den MSⁿ-Experimenten gewonnenen Daten zur Strukturanalyse nicht abschließend diskutiert werden und bedürfen einer weiteren Interpretation. Zudem ist es nicht unwahrscheinlich, dass das Massenspektrum der Zielkomponente mit der exakten Masse von 363,1992 Da nicht in den entsprechenden Datenbanken zu finden ist. Zur zweifelsfreien Identifikation des potentiellen Antiandrogens in Mineralwasser müssten weitere Studien durchgeführt werden. Hierzu müsste eine größere Menge der Substanz (Milligramm-Bereich) durch semipräparative HPLC-Techniken aufgereinigt und deren Struktur mittels NMR untersucht werden (KRAUSS *et al.* 2010).

6.6 Zusammenfassung: Orbitrap-MS und non-target Analytik

Die non-target Analytik mit endokrin aktiven Mineralwasserproben führt zur Charakterisierung einer ganzen Reihe von potentiell bioaktiven Komponenten. Von ursprünglich mehreren Tausend detektierten organischen Substanzen kann das Spektrum der Kandidatensubstanzen mittels Korrelationsanalysen und Plausibilitätsprüfung deutlich eingeeengt werden. Hierbei zeigt eine Substanz mit der exakten Masse von 363,1992 Da eine besonders auffällige Übereinstimmung mit der antiandrogenen Aktivität der Mineralwasserproben. Diese Komponente hat die theoretische Summenformel $C_{13}H_{27}N_6O_6$ und enthält weder Chlor noch Brom. Zusätzliche MS^n -Experimente zur Strukturaufklärung deuten darauf hin, dass das Molekül Hydroxylgruppen besitzt und somit die strukturellen Gegebenheiten für Bindung an Steroidrezeptoren erfüllt. Zur abschließenden Identifizierung dieser potentiell antiandrogenen Substanz im Mineralwasser sind weiterführende Studien (Aufreinigung und NMR) nötig.

Die verwendete Orbitrap-Technologie ist wegweisend für die Identifizierung von bioaktiven Substanzen, wie am Beispiel von antiandrogenen Mineralwasserproben gezeigt wird. Die Menge der gewonnenen Daten birgt über den hier präsentierten Ausschnitt hinaus ein großes Potential: So können z.B. allgemeine Kontaminanten in Mineralwasser charakterisiert werden (u.a. werden große Mengen von Polyethylenglykol identifiziert). Auch der Vergleich der chemischen Zusammensetzung von Glas- und PET-verpackten Proben ist möglich. Um derartige Analysen zu vereinfachen, sind allerdings geeignete chemieinformatische Hilfsmittel nötig, die derzeit noch nicht ausgereift sind.

Trotz des enormen Potentials wird die Orbitrap-Technologie derzeit kaum für die Analyse von Umweltproben eingesetzt. Besonders in Kombination mit Effektdaten aus Biotests ist diese für die Identifizierung bisher unbekannter Schadstoffe hervorragend geeignet. So lässt sich das breite Spektrum an detektierbaren Substanzen durch die Einbindung biologischer Daten schnell einengen, wie das Beispiel der verwendeten Korrelationsstrategie zeigt. Diese Analysestrategie ist gegenüber der Fraktionierungsmethode deutlich zeitsparender. Allerdings ist es mit dieser Auswertungsmethode nicht möglich, potentielle Mixtureffekte zu erkennen: Schon bei einer konstanten Kontamination mit einem endokrin wirksamen Stoff in Kombination mit unterschiedlichen Mengen einer zweiten aktiven Substanz wäre nur letztere erkennbar. In einem solchen Fall sind zusätzlich Fraktionierungsversuche mit parallelen Orbitrap-Messungen unabdingbar.

Gegenüber der hier ebenfalls verwendeten, gezielten chemischen Analytik (Abs. 6.1) bietet die non-target Analytik bei der Identifizierung von endokrin aktiven Substanzen in Umweltproben entscheidende Vorteile. Anstelle eines vordefinierten und somit beschränkten Analysespektrums sind *a priori* keine Informationen über die Zielkomponenten nötig, so dass sich auch unbekannte Substanzen identifizieren lassen. Im Fall der Mineralwasserproben ist davon auszugehen, dass eine komplexe Mischung von Substanzen vorliegt, von denen nur ein Bruchteil identifiziert ist. Insofern bildet die wirkbezogenen Analytik mit einer Kombination aus In-vitro-Assays und LC-HRMS die Methode der Wahl zur Charakterisierung und Identifizierung von bioaktiven Substanzen in Proben unbekannter Zusammensetzung. Dies gilt insbesondere für die Charakterisierung von endokrin aktiven Substanzen in Kunststoffen, da zu den Additiven und Inhaltsstoffen selbst, sowie zu deren endokriner Aktivität, nur wenige Literaturdaten vorliegen.

7 Charakterisierung ausgewählter Kunststoffinhaltsstoffe

Im Laufe des Projektes wird eine Reihe von Substanzen auf endokrine Aktivität untersucht, bei denen es sich entweder um Kunststoffadditive oder Ausgangsprodukte bei der Kunststoffherstellung handelt. Hierzu gehören diverse Phthalate, die als Weichmacher in verschiedenen Kunststofftypen eingesetzt werden und z.T. in PET-Material und Mineralwasser nachgewiesen werden konnten (Abs. 6.1). Das Adipat DEHA wird ebenfalls als Weichmacher in Kunststoffen verwendet und ersetzt dabei behördlich regulierte Phthalate (DALGAARD *et al.* 2003; JARFELT *et al.* 2005). Die butylierten Formen von Hydroxyanisol und -toluen dienen als Antioxidantien in Kunststoffen und sind unter der Bezeichnung E320 und E321 auch als Lebensmittelzusatzstoffe zugelassen (TAWFIK & HUYGHEBAERT 1999; DOPICO-GARCIA *et al.* 2007). Zu all diesen Substanzen liegen Literaturdaten vor, welche auf ein gewisses endokrines Potential hindeuten (Review in MUNCKE 2009).

Im Gegensatz dazu ist das endokrine Potential der Kunststoffadditive Irgafos, Irganox, Hostavin, Hostanox und Nylostab bisher nicht untersucht. Die zumeist auf Organophosphatstrukturen basierenden Substanzen werden als Stabilisatoren und UV-Filter in Kunststoffen eingesetzt und werden hier erstmals hinsichtlich ihrer endokrinen Eigenschaften charakterisiert. Terephthalsäure und Dimethylterephthalat sind die Ausgangsprodukte bei der PET-Synthese und werden z.T. auch in PET-Extrakten nachgewiesen (Abs. 6.1.1). Auch das östrogene Potential dieser Substanzen ist bisher nicht untersucht. Als Katalysator ist Antimon ebenfalls Bestandteil der PET-Synthese. Das Auslaugen von Antimon aus dem Kunststoff ist gut beschrieben (SHOTYK *et al.* 2006; HALDIMANN *et al.* 2007; SHOTYK & KRACHLER 2007; WESTERHOFF *et al.* 2008), außerdem gibt es Hinweise auf östrogene Aktivität (CHOE *et al.* 2003).

Die Ergebnisse der Substanzuntersuchungen in E-Screen, YES und YAS sowie z.T. im YAES sind in Tabelle 9 dargestellt. Es zeigt sich, dass das Phthalat BBP in YES und E-Screen östrogene Aktivität besitzt. Mit einer relativen Potenz von ca. 90000 bzw. 1.300000 und einer maximalen Antwort von 40 bzw. 85% ist BBP als schwach östrogen im Vergleich zur Referenzsubstanz 17 β -Östradiol einzustufen. Gleiches gilt für DBP und DEP, welche im E-Screen ebenfalls über eine Millionen mal schwächer aktiv sind als der natürliche Ligand des Östrogenrezeptors. Ebenso wie die schwache Östrogenität der positiv getesteten Phthalate ist auch die von BHA gut beschrieben (JOBLING *et al.* 1995). Die proliferationsstimulierende Wirkung des Adipats DEHA im E-Screen war bisher nicht bekannt. Die beobachteten Effekte können auf eine gewisse östrogene Potenz dieser Substanz zurückzuführen sein, treten allerdings erst bei hohen Konzentrationen (ab 10 μ M) auf. Ähnliche Effekte können für den UV-Stabilisator Hostavin PR-31 im E-Screen beschrieben werden. Hier wird eine proliferationsfördernde Wirkung ab einer Konzentration von 100 nM beobachtet. Alle weiteren untersuchten Kunststoffadditive und -ausgangsprodukte sind in den durchgeführten Biotests inaktiv. Dies bedeutet, dass diese Substanzen nicht für die in Kunststoffextrakten und Mineralwasserproben detektierte östrogene Aktivität verantwortlich sein können.

Auch Mischungseffekte durch eine Kombination der als östrogen aktiv klassifizierten Chemikalien (Tabelle 9) sind unwahrscheinlich. Zwar können verschiedene östrogen aktive Substanzen in den gleichen Proben nachgewiesen werden (z.B. DBP und DEP, Abs. 6.4), allerdings reicht deren insgesamt schwache Aktivität am Östrogenrezeptor wahrscheinlich nicht aus, um im YES detektierbare Effekte zu entwickeln. Anders verhält es sich im E-Screen: Hier weisen einige Phthalate trotz hoher relativer Potenzen EC₅₀-Werte im nanomolaren Bereich auf. Dies könnte bedeuten, dass Kombinationen dieser Weichmacher auch in deutlich geringeren Konzentrationen signifikante Effekte im E-Screen bewirken könnten (SILVA *et al.* 2002). Um dieser Hypothese nachzugehen, bedarf es einer quantitativen Analyse der entsprechenden Phthalate in verschiedenen Proben. Die gefundenen Konzentrationen könnten dann im additiven Modell mit den biologischen

Effektdaten kombiniert werden, um Vorhersagen über die entsprechenden Mixtureffekte zu machen (KORTENKAMP & ALTENBURGER 1999). Da zu vielen der hier detektierten Komponenten jedoch keine biologischen Wirkdaten verfügbar sind, hätte die Modellierung der Mixtureffekte nur eine begrenzte Aussagekraft.

Insofern verdeutlichen die vorliegenden Substanzdaten v.a. die Wissenslücken, die bei der Untersuchung der endokrinen Eigenschaften von Kunststoffen bestehen: Auf der analytischen Seite ist nur ein beschränktes Spektrum von Substanzen nachgewiesen, auf der biologischen Seite existieren Wirkdaten ausschließlich für diese wenigen, gut detektierbaren Komponenten. Die vorgelegten Daten deuten darauf hin, dass eine ganze Reihe bisher nicht beschriebener endokrin aktiver Substanzen in Kunststoffen zu finden ist. Diese können nur durch die Kombination einer leistungsfähigen non-target Analytik mit biologischen Testverfahren identifiziert und weiter charakterisiert werden.

Tabelle 9: Übersicht über die im Projekt auf endokrine Aktivität untersuchten Substanzen.

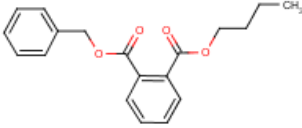
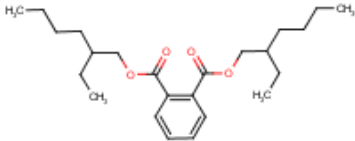
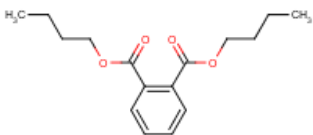
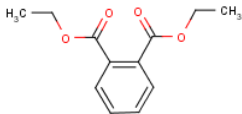
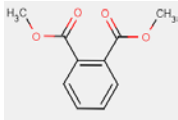
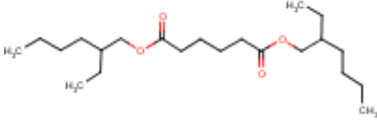
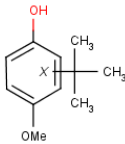
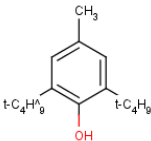
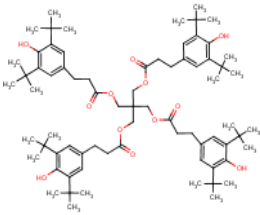
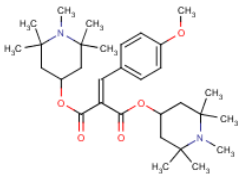
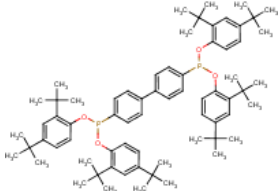
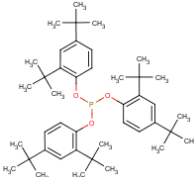
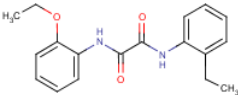
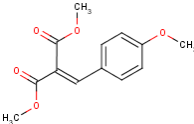
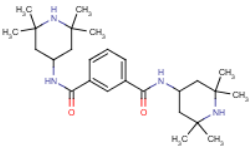
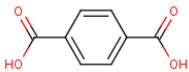
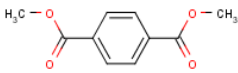
substance (CAS)	structure	assay (concentration)	effects
Butyl benzyl phthalate, BBP (85-68-7)		YES (1 μ M – 0,25 mM) YAS (1 μ M – 0,25 mM) E-Screen (1 pM – 1 mM)	EC ₅₀ 1,1x10 ⁻⁵ M RP 88000 max. resp. ~40% inactive EC ₅₀ 5x10 ⁻⁷ M RP 1.300000 max. resp. ~85%
Bis(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP (117-81-7)		YES (1 pM – 1 mM) YAS (1 pM – 1 mM) E-Screen (1 pM – 1 mM)	inactive inactive inconclusive
Dibutyl phthalate, DBP (84-74-2)		YES (1 μ M – 0,25 mM) YAS (1 μ M – 0,25 mM) E-Screen (1 pM – 1 mM)	inactive inconclusive EC ₅₀ 8,3x10 ⁻⁷ M RP 2.19000 max. resp. ~65%
Diethyl Phthalate, DEP (84-66-2)		YES (1 pM – 1 mM) YAS (1 pM – 1 mM) E-Screen (1 pM – 1 mM)	inactive inactive EC ₅₀ 5,2x10 ⁻⁶ M RP 13.500000 max. resp. ~45%
Dimethyl phthalate, DMP (131-11-3)		YES (1 pM – 1 mM) YAS (1 pM – 1 mM) E-Screen (1 pM – 1 mM)	inactive inactive inactive
Bis(2-ethylhexyl) adipate, DEHA (103-23-1)		YAS (1 pM – 1 mM) YES (1 pM – 1 mM) E-Screen (1 pM – 1 mM)	inactive inactive active at >10 μ M
Butylated hydroxyanisole, BHA (25013-16-5)		YES (0,1 mM – 0,1 M) YAS (0,1 mM – 0,1 M)	EC ₅₀ 8,38x10 ⁻⁵ M RP 8.100000 max. resp. ~50% inactive
Butylated hydroxytoluene, BHT (128-37-0)		YES (0,1 mM – 0,1 M) YAS (0,1 mM – 0,1 M)	inactive inactive

Tabelle 9: Fortsetzung.

substance (CAS)	structure	assay (concentration)	effects
Irganox 1010, Hostanox O 10 (6683-19-8)		YES (33 pM – 1 µM) YAES (33 pM – 1 µM) E-Screen (33 pM – 1 µM)	inactive inactive inactive
Hostavin PR-31 (147783-69-5)		YES (33 pM – 1 µM) YAES (33 pM – 1 µM) E-Screen (33 pM – 1 µM)	inactive inactive active at 0,1 and 0,3 µM
Hostanox P-EPQ (38613-77-3)		YES (33 pM – 1 µM) YAES (33 pM – 1 µM) E-Screen (33 pM – 1 µM)	inactive inactive inactive
Irgafos 168, Hostanox 24 (31570-04-4)		YES (33 pM – 1 µM) YAES (33 pM – 1 µM) E-Screen (33 pM – 1 µM)	inactive inactive inactive
Sanduvor VSU, Hostavin VSU (23949-66-8)		YES (0,3 nM – 10 µM) YAS (0,3 nM – 10 µM) E-Screen (0,3 nM – 10 µM)	inactive inactive inactive
Hostavin PR-25, Cyasorb UV 1988 (7443-25-6)		YES (0,3 nM – 10 µM) YAS (0,3 nM – 10 µM) E-Screen (0,3 nM – 10 µM)	inactive inactive inactive
Nylostab S-EED (42774-15-2)		YES (0,3 nM – 10 µM) YAS (0,3 nM – 10 µM) E-Screen (0,3 nM – 10 µM)	inactive inactive inactive
Terephthalic acid (100-21-0)		YES (0,3 nM – 10 µM) E-Screen (0,3 nM – 10 µM)	inactive inactive
Dimethyl terephthalate (120-61-6)		YES (0,3 nM – 10 µM) E-Screen (0,3 nM – 10 µM)	inactive inactive
Antimony trioxide (1309-64-4)	O ₃ Sb ₃	YES (1 mg/L)	inactive
Antimony trichloride (10025-91-9)	Cl ₃ Sb	YES (1 ng/L – 10 mg/L) E-Screen (1 ng/L-10 mg/L)	inactive inactive

8 Kunststoff als Quelle Endokriner Disruptoren: Relevanz für Mensch und Umwelt

Obwohl die Exposition gegenüber endokrin aktiven Substanzen und deren Effekte vor allem im humanen Kontext große (wissenschaftliche) Aufmerksamkeit erhalten, sind die Expositionspfade und -quellen gegenüber Mensch und Umwelt derzeit immer noch ungenügend charakterisiert (SHARPE 2003). So ist beim Menschen beispielsweise die interne Exposition mit Phthalaten oder Bisphenol A gut untersucht (KOCH & CALAFAT 2009), während die Quellen dieser Exposition vielfach ungeklärt sind. Die Nahrungsaufnahme gilt bisher als Hauptquelle der humanen Exposition mit Bisphenol A. STAHLHUT *et al.* (2009) untersuchten Bisphenol A in menschlichem Urin und konnten zeigen, dass die Konzentration von Bisphenol A durch Fasten kaum verringert wird. Die Autoren schlussfolgern, dass es neben der Nahrung andere relevante Quellen für die Exposition (evtl. Trinkwasser aus PVC-Rohren oder Thermopapier) geben muss. Obwohl diese Substanzen hauptsächlich in Kunststoffen eingesetzt werden und Kunststoff somit als Ursprung der Exposition naheliegend ist, wurden Kunststoffe bisher, trotz ihrer ubiquitären Verwendung (Abs. 1.1) und der umfangreichen Biomonitoringdaten zu einzelnen Substanzen, als Quelle von Xenobiotika kaum diskutiert und gelangen erst in letzter Zeit in den wissenschaftlichen Fokus (MUNCKE 2009).

Für Kunststoff als Quelle von endokrin wirksamen Chemikalien können drei prinzipielle Expositionspfade postuliert werden, die in Abbildung 28 schematisch dargestellt sind. Über den Kontakt von Kunststoff mit diversen Umweltmedien (Wasser, Luft und Boden) können Inhaltsstoffe in die Umwelt freigesetzt werden, welche über Inhalation, direkten Kontakt mit der Körperoberfläche oder Nahrungsaufnahme zur internen Exposition von Biota mit diesen Substanzen führen können. Dieser Pfad ist für Mensch und Umwelt gleichermaßen bedeutsam, während der zweite Pfad, die Kontamination von Nahrungsmitteln durch den Kontakt mit Kunststoffen, nur für den Menschen relevant ist. Der dritte, bisher kaum untersuchte, Expositionspfad ist der direkte Eintrag von Kunststoffen in die Umwelt (vgl. Abs. 1.1), bei dem es durch die Aufnahme von Kunststofffragmenten wiederum zu einer internen Exposition von Biota mit den Bestandteilen des Kunststoffes kommen kann.

Dass Kunststoffe eine ganze Reihe endokrin aktiver Substanzen enthalten, wird nicht nur am Beispiel der Phthalate und von Bisphenol A deutlich. MUNCKE (2009) stellte kürzlich eine Liste von 50 bekannten oder potentiellen Endokrinen Disruptoren zusammen, die für die Verwendung in Lebensmittelverpackungen in der EU und den USA zugelassen sind. Neben den bereits diskutierten Phthalaten enthält diese Liste diverse Phenole und Bisphenole, Benzophenone, Organozinnverbindungen und Kunststoffoligomere. Die Autorin argumentiert, dass neben diesen bekannten Substanzen eine Reihe weiterer, bisher nicht identifizierter Kontaminanten in Kunststoffmaterialien vorliegen können, darunter vermutlich auch Endokrine Disruptoren (MUNCKE 2009). Ausgehend von diesen Befunden zu Lebensmittelverpackungen, die einer vergleichsweise strikten Regulation unterliegen, kann es als wahrscheinlich angesehen werden, dass Kunststoffe für andere Anwendungen (z.B. Verrohrung, Baustoffe, Materialien für die Landwirtschaft/Aquakultur etc.) ebenfalls Substanzen enthalten, welche als endokrin aktiv klassifiziert werden. Eines der wenigen gut untersuchten Beispiele für endokrin aktive Substanzen in Nicht-Bedarfsgegenständen ist die Freisetzung von DEHP aus PVC-Boden- und Wandbelägen (u.a. BORNEHAG *et al.* 2005) und medizinischen Produkten (u.a. LATINI 2005; SCHETTLER 2006). Auch hier wird deutlich, dass das Monitoring endokrin aktiver Substanzen in Kunststoffprodukten bisher auf wenige, ausgewählte Komponenten beschränkt ist.

Bei der Analyse von Daten zu Kläranlageabflüssen und Sickerwasser aus Mülldeponien kommen TEUTEN *et al.* (2009) zu dem Ergebnis, dass Chemikalien aus Kunststoffen eine signifikante Quelle für Endokrine Disruptoren in der Umwelt sind. So werden beispielsweise hohe Konzentrationen von Bisphenol A und Alkylphenolen im Sickerwässern von Mülldeponien in verschiedenen asiatischen Ländern gefunden, die signifikant zur Kontamination der angrenzenden aquatischen Ökosysteme beitragen. Trotz der in den

industrialisierten Ländern gängigen Behandlung von Deponieabflüssen können laut TEUTEN *et al.* (2009) immer noch Konzentrationen von Bisphenol A gefunden werden, die über dem NOEC für limnische Organismen liegen.

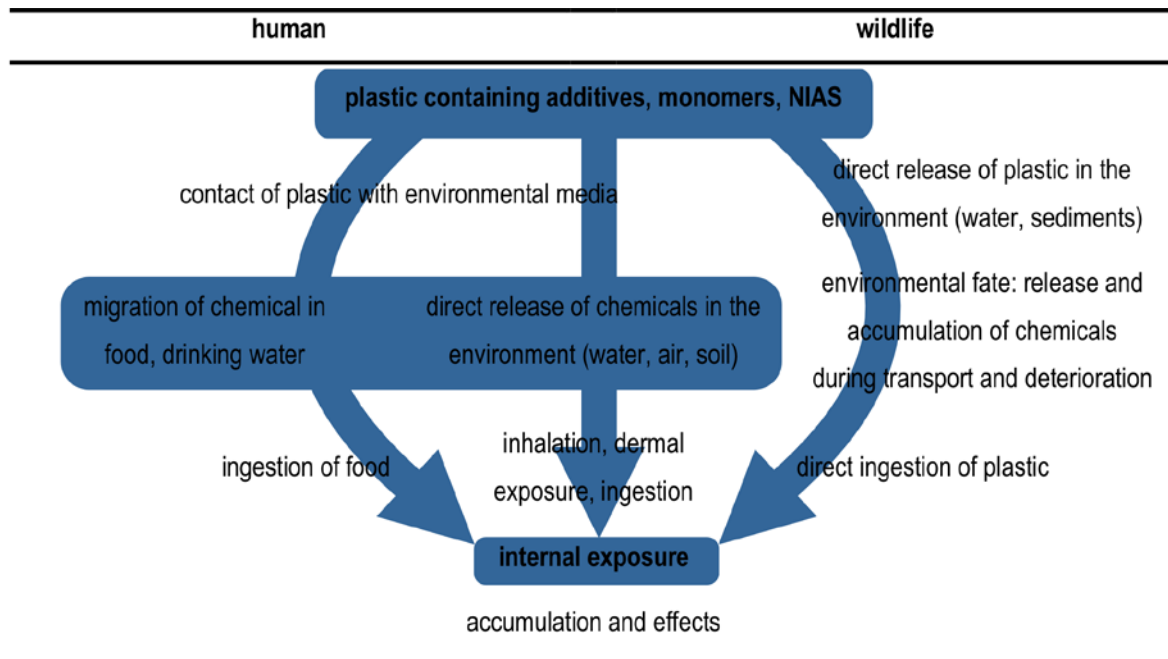


Abbildung 28: Potentielle Expositionspfade von Kunststoff-assoziierten Chemikalien. Die blau hinterlegten Aspekte werden im Projekt behandelt.

In den im Projekt mit Kunststoff-Rohmaterialien und -Verpackungen durchgeführten Migrationsversuchen kann im Maximum eine Freisetzung von ca. 25 ng EEQ/L aus einer einzelnen Verpackungseinheit oder ca. 280 ng EEQ/L aus 10 g Kunststoffgranulat über 10 Tage gemessen werden. Alle hier untersuchten Kunststoffmaterialien setzen östrogene Aktivität frei; aus einem noch größeren Anteil laugen Antiöstrogene aus (Abs. 4.5). Bei der modellhaften Untersuchung von Mineralwasser wird im Maximum eine Migration von ca. 2500 ng EEQ/L über 40 Tage nachgewiesen. Diese Daten sprechen für die Migration relevanter Mengen endokrin aktiver Chemikalien aus Kunststoffen ins verpackten Lebensmittel und letztendlich die Aufnahme dieser Substanzen durch den Menschen. Als gleichermaßen relevant kann dieses Migrationsszenario für die aquatische Umwelt angesehen werden, da das als Surrogat verwendete Wasser nicht nur wässrige Lebensmittel, sondern auch die aquatische Umwelt simulieren kann. Bei einer Freisetzung von ca. 28 ng EEQ/L pro Tag aus Kunststoffgranulaten in Wasser könnten Kunststoffe als ein wesentlicher Expositionspfad für Endokrin Disruptoren in der Umwelt betrachtet werden.

Die im Projekt vorgelegten Daten können also für die Charakterisierung des endokrinen Potentials von Kunststoffen selbst (Extraktionsstudien) und die Freisetzung dieser unter realistischen Bedingungen (Migrationsstudien) verwendet werden. Letztendlich kann die gemessene endokrine Aktivität als integrierter Marker auch für die Expositionsabschätzung verwendet werden. Die Expositionsabschätzung erfolgt im Rahmen der Risikobewertung traditionell anhand der Betrachtung von Einzelsubstanzen. Bei der Bewertung von Dioxinen und dioxinähnlichen Komponenten gibt es allerdings Ansätze, sogenannte *total toxic equivalents* als integriertes Maß für die Exposition einzusetzen (LARSEN 2006; VAN DEN BERG *et al.* 2006). Prinzipiell ist es ebenso möglich, Expositionsszenarien mit der in Lebensmitteln oder Kunststoffen gemessenen östrogenen Aktivität zu berechnen. Die Quantifizierung der In-vitro-Daten als EEQ dient hierbei als integrierter Expositionsmarker, aus dem sich tägliche Aufnahmeraten (total daily intake, TDI) aller östrogen aktiver Substanzen ableiten lassen.

Ein Beispiel für die Anwendung dieses Konzeptes legt SAFE (2000) vor, der basierend auf In-vitro-Daten zu Rotwein, Kraut und Bohnen zu dem Schluss kommt, dass die tägliche Aufnahme von östrogenen Aktivität durch den Menschen mehrere Mikrogramm EEQ beträgt. Auf Basis dieser Daten argumentiert der Autor, dass die Östrogenität von Phytoöstrogenen in Lebensmitteln die von Xenobiotika bei weitem überschreitet. Aktuellere und umfassendere Daten werden von BEHR (2009) vorgelegt, der 15 verschiedene Lebensmittel des alltäglichen Bedarfs (Brot, Fleisch, Fisch, Käse etc.) und Babynahrung mit den hier beschriebenen In-vitro-Assays untersucht. In einer Expositionsanalyse werden diese Daten mit der durchschnittlichen Nahrungsaufnahme (deutsche Nationalen Verzehrsstudie II, 2008) abgeglichen. Der Autor berechnet eine mittlere tägliche Aufnahme von ca. 30 ng EEQ für Erwachsene und 0,8 ng EEQ für Kleinkinder, die mit Fertignahrung ernährt werden. Wird die Babynahrung in Kunststoffflaschen aus PC zubereitet, macht der Anteil der aus Migration von Bisphenol A resultierenden östrogenen Aktivität ca. 14% der täglichen Aufnahme aus (BEHR 2009). Dieses Beispiel macht deutlich, dass Kunststoffe eine durchaus relevante Expositionsquelle für endokrine Aktivität, insbesondere für sensitive Populationen wie Kleinkinder, sind. Die beobachtete Freisetzung östrogenen Aktivität durch Lebensmittelverpackungen bestätigt diese Annahme: Aus einzelnen Verpackungseinheiten werden z.T. zwischen 5 und 15 ng EEQ/L freigesetzt (Abs. 4.1). Diese endokrine Aktivität würde somit 15-50% der von BEHR (2009) berechneten täglichen Aufnahme bei Erwachsenen ausmachen.

Die Ableitung von Expositionsszenarien für Biota ist ungleich komplexer, da in der Umwelt zahlreiche diffuse Eintragsquellen für endokrin aktive Substanzen existieren, die z.T. ungenügend charakterisiert sind. Für aquatische Organismen sind Kläranlagen der Haupteintragspfad für Xenobiotika, wobei natürliche und synthetische Steroide als wichtigste östrogen aktive Substanzen für aquatische Wirbeltiere gelten (JOBLING *et al.* 2006). Für das aquatische Ökosystem modellieren JOBLING *et al.* (2006) eine maximale Exposition mit Steroiden von ca. 15 ng/L (E1, E2 und EE2) und finden, dass diese Östrogenkonzentrationen mit dem Auftreten und der Stärke von Intersex in britischen Fischen korreliert sind. Im Vergleich mit den steroidal Östrogenen könnten Kunststoffe mit einer maximalen Migration von ca. 28 ng EEQ/L pro Tag einen relevanten und bisher unterschätzten Beitrag zur Exposition aquatischer Biota leisten.

Während die Effekte einiger kunststoffassoziierter Endokriner Disruptoren (insb. Phthalate und Bisphenol A) für Mensch und Umwelt gut charakterisiert sind (MEEKER *et al.* 2009; OEHLMANN *et al.* 2009; TALSNESS *et al.* 2009), sind die im vorliegenden Projekt erhobenen biologischen Daten nicht geeignet, um Voraussagen über potentielle Effekte zu machen. Dies hat zweierlei Gründe: Zum einen können zwar eine Reihe bekannter endokrin aktiver Substanzen in diversen Matrices (Kunststoffe, Lebensmittel) nachgewiesen werden. Diese erklären aller Wahrscheinlichkeit nach aber nicht die detektierten endokrinen Aktivitäten. Am Beispiel von Mineralwasser kann so z.B. gezeigt werden, dass ein potentes, bisher unbekanntes Antiandrogen vorhanden ist. Die durchgeführten Versuche zur Effekt-geleiteten Analytik und zum non-target Screening stellen geeignete Hilfsmittel für die Identifizierung bisher nicht beschriebener Endokriner Disruptoren in komplexen Umweltproben dar. Für eine (öko)toxikologische Bewertung der dokumentierten endokrinen Aktivitäten ist die zweifelsfreie Identifikation der entsprechend aktiven Substanzen jedoch unabdingbar. Zum anderen kann gezeigt werden, dass in den meisten untersuchten Fällen komplexe Mischungen verschiedener endokrin aktiver Komponenten vorhanden sind, die z.T. Rezeptoragonisten und -antagonisten beinhalten. Eine zuverlässige Voraussage der potentiellen Effekte derartiger Mischungen *in vivo* ist aufgrund der bisher begrenzten Datenlage nicht möglich.

Die im Projekte erhobenen Daten belegen, dass diverse Kunststofftypen und -produkte endokrin aktive Komponenten enthalten und freisetzen. In Expositionsszenarien kann darüber hinaus gezeigt werden, dass Kunststoffe eine relevante Quelle für Endokrine Disruptoren in der Umwelt sein können.

9 Kunststoff und wirkbezogenen Analytik: Perspektiven für Forschung und Regulation

Hinsichtlich der Charakterisierung von Kunststoffen als Expositionsquelle endokrin aktiver Substanzen wurden im Projekt umfangreiche Daten zur Freisetzung endokriner Aktivität aus diversen Materialien erhoben. Sowohl die Erforschung von Kunststoffen als Quelle von Umweltchemikalien als auch die Etablierung der im Projekt entwickelten Methodik (Bioassays zur integrierten Betrachtung des endokrinen Potentials) steht erst am Anfang, gelangt derzeit aber verstärkt in den wissenschaftlichen Fokus. Insofern ergeben sich aus den bearbeiteten Aspekten eine ganze Reihe methodischer Implikationen und neuer Forschungsperspektiven, die im Folgenden kurz skizziert werden.

9.1 Endokrine Aktivität von Umweltproben: Methodische Überlegungen

Die Untersuchung der endokrinen Aktivität von Umweltproben mit Hilfe von In-vitro-Assays ist gängige Praxis, insbesondere bei der Betrachtung des östrogenen Potentials in limnischen Ökosystemen. Dennoch sind nur wenige systematisch Arbeiten zur Optimierung und Anpassung der entsprechenden Methoden verfügbar. Die im Projekt erhobenen Daten zeigen ein erhebliches Optimierungspotential bei der Probenaufbereitung (Abs. 3.7). Am Beispiel von Mineralwasser konnte gezeigt werden, dass die Auswahl des Extraktionsverfahrens entscheidend für die Erhebung valider Daten zum endokrinen Potential ist. Extraktionsmethoden, die als Goldstandard bei der chemischen Analytik gelten, sind zur Aufreinigung unbekannter endokrin aktiver Substanzen teils ungeeignet (Abs. 5.3). Für die Untersuchung der endokrinen Aktivität müssen demnach eigene Extraktionsverfahren entwickelt und optimiert werden. Hier, wie auch bei der Optimierung der Probenapplikation in den Biotests (Abs. 3.7), besteht erheblicher Forschungsbedarf.

Die vorgelegten Daten machen darüber hinaus deutlich, dass Kunststoffproben im engeren und Umweltproben im weiteren Sinne oft ein breites Spektrum an endokrin wirksamen Substanzen enthalten können. Die detektierbaren Wirkungen beschränken sich dabei nicht nur auf agonistische Aktivität am Östrogenrezeptor. Endokrine Aktivität ist auch an weiteren Hormonrezeptoren (AR, RXR, VDR) zu detektieren (Abs. 4.6 und 5.3). Zudem kann gezeigt werden, dass Rezeptorantagonisten teilweise eine ebenso große Rolle spielen können wie die primär untersuchten Agonisten. Bisher kaum untersuchte endokrine Systeme und potentielle Antagonisten sollten deshalb in das Screening von Umweltproben integriert werden, um ein vollständigeres Bild von der Belastung mit endokrin aktiven Substanzen zu erhalten. Da die verschiedenen endokrinen Systeme im Organismus eng miteinander interagieren, könnten derartige In-vitro-Daten zum besseren Verständnis von In-vivo-Effekten beitragen. Hierfür sind allerdings weiterführende Studien zur Vergleichbarkeit verschiedener In-vitro-Assays und der Übertragbarkeit von In-vitro-Daten auf die Effekte *in vivo* nötig.

Die im Projekt angewandte wirkbezogene Analytik ist ein vielversprechendes Werkzeug zur Identifizierung „neuer Problemstoffe“ in Umweltmatrizes. In Kombination mit einer leistungsfähigen chemischen Analytik (HRMS) können Biotests verwendet werden, um bioaktive Substanzen in der Umwelt zu charakterisieren. Um das große Potential der wirkbezogene Analytik im Bereich der Umweltanalytik voll auszuschöpfen zu können, sind weitere Entwicklungen im Softwarebereich (z.B. automatisierte Datenextraktion) nötig. Weiterhin mangelt es derzeit an umfangreichen Datenbanken zur Identifizierung von Substanzen mittels LC-MS.

9.2 Kunststoffe und Endokrine Disruptoren

Dass Kunststoffe eine ganze Reihe endokrin wirksamer Substanzen enthalten können, ist belegt (MUNCKE 2009) und kann im vorliegenden Projekt mit Hilfe von Biotests bestätigt werden. Die erhobenen Daten legen allerdings den Schluss nahe, dass viele der bioaktiven Substanzen bisher nicht beschrieben sind. Da die Kenntnisse über potentielle Kunststoff-assoziierte Chemikalien äußerst lückenhaft sind, würde sich eine Forschungs Kooperation mit Herstellern und zuständigen Behörden anbieten. Ziel sollte es sein, eine möglichst vollständige Liste von Substanzen in Kunststoffen zu erstellen und deren endokrines Potential zu charakterisieren. Auch sollte die gesamte Produktionskette vom Granulat über weitere Vorformen zum Endprodukt untersucht werden, um potentielle Kontaminationsquellen für Endokrine Disruptoren aufzuklären. Im Fall von unbekannten endokrin aktiven Substanzen (z.B. NIAS) könnte die bereits im Projekt erprobte wirkbezogenen Analytik eingesetzt werden, um diese zu identifizieren.

Zur Vorhersage der potentiellen Effekte von Kunststoff-assoziierten Endokrinen Disruptoren sind zusätzlich In-vivo-Studien notwendig. Diese können aber erst nach der eindeutigen Identifizierung der entsprechenden Komponenten und Mischungen erfolgen. Neben der (öko)toxikologischen Charakterisierung ist die Expositionsabschätzung für die Bewertung potentieller Effekte unabdingbar. Wie in Abs. 1.1 gezeigt, mangelt es an Daten zum Eintrag und Verhalten von Kunststoffen in der Umwelt, insbesondere in limnischen und terrestrischen Ökosystemen. Auch das Verhalten von Kunststoff-assoziierten Chemikalien während des Transports und der Degradation von Kunststoffen im Ökosystem ist ungenügend beschrieben.

In der Gesamtschau deuten die vorgelegten Daten darauf hin, dass Kunststoffe eine relevante Quelle für die Exposition von Mensch und Umwelt mit endokrin aktiven Substanzen sind. Eine weiterführende Identifizierung der entsprechenden Substanzen und deren eingehende (öko)toxikologische Charakterisierung ist im Sinne des vorbeugenden Verbraucher- und Umweltschutzes geboten.

9.3 Implikationen für die regulatorische Arbeit

Auch für die Regulation ergeben sich aus dem vorliegenden Forschungsprojekt zahlreiche Perspektiven: Die vorgestellten Daten zeigen, dass biologische Testverfahren im Vergleich zur gezielten chemischen Analytik zahlreiche Vorteile bieten. Insbesondere die Integration der biologischen Effekte von komplexen Mischungen und bisher unbekannten Substanzen machen Biotests für die Regulation interessant. Dennoch können In-vitro-Daten nicht alleinstehend betrachtet werden. Nur in Kombination mit einer leistungsfähigen non-target Analytik, welche die stoffliche Zuordnung der beobachteten Effekte ermöglicht, und mit In-vivo-Testverfahren, welche Vorhersagen über potentielle Effekte im intakten Organismus ermöglichen, können aussagekräftige Erkenntnisse für die Regulation generiert werden.

Um die behördliche Akzeptanz von biologischen Testverfahren und insbesondere In-vitro-Assays zu erhöhen, sollte die Standardisierung von In-vitro-Verfahren für die Detektion von endokriner Aktivität in Umweltproben vorangetrieben und ihre Relevanz für den Schutz von Populationen stärker belegt werden. Eine Validierung und Standardisierung geeigneter In-vitro-Biotests ist besonders vor dem Hintergrund der Etablierung geeigneter Tierversuchersatzmethoden wichtig. Derzeit laufende Verfahren beim ICCVAM, ECVAM und der OECD sind allerdings auf In-vitro-Verfahren zur Charakterisierung der endokrinen Aktivität von Einzelsubstanzen im humanen Kontext fokussiert. Die Validierung von In-vitro-Assays zur Untersuchung der endokrinen Aktivität von komplexen Umweltproben ist derzeit nicht geplant, sollte aber angestrebt werden. Hierfür sollte – zusätzlich zur Standardisierung des Biotestes selbst – auch die Standardisierung der Verfahren zur Probengewinnung und -aufbereitung sowie zur quantitativen Analyse von In-vitro-Daten erfolgen.

Standardisiert erhobene bio-Äquivalente in Oberflächengewässern könnten so zukünftig ein integrierter Marker für die Belastung mit endokrin wirksamen Substanzen sein. Bei einem

Monitoring mit den verwendeten In-vitro-Bioassays könnten demnach Östradioläquivalente (EEQ) als integriertes Maß der östrogenen Aktivität erhoben werden. In Anlehnung an die Umweltqualitätsnormen der Wasserrahmenrichtlinie könnten zudem Grenzwerte in Form von bio-Äquivalenten definiert werden, welche z.B. in Kläranlagenabflüssen nicht überschritten werden dürfen. Ein solches Vorgehen hätte den entscheidenden Vorteil, dass aufwändige chemische Analysen von diversen Einzelsubstanzen durch ein einziges, kostengünstigeres Verfahren ersetzt würden, welches zudem Kombinationswirkungen berücksichtigt.

10 Literatur

- ANDRADY, A. L., M. A. NEAL (2009). "Applications and societal benefits of plastics." Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences **364**(1526): 1977-1984.
- BARNES, D. K. A., F. GALGANI, R. C. THOMPSON, M. BARLAZ (2009). "Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments." Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences **364**(1526): 1985-1998.
- BEGLEY, T. H., J. E. BILES, C. CUNNINGHAM, O. PIRINGER (2004). "Migration of a UV stabilizer from polyethylene terephthalate (PET) into food simulants." Food Additives and Contaminants **21**(10): 1007-1014.
- BEHR, M. (2009). Vergleichende Untersuchungen von Lebensmitteln auf endokrin wirksame Substanzen durch Biotests und chemische Analytik. Fachbereich Biowissenschaften. Frankfurt am Main, Goethe University: 116.
- BENTAYEB, K., R. BATLLE, J. ROMERO, C. NERIN (2007). "UPLC-MS as a powerful technique for screening the nonvolatile contaminants in recycled PET." Analytical and Bioanalytical Chemistry **388**(5-6): 1031-1038.
- BILES, J. E., T. P. MCNEAL, T. H. BEGLEY, H. C. HOLLIFIELD (1998). "Determination of bisphenol A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids." Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**(7): 2894-2894.
- BISCARDI, D., S. MONARCA, R. DE FUSCO, F. SENATORE, P. POLI, A. BUSCHINI, C. ROSSI, C. ZANI (2003). "Evaluation of the migration of mutagens/carcinogens from PET bottles into mineral water by *Tradescantia*/micronuclei test, Comet assay on leukocytes and GC/MS." Science of the Total Environment **302**(1-3): 101-108.
- BLISS, C. I. (1939). "The toxicity of poisons applied jointly." Annals of Applied Biology **26**(3): 585-615.
- BOEHMLER, G., R. KOHNEN, U. BOROWSKI, A. RUEHE (2006). "Einsatz eines biologischen Testsystems (E-Screen) in der amtlichen Lebensmittelüberwachung zum Nachweis estrogen wirksamer Substanzen." Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit **1**: 325-331 (in German).
- BORNEHAG, C. G., B. LUNDGREN, C. J. WESCHLER, T. SIGSGAARD, L. HAGERHED-ENGMAN, J. SUNDELL (2005). "Phthalates in indoor dust and their association with building characteristics." Environmental Health Perspectives **113**(10): 1399-1404.
- BOSNIR, J., D. PUNTARIC, A. GALIC, I. SKES, T. DIJANIC, M. KLARIC, M. GRGIC, M. CURKOVIC, Z. SMIT (2007). "Migration of phthalates from plastic containers into soft drinks and mineral water." Food Technology and Biotechnology **45**(1): 91-95.
- BRACK, W. (2003). "Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures?" Analytical and Bioanalytical Chemistry **377**(3): 397-407.
- BRACK, W., M. SCHMITT-JANSEN, M. MACHALA, R. BRIK, D. BARCELO, E. SCHYMANSKI, G. STRECK, T. SCHULZE (2008). "How to confirm identified toxicants in effect-directed analysis." Analytical and Bioanalytical Chemistry **390**(8): 1959-1973.
- BRAUNRATH, R., D. PODLIPNA, S. PADLESAK, M. CICHNA-MARKL (2005). "Determination of bisphenol A in canned foods by immunoaffinity chromatography, HPLC, and fluorescence detection." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(23): 8911-8917.
- BROTONS, J. A., M. F. OLEASERRANO, M. VILLALOBOS, V. PEDRAZA, N. OLEA (1995). "Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans." Environmental Health Perspectives **103**(6): 608-612.
- BROWNE, M. A., A. DISSANAYAKE, T. S. GALLOWAY, D. M. LOWE, R. C. THOMPSON (2008). "Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.)." Environmental Science & Technology **42**(13): 5026-5031.
- BROWNE, M. A., T. S. GALLOWAY, R. C. THOMPSON (2010). "Spatial Patterns of Plastic Debris along Estuarine Shorelines." Environmental Science & Technology **44**(9): 3404-3409.
- CASAJUANA, N., S. LACORTE (2003). "Presence and release of phthalic esters and other endocrine disrupting compounds in drinking water." Chromatographia **57**(9-10): 649-655.

- CASAJUANA, N., S. LACORTE (2004). "New methodology for the determination of phthalate esters, bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and nonylphenol in commercial whole milk samples." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(12): 3702-3707.
- CHOE, S. Y., S. J. KIM, H. G. KIM, J. H. LEE, Y. CHOI, H. LEE, Y. KIM (2003). "Evaluation of estrogenicity of major heavy metals." Science of the Total Environment **312**(1-3): 15-21.
- CHRISTIANSEN, S., M. SCHOLZE, M. DALGAARD, A. M. VINGGAARD, M. AXELSTAD, A. KORTENKAMP, U. HASS (2009). "Synergistic disruption of external male sex organ development by a mixture of four antiandrogens." Environmental Health Perspectives **117**(12): 1839-1846.
- DALGAARD, M., U. HASS, A. M. VINGGAARD, K. JARFELT, H. R. LAM, I. K. SØRENSEN, H. M. SOMMER, O. LADEFOGED (2003). "Di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) induced developmental toxicity but not antiandrogenic effects in pre- and postnatally exposed Wistar rats." Reproductive Toxicology **17**(2): 163-170.
- DESBROW, C., E. J. ROUTLEDGE, G. C. BRIGHTY, J. P. SUMPTER, M. WALDOCK (1998). "Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening." Environmental Science & Technology **32**(11): 1549-1558.
- DI BELLA, G., M. SAITTA, S. LO CURTO, F. SALVO, G. LICANDRO, G. DUGO (2001). "Production process contamination of citrus essential oils by plastic materials." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(8): 3705-3708.
- DI BELLA, G., M. SAITTA, L. LA PERA, M. ALFA, G. DUGO (2004). "Pesticide and plasticizer residues in bergamot essential oils from Calabria (Italy)." Chemosphere **56**(8): 777-782.
- DI BENEDETTO, P. (2009). Ökotoxikologische Charakterisierung mobiler organischer Fremdstoffe aus dem Hessischen Ried. Fachbereich Biowissenschaften. Frankfurt am Main, Goethe University: 216.
- DOPICO-GARCIA, M. S., J. M. LOPEZ-VILARINO, M. V. GONZALEZ-RODRIGUEZ (2007). "Antioxidant content of and migration from commercial polyethylene, polypropylene, and polyvinyl chloride packages." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(8): 3225-3231.
- DUFT, M., U. SCHULTE-OEHLMANN, M. TILLMANN, B. MARKERT, J. OEHLMANN (2003a). "Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(1): 145-152.
- DUFT, M., U. SCHULTE-OEHLMANN, L. WELTJE, M. TILLMANN, J. OEHLMANN (2003b). "Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*." Aquatic Toxicology **64**(4): 437-449.
- EMPA (2003). Migration of organic components from polyethylene terephthalate (PET) bottles to water. Dübendorf, EMPA: 13.
- ENNEKING, P. A. (2006). "Phthalates not in plastic food packaging." Environmental Health Perspectives **114**(2): A89-A90.
- EUROPEAN COMMISSION (1985). COUNCIL DIRECTIVE 85/572/EEC of 19 December 1985 laying down the list of simulants to be used for testing migration of constituents of plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs.
- EUROPEAN COMMISSION (2002). COMMISSION DIRECTIVE 2002/72/EC of 6 August 2002 relating to plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs.
- EUROPEAN COMMISSION (2009). European Business - Facts and figures - 2009 edition. Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities (doi:10.2785/23246).
- FARHOODI, M., Z. EMAM-DJOMEH, M. R. EHSANI, A. OROMIEHIE (2008). "Effect of Environmental Conditions on the Migration of Di(2-Ethylhexyl)Phthalate from Pet Bottles into Yogurt Drinks: Influence of Time, Temperature, and Food Simulant." Arabian Journal for Science and Engineering **33**(2B): 279-287.
- FRANZ, R., F. WELLE (2009). "Can Migration of Endocrine Disruptors from Plastic Bottles be the Cause of Estrogenic Burden Recently Determined in Bottled Mineral Water?" Deutsche Lebensmittel-Rundschau **105**(5): 315-318.
- GHISARI, M., E. C. BONEFELD-JORGENSEN (2009). "Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions." Toxicology Letters **189**(1): 67-77.

- GREGORY, M. R. (2009). "Environmental implications of plastic debris in marine settings-entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions." Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences **364**(1526): 2013-2025.
- GRUN, F., B. BLUMBERG (2009). "Endocrine disrupters as obesogens." Molecular and Cellular Endocrinology **304**(1-2): 19-29.
- GUENTHER, K., V. HEINKE, B. THIELE, E. KLEIST, H. PRAST, T. RAECKER (2002). "Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food." Environmental Science & Technology **36**(8): 1676-1680.
- HALDIMANN, M., A. BLANC, V. DUDLER (2007). "Exposure to antimony from polyethylene terephthalate (PET) trays used in ready-to-eat meals." Food Additives and Contaminants **24**(8): 860-868.
- HECKER, M., H. HOLLERT (2009). "Effect-directed analysis (EDA) in aquatic ecotoxicology: state of the art and future challenges." Environmental Science and Pollution Research **16**(6): 607-613.
- HEISTERKAMP, I., J. GANDRASS, W. RUCK (2004). "Bioassay-directed chemical analysis utilizing LC-MS: a tool for identifying estrogenic compounds in water samples?" Analytical and Bioanalytical Chemistry **378**(3): 709-715.
- HIGUCHI, A., B. O. YOON, T. KANEKO, M. HAM, M. MAEKAWA, T. NOHMI (2004). "Separation of endocrine disruptors from aqueous solutions by pervaporation: Dioctylphthalate and butylated hydroxytoluene in mineral water." Journal of Applied Polymer Science **94**(4): 1737-1742.
- HOLLERT, H., M. DURR, R. HOLTEY-WEBER, M. ISLINGER, W. BRACK, H. FARBER, L. ERDINGER, T. BRAUNBECK (2005). "Endocrine disruption of water and sediment extracts in. a non-radioactive dot blot/RNase protection-assay using isolated hepatocytes of rainbow trout - Deficiencies between bioanalytical effectiveness and chemically determined concentrations and how to explain them." Environmental Science and Pollution Research **12**(6): 347-360.
- HOPEWELL, J., R. DVORAK, E. KOSIOR (2009). "Plastics recycling: challenges and opportunities." Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences **364**(1526): 2115-2126.
- HORAK, J. (2006). Untersuchung zur Migration östrogenen und antiöstrogenen Substanzen aus Lebensmittelverpackungen mit Hilfe eines Biotests. Staatsexamensarbeit. Fachbereich Biowissenschaften. Frankfurt, Johann Wolfgang Goethe-Universität.
- HOWE, S. R., P. SURANA, M. R. JAKUPCA, L. BORODINSKY (2001). "Potential dietary exposure to p-nonylphenol from food-contact use of tris(nonylphenyl)phosphite (TNPP)." Food Additives and Contaminants **18**(11): 1021-1039.
- INOUE, D., K. NAKAMA, H. MATSUI, K. SEI, M. IKE (2009). "Detection of Agonistic Activities Against Five Human Nuclear Receptors in River Environments of Japan Using a Yeast Two-Hybrid Assay." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **82**(4): 399-404.
- INOUE, K., S. KONDO, Y. YOSHIE, K. KATO, Y. YOSHIMURA, M. HORIE, H. NAKAZAWA (2001). "Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride food packaging films into food simulants and foods." Food Additives and Contaminants **18**(2): 157-164.
- JARFELT, K., M. DALGAARD, U. HASS, J. BORCH, H. JACOBSEN, O. LADEFOGED (2005). "Antiandrogenic effects in male rats perinatally exposed to a mixture of di(2-ethylhexyl) phthalate and di(2-ethylhexyl) adipate." Reproductive Toxicology **19**(4): 505-515.
- JERSCH, I. (2010). Untersuchungen der Wirksamkeit von Umweltchemikalien und -proben mit dem Yeast-Two-Hybrid-Assay für ausgewählt nukleäre Rezeptoren. Fachbereich Biowissenschaften. Frankfurt am Main, Goethe University: 130.
- JOBLING, S., T. REYNOLDS, R. WHITE, M. G. PARKER, J. P. SUMPTER (1995). "A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic." Environmental Health Perspectives **103**(6): 582-587.
- JOBLING, S., D. CASEY, T. ROGERS-GRAY, J. OEHLMANN, U. SCHULTE-OEHLMANN, S. PAWLOWSKI, T. BAUNBECK, A. P. TURNER, C. R. TYLER (2004). "Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent." Aquatic Toxicology **66**(2): 207-222.
- JOBLING, S., R. WILLIAMS, A. JOHNSON, A. TAYLOR, M. GROSS-SOROKIN, M. NOLAN, C. R. TYLER, R. VAN AERLE, E. SANTOS, G. BRIGHTY (2006). "Predicted exposures to steroid estrogens in UK rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations." Environmental Health Perspectives **114**: 32-39.

- JOBLING, S., R. W. BURN, K. THORPE, R. WILLIAMS, C. TYLER (2009). "Statistical Modeling Suggests that Antiandrogens in Effluents from Wastewater Treatment Works Contribute to Widespread Sexual Disruption in Fish Living in English Rivers." Environmental Health Perspectives **117**(5): 797-802.
- KATAOKA, H., M. ISE, S. NARIMATSU (2002). "Automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the analysis of bisphenol A, alkylphenols, and phthalate esters in foods contacted with plastics." Journal of Separation Science **25**(1-2): 77-85.
- KIM, H., S. G. GILBERT, J. B. JOHNSON (1990). "Determination of potential migrants from commercial amber polyethylene terephthalate bottle wall." Pharmaceutical Research **7**(2): 176-179.
- KOCH, H. M., A. M. CALAFAT (2009). "Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture." Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences **364**(1526): 2063-2078.
- KÖRNER, W., V. HANF, W. SCHULLER, H. BARTSCH, M. ZWIRNER, H. HAGENMAIER (1998). "Validation and application of a rapid in vitro assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals." Chemosphere **37**(9-12): 2395-2407.
- KÖRNER, W., V. HANF, W. SCHULLER, C. KEMPTER, J. METZGER, H. HAGENMAIER (1999). "Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents." Science of the Total Environment **225**(1-2): 33-48.
- KORTENKAMP, A., R. ALTENBURGER (1999). "Approaches to assessing combination effects of oestrogenic environmental pollutants." Science of the Total Environment **233**(1-3): 131-140.
- KRAUSS, M., H. SINGER, J. HOLLENDER (2010). "LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns." Analytical and Bioanalytical Chemistry **397**(3): 943-951.
- KRISHNAN, A. V., P. STATHIS, S. F. PERMUTH, L. TOKES, D. FELDMAN (1993). "Bisphenol-A - An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving." Endocrinology **132**(6): 2279-2286.
- LARSEN, J. C. (2006). "Risk assessments of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls in food." Molecular Nutrition & Food Research **50**(10): 885-896.
- LATINI, G. (2005). "Monitoring phthalate exposure in humans." Clinica Chimica Acta **361**(1): 20-29.
- LAVES (2007). Abschlussbericht zum Forschungsprojekt, Projektphase II. Untersuchung estrogen wirksamer Substanzen in Quellwässern. Braunschweig, Niedersächsisches Ministerium für den ländlichen Raum, Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz: 56.
- LEUSCH, F. D. L., C. DE JAGER, Y. LEVI, R. LIM, L. PUIJKER, F. SACHER, L. A. TREMBLAY, V. S. WILSON, H. F. CHAPMAN (2010). "Comparison of Five in Vitro Bioassays to Measure Estrogenic Activity in Environmental Waters." Environmental Science & Technology **44**(10): 3853-3860.
- LILYA, D. (2001). Analysis and risk assessment of organic chemical migration from reused PET plastic bottles. College of Graduate Studies. Moscow, University of Idaho: 87.
- LOEWE, S., H. MUISCHNEK (1926). "Combinated effects I Announcement - Implements to the problem." Naunyn-Schmiedebergs Archiv Fur Experimentelle Pathologie Und Pharmakologie **114**: 313-326.
- LÓPEZ-CERVANTES, J., D. I. SÁNCHEZ-MACHADO, J. SIMAL-LOZANO, P. PASEIRO-LOSADA (2003). "Migration of ethylene terephthalate oligomers from roasting bags into olive oil." Chromatographia **58**(5-6): 321-326.
- LOYO-ROSALES, J. E., G. C. ROSALES-RIVERA, A. M. LYNCH, C. P. RICE, A. TORRENTS (2004). "Migration of nonylphenol from plastic containers to water and a milk surrogate." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(7): 2016-2020.
- LUTHER, E. (2007). Untersuchungen zur Migration endokrin wirksamer Substanzen aus Kunststoffen. Fachbereich Biowissenschaften. Frankfurt am Main, Johann Wolfgang Goethe-Universität: 78.
- MCDONALD, G. R., A. L. HUDSON, S. M. J. DUNN, H. T. YOU, G. B. BAKER, R. M. WHITTAL, J. W. MARTIN, A. JHA, D. E. EDMONDSON, A. HOLT (2008). "Bioactive Contaminants Leach from Disposable Laboratory Plasticware." Science **322**(5903): 917-917.

- MCNEAL, T. P., J. E. BILES, T. H. BEGLEY, J. C. CRAUN, M. L. HOPPER, C. A. SACK (2000). Determination of suspected endocrine disruptors in foods and food packaging. Analysis of Environmental Endocrine Disruptors. Washington, Amer. Chemical Soc. **747**: 33-52.
- MEEKER, J. D., S. SATHYANARAYANA, S. H. SWAN (2009). "Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes." Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences **364**(1526): 2097-2113.
- MONTEIRO, M., C. NERÍN, F. G. R. REYES (1999). "Migration of Tinuvin P, a UV stabilizer, from PET bottles into fatty-food simulants." Packaging Technology and Science **12**(5): 241-248.
- MONTUORI, P., E. JOVER, M. MORGANTINI, J. M. BAYONA, M. TRIASSI (2008). "Assessing human exposure to phthalic acid and phthalate esters from mineral water stored in polyethylene terephthalate and glass bottles." Food Additives and Contaminants **25**(4): 511-518.
- MORIYAMA, K., T. TAGAMI, T. AKAMIZU, T. USUI, M. SAIJO, N. KANAMOTO, Y. HATAYA, A. SHIMATSU, H. KUZUYA, K. NAKAO (2002). "Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **87**(11): 5185-5190.
- MUNCKE, J. (2009). "Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source?" Science of the Total Environment **407**(16): 4549-4559.
- NAIDENKO, O., L. NNEKA, R. SHARP, J. HOULIHAN (2008). Bottled Water Quality Investigation: 10 Major Brands, 38 Pollutants. Washington, DC, Environmental Working Group: <http://www.ewg.org/reports/bottledwater> [Accessed 08/17/2010].
- NAKADA, N., H. NYUNOYA, M. NAKAMURA, A. HARA, T. IGUCHI, H. TAKADA (2004). "Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent." Environmental Toxicology and Chemistry **23**(12): 2807-2815.
- NAKANISHI, T. (2008). "Endocrine disruption induced by organotin compounds; organotins function as a powerful agonist for nuclear receptors rather than an aromatase inhibitor." Journal of Toxicological Sciences **33**(3): 269-276.
- NISHIKAWA, J., K. SAITO, J. GOTO, F. DAKEYAMA, M. MATSUO, T. NISHIHARA (1999). "New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator." Toxicology and Applied Pharmacology **154**(1): 76-83.
- NISHIKAWA, J., S. MAMIYA, T. KANAYAMA, T. NISHIKAWA, F. SHIRAISHI, T. HORIGUCHI (2004). "Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods." Environmental Science & Technology **38**(23): 6271-6276.
- NISHIKAWA, J. (2006). "Imposex in marine gastropods may be caused by binding of organotins to retinoid X receptor." Marine Biology **149**(1): 117-124.
- O'BRIEN, J., I. WILSON, T. ORTON, F. POGNAN (2000). "Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity." European Journal of Biochemistry **267**(17): 5421-5426.
- OEHLMANN, J., P. DI BENEDETTO, M. TILLMANN, M. DUFT, M. OETKEN, U. SCHULTE-OEHLMANN (2007). "Endocrine disruption in prosobranch molluscs: evidence and ecological relevance." Ecotoxicology **16**(1): 29-43.
- OEHLMANN, J., U. SCHULTE-OEHLMANN, W. KLOAS, O. JAGNYTSCH, I. LUTZ, K. O. KUSK, L. WOLLENBERGER, E. M. SANTOS, G. C. PAULL, K. J. W. VAN LOOK, C. R. TYLER (2009). "A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife." Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences **364**(1526): 2047-2062.
- ORTON, F., I. LUTZ, W. KLOAS, E. J. ROUTLEDGE (2009). "Endocrine Disrupting Effects of Herbicides and Pentachlorophenol: In Vitro and in Vivo Evidence." Environmental Science & Technology **43**(6): 2144-2150.
- PALOMINO, J. C., A. MARTIN, M. CAMACHO, H. GUERRA, J. SWINGS, F. PORTAELS (2002). "Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **46**(8): 2720-2722.
- PINTO, B., D. REALI (2009). "Screening of estrogen-like activity of mineral water stored in PET bottles." International Journal of Hygiene and Environmental Health **212**(2): 228-232.

- PLASTICSEUROPE (2009). "The Compelling Facts About Plastics 2009. An analysis of European plastics production, demand and recovery for 2008." 24.
- QUEDNOW, K., W. PUTTMANN (2009). "Temporal concentration changes of DEET, TCEP, terbutryn, and nonylphenols in freshwater streams of Hesse, Germany: possible influence of mandatory regulations and voluntary environmental agreements." Environmental Science and Pollution Research **16**(6): 630-640.
- REEMTSMA, T. (2001). "Prospects of toxicity-directed wastewater analysis." Analytica Chimica Acta **426**(2): 279-287.
- REGNERY, J., W. PUTTMANN (2009). "Organophosphorus Flame Retardants and Plasticizers in Rain and Snow from Middle Germany." Clean-Soil Air Water **37**(4-5): 334-342.
- ROUTLEDGE, E. J., J. P. SUMPTER (1996). "Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen." Environmental Toxicology and Chemistry **15**(3): 241-248.
- ROUTTI, H., M. NYMAN, B. M. JENSSEN, C. BACKMAN, J. KOISTINEN, G. W. GABRIELSEN (2008). "Bone-related effects of contaminants in seals may be associated with vitamin D and thyroid hormones." Environmental Toxicology and Chemistry **27**(4): 873-880.
- RYAN, P. G., C. J. MOORE, J. A. VAN FRANEKER, C. L. MOLONEY (2009). "Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment." Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences **364**(1526): 1999-2012.
- SAFE, S. H. (2000). "Endocrine disruptors and human health - Is there a problem? An update." Environmental Health Perspectives **108**(6): 487-493.
- SANFILIPPO, K., B. PINTO, M. P. COLOMBINI, U. BARTOLUCCI, D. REALI (2010). "Determination of trace endocrine disruptors in ultrapure water for laboratory use by the yeast estrogen screen (YES) and chemical analysis (GC/MS)." Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **878**(15-16): 1190-1194.
- SARAC, M. (2006). Östrogene und antiöstrogene Aktivität mobiler organischer Xenobiotika im Hessischen Ried. Staatsexamensarbeit. Fachbereich Biowissenschaften. Frankfurt, Johann Wolfgang Goethe-Universität.
- SAX, L. (2010a). "Polyethylene Terephthalate and Endocrine Disruptors Response." Environmental Health Perspectives **118**(5): A197-A197.
- SAX, L. (2010b). "Polyethylene Terephthalate May Yield Endocrine Disruptors." Environmental Health Perspectives **118**(4): 445-448.
- SCHETTLER, T. (2006). "Human exposure to phthalates via consumer products." International Journal of Andrology **29**(1): 134-139.
- SCHMITT, C., M. OETKEN, O. DITTBERNER, M. WAGNER, J. OEHLMANN (2008). "Endocrine modulation and toxic effects of two commonly used UV screens on the aquatic invertebrates *Potamopyrgus antipodarum* and *Lumbriculus variegatus*." Environmental Pollution **152**(2): 322-329.
- SCHULTE-OEHLMANN, U., J. OEHLMANN, B. BAUER, P. FIORONI, U. S. LEFFLER (1998). "Toxico-kinetic and -dynamic aspects of TBT-induced imposex in *Hydrobia ulvae* compared with intersex in *Littorina littorea* (Gastropoda, Prosobranchia)." Hydrobiologia **378**: 215-225.
- SCHULTIS, T., J. W. METZGER (2004). "Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase)." Chemosphere **57**(11): 1649-1655.
- SHAO, B., H. HAN, J. Y. HU, J. ZHAO, G. H. WU, Y. XUE, Y. L. MA, S. J. ZHANG (2005). "Determination of alkylphenol and bisphenol A in beverages using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry." Analytica Chimica Acta **530**(2): 245-252.
- SHARPE, R. M. (2003). "The 'oestrogen hypothesis' - Where do we stand now?" International Journal of Andrology **26**(1): 2-15.
- SHOTYK, W., M. KRACHLER, B. CHEN (2006). "Contamination of Canadian and European bottled waters with antimony from PET containers." Journal of Environmental Monitoring **8**(2): 288-292.

- SHOTYK, W., M. KRACHLER (2007). "Contamination of bottled waters with antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) increases upon storage." Environmental Science & Technology **41**(5): 1560-1563.
- SILVA, E., N. RAJAPAKSE, A. KORTENKAMP (2002). "Something from "nothing" - Eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects." Environmental Science & Technology **36**(8): 1751-1756.
- SNYDER, S. A., D. L. VILLENEUVE, E. M. SNYDER, J. P. GIESY (2001). "Identification and quantification of estrogen receptor agonists in wastewater effluents." Environmental Science & Technology **35**(18): 3620-3625.
- SOHONI, P., J. P. SUMPTER (1998). "Several environmental oestrogens are also anti-androgens." Journal of Endocrinology **158**(3): 327-339.
- SOTO, A. M., H. JUSTICIA, J. W. WRAY, C. SONNENSCHN (1991). "Para-nonyl-phenol - an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene." Environmental Health Perspectives **92**: 167-173.
- SOTO, A. M., C. SONNENSCHN, K. L. CHUNG, M. F. FERNANDEZ, N. OLEA, F. O. SERRANO (1995). "The E-Screen assay as a tool to identify estrogens - an update on estrogenic environmental-pollutants." Environmental Health Perspectives **103**: 113-122.
- STAHLHUT, R. W., W. V. WELSHONS, S. H. SWAN (2009). "Bisphenol A Data in NHANES Suggest Longer than Expected Half-Life, Substantial Nonfood Exposure, or Both." Environmental Health Perspectives **117**(5): 784-789.
- STALTER, D., A. MAGDEBURG, M. WAGNER, J. OEHLMANN (2010). "Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: Removal of endocrine activity and cytotoxicity." Water Research in press: DOI 10.1016/j.watres.2010.10.008.
- SUGAYA, N., T. NAKAGAWA, K. SAKURAI, M. MORITA, S. ONODERA (2001). "Analysis of aldehydes in water by head space-GC/MS." Journal of Health Science **47**(1): 21-27.
- SUNDKVIST, A. M., U. OLOFSSON, P. HAGLUND (2010). "Organophosphorus flame retardants and plasticizers in marine and fresh water biota and in human milk." Journal of Environmental Monitoring **12**(4): 943-951.
- TAKAMURA-ENYA, T., J. ISHIHARA, S. TAHARA, S. GOTO, Y. TOTSUKA, T. SUGIMURA, K. WAKABAYASHI (2003). "Analysis of estrogenic activity of foodstuffs and cigarette smoke condensates using a yeast estrogen screening method." Food and Chemical Toxicology **41**(4): 543-550.
- TALSNESS, C. E., A. J. M. ANDRADE, S. N. KURIYAMA, J. A. TAYLOR, F. S. VOM SAAL (2009). "Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health." Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences **364**(1526): 2079-2096.
- TAWFIK, M. S., A. HUYGHEBAERT (1999). "Interaction of packaging materials and vegetable oils: Oil stability." Food Chemistry **64**(4): 451-459.
- TEUTEN, E. L., J. M. SAQUING, D. R. U. KNAPPE, M. A. BARLAZ, S. JONSSON, A. BJORN, S. J. ROWLAND, R. C. THOMPSON, T. S. GALLOWAY, R. YAMASHITA, D. OCHI, Y. WATANUKI, C. MOORE, H. V. PHAM, T. S. TANA, M. PRUDENTE, R. BOONYATUMANOND, M. P. ZAKARIA, K. AKKHAVONG, Y. OGATA, H. HIRAI, S. IWASA, K. MIZUKAWA, Y. HAGINO, A. IMAMURA, M. SAHA, H. TAKADA (2009). "Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife." Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences **364**(1526): 2027-2045.
- THOMAS, K. V., M. R. HURST, P. MATTHIESSEN, M. J. WALDOCK (2001). "Characterization of estrogenic compounds in water samples collected from United Kingdom estuaries." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(10): 2165-2170.
- THOMPSON, R. C., C. J. MOORE, F. S. VOM SAAL, S. H. SWAN (2009a). "Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends." Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences **364**(1526): 2153-2166.
- THOMPSON, R. C., C. J. MOORE, F. S. VOM SAAL, S. H. SWAN, Eds. (2009b). Philosophical Transactions of the Royal Society B – Biological Sciences. Plastics, the environment and human health. London, Royal Society Publishing.
- THOMPSON, R. C., S. H. SWAN, C. J. MOORE, F. S. VOM SAAL (2009c). "Our plastic age Introduction." Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences **364**(1526): 1973-1976.

- TOYO'OKA, T., Y. OSHIGE (2000). "Determination of alkylphenols in mineral water contained in PET bottles by liquid chromatography with coulometric detection." Analytical Sciences **16**(10): 1071-1076.
- U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2002). Preparation of Food Contact Notifications and Food Additive Petitions for Food Contact Substances: Chemistry Recommendations, Final Guidance. Rockland (Maryland).
- UMWELTBUNDESAMT (2007). Pressehintergrundpapier: Phthalate - Die nützlichen Weichmacher mit den unerwünschten Eigenschaften. Dessau, Umweltbundesamt, February 2007: 21.
- UMWELTBUNDESAMT (2010). Pressehintergrundpapier: Bisphenol A - Massenchemikalie mit unerwünschten Nebenwirkungen. Dessau, Umweltbundesamt, July 2010: 18.
- VAN DEN BERG, M., L. S. BIRNBAUM, M. DENISON, M. DE VITO, W. FARLAND, M. FEELEY, H. FIEDLER, H. HAKANSSON, A. HANBERG, L. HAWS, M. ROSE, S. SAFE, D. SCHRENK, C. TOHYAMA, A. TRITSCHER, J. TUOMISTO, M. TYSKLIND, N. WALKER, R. E. PETERSON (2006). "The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds." Toxicological Sciences **93**(2): 223-241.
- VASAMI, R. (2010). "Polyethylene Terephthalate and Endocrine Disruptors." Environmental Health Perspectives **118**(5): A196-A197.
- WAGNER, M. (2006). Untersuchungen zum endokrinen Potential von Lebensmittelverpackungen. Fachbereich Biowissenschaften. Frankfurt am Main, Goethe University: 136.
- WAGNER, M., J. OEHLMANN (2009). "Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles." Environmental Science and Pollution Research **16**(3): 278-286.
- WAGNER, M., J. OEHLMANN (2010). "Endocrine disruptors in bottled mineral water: Estrogenic activity in the E-Screen." The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **in press**: DOI 10.1016/j.jsbmb.2010.10.007.
- WESTERHOFF, P., P. PRAPAIPONG, E. SHOCK, A. HILLAIREAU (2008). "Antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water." Water Research **42**(3): 551-556.
- ZOELLER, R. T. (2005). "Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: New studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals." Molecular and Cellular Endocrinology **242**(1-2): 10-15.
- ZYGOURA, P. D., E. K. PALEOLOGOS, K. A. RIGANAKOS, M. G. KONTOMINAS (2005). "Determination of diethylhexyladipate and acetyltributylcitrate in aqueous extracts after cloud point extraction coupled with microwave assisted back extraction and gas chromatographic separation." Journal of Chromatography A **1093**(1-2): 29-35.

Anhang

A1 Migrationsversuch nach EU – Verpackungen

Um das Auslaugen potentieller Umwelthormone aus verschiedenen Lebensmittelverpackungen zu untersuchen, wird das Migrationsverfahren nach EU angewendet, da dies die derzeit einzige standardisierte Methode zur Erfassung der Migration von Substanzen aus Lebensmittelverpackungen ist. Als Lebensmittelsurrogat dient Leitungswasser, da dieses im Vergleich zu diversen Reinstwässern am geringsten östrogen belastet ist (eigene Vorversuche).

Tab. A1: Probenübersicht Verpackungen

no.	sample type	material	volume	no.	sample type	material	volume
F1-F3	div.	metal	div.	F26	dairy drink	PP	0,5 L
F4-F7	div.	glass	div.	F27	dairy product	PP	200 g
F8	functional food	HDPE	100 g	F28	ready meal	PP	0,6 L
F9	margarine	HDPE	100 g	F29	cheese	PP	200 g
F10	fruit juice	HDPE	1 L	F30	dairy product	PP/Alu	0,25 L
F11	soft drink	LDPE	0,2 L	F31	yoghurt	PS	150 g
F12	fruit juice	LDPE	0,1 L	F32	yoghurt	PS	150 g
F13	fruit juice	LDPE	0,2 L	F33	fruit juice	carton	0,5 L
F14-18	div.	PAP	div.	F34	fruit juice	carton	0,2 L
F19	fruit juice	PE	0,2 L	F35	beverage	carton	0,5 L
F20	dairy drink	PET	0,44 L	F36	functional food	unknown	0,065 L
F21	dairy drink	PET	0,4 L	F37	ketchup	unknown	0,5 L
F22	fruit juice	PET	0,33 L	F38	functional food	unknown	0,1 L
F23	beer	PET	0,5 L	F39	yoghurt	unk. PS	150 g
F24	oil	PET	1 L	F40	cheese	unknown	250 g
F25	dairy drink	PP	0,5 L	F41	cheese	unknown	200 g

25 Lebensmittelverpackungen aus insgesamt zehn verschiedensten Materialien (plus unbekannte; vgl. Anhang A2, Seite 28) werden in je drei Replikaten gründlich mit Wasser ausgewaschen und anschließend bis zur ursprünglichen Füllhöhe mit Wasser aufgefüllt. Zwischen dem Befüllen der Verpackungsproben werden insgesamt drei Wasserproben abgenommen und sofort im YES getestet (Tag 0). Als Negativkontrollen (3 Replikate) dienen mit Aceton gewaschene, über Nacht bei 200°C ausgeglühte Bechergläser (Borosilikatglas 3.3), die mit 75 mL Wasser befüllt und mit einem Uhrglas abgedeckt werden. Die Proben werden über den Zeitraum von zehn Tagen bei 40°C gelagert. An den Tagen 1, 2, 5 und 10 wird aus jeder Verpackungsprobe Wasser entnommen und im YES getestet.

A2 Migrationsversuch nach EU – Vorformen

Die sowohl in der EU als auch in den USA angewendete Methode zur Kontrolle von Lebensmitteln und ihren Verpackungen untersucht die Migration aus den Proben über 10 bzw. 30 Tage. Dabei werden das Lösemittel und die Temperatur je nach Lebensmittel und voraussichtlichem Verwendungszweck bestimmt. Das Lösemittel bei wässrigen Lebensmitteln ist Wasser, bei stark fetthaltigen Olivenöl. Die Temperaturen werden nach dem worst-case-Prinzip ausgewählt. Kaltgetränke werden zum Beispiel bei 40°C untersucht. Da in den durchgeführten Versuchen das Hauptaugenmerk auf Kunststoffen liegt, die zur Herstellung von Getränkeverpackungen genutzt werden (PET/PE), wird auch bei diesen

Versuchen Wasser als Lebensmittelsurrogat gewählt und die Migration bei 40°C durchgeführt.

Tab. A2: Probenübersicht Vorformen

Nr.	Material	Nr.	Material	Nr.	Material
1	PET Mahlgut	8	PET Regranulat blau	15	Phenolharz PF
2	PET Regranulat	9	PET Regranulat gold	16	PMMA
3	A-PET Mahlgut	10	PS	17	Polyamid PA
4	GPPS Granulat	11	PP	18	Polyesterharz UP
5	LDPE Granulat 0,3	12	PE	19	Polyethylen PE
6	LDPE Granulat 0,8	13	PET	20	Polystyrol PS
7	PET Mahlgut glasklar	14	PS Granulat Natur	21	PVC

Für die Migrationsversuche nach EU werden jeweils 10 g Kunststoffgranulat bzw. je ein Kunststoffstäbchen der Maße 1,2 x 7,5 x 0,2 cm (Proben 15-21) in 100 mL-Bechergläsern mit 75 mL Referenzwasser (Aq. R 320) bedeckt. Übermäßiges Verdunsten des Wassers während des Versuches wird durch eine (nicht vollkommen luftdichte) Abdeckung mit Uhrgläsern verhindert. Die Versuche werden über 10 bzw. 30 Tage bei 40°C durchgeführt. Die EU-Richtlinie sieht 10 Tage pro Versuch vor, erweitert diese aber bei Bedarf auf 30 Tage. Nach 0, 2, 5, 10, 20 und 30 Tagen werden aus den Gläsern je 1-2 ml Wasser entnommen und im YES auf östrogene Aktivität untersucht. Bei den über 30 Tage laufenden Versuchen werden nach dem 10. Tag Wasser auf 75 mL nachgefüllt, um den Flüssigkeitsverlust durch Verdunstung auszugleichen.

A3 Migrationsversuch nach KATAOKA *et al.* (2002)

Für den Migrationsversuch nach KATAOKA *et al.* (2002) werden je 1 g Kunststoffgranulat bzw. ein Kunststoffplättchen der Maße ca. 1,2 x 2 x 0,2 cm in 22 mL-Braunglasfläschchen mit teflonbeschichtetem Schraubdeckel (Supleco, Bellefonte, USA) mit je 8 ml ELGA-Wasser, 20% EtOH (Merck, Darmstadt), 4% Essigsäure (Merck, Darmstadt) oder n-Heptan (Roth, Karlsruhe) bedeckt. Die Migration findet für die wässrigen Lösungen (Wasser, EtOH und Essigsäure) bei 60°C, für n-Heptan bei Raumtemperatur für jeweils 30 Minuten statt. Bei ersten Versuchen mit den Kunststoffplättchen (Proben 15-21) werden diese nach der Migration aus dem Medium entfernt. Bei Granulaten ist das auf Grund ihrer geringen Korngröße nicht möglich. Sie verbleiben auch für den Rest des Versuches im Medium. Zur besseren Vergleichbarkeit werden auch die Versuche mit den Kunststoffplättchen wiederholt, ohne diese nach der Migration aus den Medien zu entfernen. Nach der Migration werden die wässrigen Surrogatlösungen mit NaCl gesättigt (Aq. = 2,5 g; 20% EtOH = 1,5 g; 4% Essigsäure = 2,0 g) und zweimal mit je 4 ml Diethylether (Merck, Darmstadt) gewaschen. Die Etherphase wird in 4,5 mL-Braunglasvials (CZT, Kriftel) überführt. Die n-Heptan-Proben werden, im Unterschied zu den Arbeiten von KATAOKA *et al.* (2002), komplett abgenommen und ebenfalls in zwei 4,5 mL-Braunglasvials überführt. Alle Teilproben werden mit Stickstoff eingengt und in je 1 mL MeOH gelöst. Nach gründlichem Schütteln werden die Teilproben zusammengeführt, so dass je 2 ml pro Proben für weitere Versuche zur Verfügung stehen. Die Proben werden sowohl im YES als auch im E-Screen auf östrogene Aktivität untersucht.

A4 Yeast-Two-Hybrid-Assays (aus JERSCH 2010)

Die Versuchsdurchführung erfolgt nach einer arbeitsgruppeninternen SOP für den Yeast Estrogen Screen. Davon abweichend wird auf die Zugabe von CuSO_4 in das Medium verzichtet, da im Gegensatz zu den im YES eingesetzten Hefen ein konstitutiver Promoter vorliegt, dessen Aktivität nicht kupferabhängig ist. Zudem wird statt Ethanol Dimethylsulfoxid (DMSO) für die Lösemittelkontrolle eingesetzt, da die für die Positivkontrollen eingesetzten Substanzen in DMSO gelöst sind. Des weiteren handelt es sich um ein Selektionsmedium, mit den Aminosäuren Threonin (2 g/L); Valin (1,5 g/L); Phenylalanin (500 mg/L); Isoleucin, Lysin, Tyrosin (je 300 mg/L); Adenin, Arginin, Histidin, Methionin und Uracil (je 200 mg/L), um das Wachstum anderer Hefestämme, die nicht in der Lage sind, fehlende Aminosäuren selbst zu synthetisieren, zu unterbinden.

A5 Extraktion von Lebensmittelverpackungen (aus JERSCH 2010)

Neben vier Lebensmittelverpackungen aus Polypropylen (PP), Polystyrol (PS), High Density Polyethylen (HDPE) bzw. Low Density Polyethylen (LDPE) werden zusätzlich Frischhaltefolie und Aluminiumfolie untersucht.

Die Verpackungen werden entleert, mit Reinstwasser ausgespült, anschließend in kleine Stücke zerschnitten und in Braunglasfläschchen mit Teflondeckel mit jeweils 15 mL Lösemittel überführt. Die eingesetzte Menge beträgt bei den Proben 3 g. Eine Ausnahme bildet die Frischhaltefolie, von der lediglich 2 g eingesetzt werden können, da das Volumen/Masse-Verhältnis sehr groß ist. Pro Produkt werden vier Lösemittel eingesetzt: Methanol (MeOH), Acetonitril (AcNi), Dichlormethan (DCM) und Heptan. Durch die Behandlung der Verpackungen mit Lösemitteln unterschiedlicher Polarität ($\text{MeOH} > \text{Heptan}$) können sowohl polare als auch unpolare Substanzen herausgelöst werden. Pro Verpackung liegen somit vier Ansätze vor. Aufgrund der hohen Probenanzahl können keine Replikate der Verpackungen mitgeführt werden. Als Blindwerte werden je zwei Replikate der benutzten Lösemittel mitgeführt. Die Proben werden für eine Stunde im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend werden die Verpackungstückchen aus den Braunglasfläschchen entfernt und das Lösemittel unter N_2 abgedampft. Die in den Braunglasfläschchen zurückgebliebenen Substanzen werden in 5 mL Methanol rückgelöst. Es werden pro Well 50 μL der Extrakte abgedampft und im Yeast-Two-Hybrid-Assay eingesetzt.

A6 Extraktionsverfahren für die chemische Analytik

Soxhlet-Extraktion

Die leere PET-Flasche wird in ca. 1 cm^2 große Stücke zerschnitten, die zusammen ca. 5 g ergeben. Über eine Soxhlet-Apparatur wird das PET mit ca. 70 mL eines Iso-Hexan/Aceton (90/10)-Gemisches für 4 Stunden bei 90°C extrahiert. Das Extrakt wird um den Faktor 1:10 eingeeengt.

MeOH-Extraktion

Die leere PET-Flasche wird mit 700 mL MeOH befüllt und verschlossen. Nach 2 Stunden im Ultraschallbad wird die PET-Flasche bei Raumtemperatur für 7 Tage unter dem Abzug stehen gelassen. Danach wird das MeOH um den Faktor 1:100 eingeeengt und gegebenenfalls in Iso-Hexan umgelöst.

Solid Phase Extraktion (SPE)

10,5 Liter Mineralwasser werden über sieben Oasis-HLB 200 Kartuschen angereichert. Mit jeder Kartusche werden 1,5 L Mineralwasser (dotiert mit 200 ng Bisphenol A-D16) extrahiert. Die Kartuschen werden mit jeweils 4 mL Methanol eluiert, zusammengeführt, um den Faktor 10 eingeeengt und gegebenenfalls in Iso-Hexan umgelöst.

A7 GC-MS

Zunächst werden Verfahren angewendet, welche die Migration von Substanzen aus dem Polyethylenterephthalat beschleunigen bzw. die Substanzen anreichern. Im ersten Schritt werden schnelle Extraktionen wie die Soxhlet-Extraktion und das Spülen der Oberfläche mit einem Extraktionsmittel angewendet. Im zweiten Schritt wird Mineralwasser mittels SPE angereichert.

Die sich aus PET-Flaschen herauslösenden Substanzen sind an der Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) mit geeigneten analytischen Verfahren nachzuweisen bzw. zu quantifizieren. Aufgrund des weiten Spektrums unterschiedlicher, potenziell auftretender Substanzen und Substanzklassen stehen für diese Aufgabe analytische Messgeräte wie die GC-MS, die GC-PFPD, die LC-MS/MS und die AAS zur Verfügung.

Standardsubstanzen

Als Standardsubstanzen werden Bisphenol A, 4-n-Nonylphenol, 4-Nonylphenol (technisch), und 4-tert-Octylphenol, butyliertes Hydroxytoluol und -anisol sowie ein Phthalat-Mix aus 17 Phthalaten (Dimethyl-, Diethyl-, Diisobutyl-, Dibutyl, Dimethylglycol-, Diisohexyl-, Diethoxyethyl-, Dipentyl-, Dihexyl-, Benzylbutyl-, Hexylethylhexyl-, Dibutoxyethyl-, Dicyclohexyl-, Diethylhexyl-, Dinonyl- und Dioctylphthalat und Benzylbenzoat) von Sigma Aldrich eingesetzt. Weiter werden sieben Organozinnverbindungen (MBT, DBT, TBT, MOT, TTBT, DOT, TPhT und TCyT) analysiert. Daneben werden sieben PET-Additive von Clariant in Pulverform bezogen: Hostanox O10, Hostavin VSU, Hostavin PR 25, Hostavin PR 31, Hostanox P-EPQ, Hostanox PAR 24 und Nyostab S-EED.

Überprüfung der Blindwerte

Um die Reinheit des verwendeten Methanols und mögliche Kontaminationen beim Aufkonzentrieren der Probe festzustellen, wird das MeOH um den Faktor 10 bzw. 100 eingeeengt. Als Blindwert bei der Soxhlet-Extraktion wird eine parallele Extraktion unter den gleichen Bedingungen ohne PET-Stücke durchgeführt. Bei der SPE-Anreicherung werden drei Kartuschen unter den gleichen Bedingungen konditioniert und eluiert.

GC-MS, GC-PFPD und LC-MS/MS Analyse

Die Proben werden gaschromatographisch (GC) und/oder flüssigchromatographisch (LC) aufgetrennt und mittels massenspektrometrischem Detektor (MSD) und gepulstem flammenphotometrischem Detektor (PFPD) analysiert.

GC-MS/GC-PFPD

Es wird mit drei verschiedenen GC-MS-Messsystemen und einem GC-PFPD-Messsystem analysiert: Messsystem 1: Agilent 6890N GC gekoppelt mit einem Quadrupol-MSD von Agilent, on-column-Injektion; Messsystem 2: Agilent 6890 series plus GC gekoppelt mit einem Quadrupol-MSD von Agilent, splitlose Injektion; Messsystem 3: Trace GC 2000 von Thermo Quest gekoppelt mit einem Ionenfallen-MSD von Thermo Finnigan, splitlose Injektion; Messsystem 4: Agilent 6890N GC gekoppelt mit einem 5380 PFPD (Pulsed Flame Photometric Detector), splitlose Injektion.

Im Messsystem 1, 2 und 4 wird eine HP-5ms-Kapillarsäule (Länge: 30 m, ID: 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm) und in Messsystem 3 eine VF-5ms-Kapillarsäule (Länge: 30 m, ID: 0,25 mm, Filmdicke: 0,1 µm) eingesetzt. Bei allen drei Messsystemen dient Helium als Trägergas. Folgendes Temperaturprogramm des GC-Ofens wird angewendet: nach 2,5 min Heizen bei 60°C wird mit 20°C/min auf 130°C und dann mit 4°C/min auf 320°C geheizt. Der Fluss bei den Messsystemen 1 und 2 beträgt 1 mL/min, bei Messsystem 3 1,5 mL/min und bei Messsystem 4 1,7 mL/min. Das Temperaturprogramm zur Messung der MeOH-Extrakte von Vittel und Volvic mittels Messsystem 1 bildete eine Ausnahme: nach 2 min Heizen bei 70°C wird mit 14°C/min auf 140°C geheizt, dann mit 30°C/min auf 130°C, mit 7°C/min auf 120°C und mit 30°C/min auf 280°C. Messsystem 4 wird mit einem für Organo-Zinn-Verbindungen

optimierten Temperaturprogramm betrieben: Nach einer Minute Heizen bei 60°C wird mit 20°C/min auf 220°C geheizt, für eine Minute isokratisch gefahren und mit 10°C/min auf 280°C geheizt.

Es wird jeweils 1 µL der Probe injiziert. Alle drei Massenspektrometer arbeiten mit Elektronenstoß-Injektion (EI, 70 eV) und werden im Full-Scan-Modus betrieben (50-600 m/z). Zur Verbesserung der Nachweisgrenze, dem Erreichen einer höheren Flüchtigkeit und einer besseren thermischer Stabilität von Substanzen mit polaren funktionellen Gruppen (Phenole, Organozinnverbindungen) wird jede Probe vor der GC-MS-Analyse jeweils auch mit TMSH für 1 h bei 70°C derivatisiert oder für Organozinnverbindungen vor der GC-PFPD-Analyse mit EtBMgBr *in situ* auf dem Schüttler für 17 h derivatisiert und extrahiert. Im zweiten Fall erfolgt ein anschließendes *clean up* an Al₂O₃/AgNO₃.

A8 SPE für die Fraktionierung

Um eine optimale Aufreinigung der östrogenen Komponenten aus Wasserproben zu erreichen, werden zunächst SPE-Säulen verschiedener Hersteller (Machery-Nagel, Varian, 3M, Oasis) erprobt, die sowohl mit traditionellem C18-Sorbens, als auch mit SDB (einem Polystyreneivinylbenzen Kopolymer) arbeiten. Vorversuche konnten zeigen, dass C18-HD-Säulen von 3M zur Aufreinigung von Xenoöstrogenen aus Mineralwasser gut geeignet sind (Daten nicht gezeigt). Da das C18-Sorbens jedoch stärker unpolare Substanzen bindet, werden diese Säulen mit denen eines anderen Herstellers verglichen, der HLB einsetzt, das sowohl polare als auch unpolare Analyte bindet.

Die Festphasenextraktion wird nach einer internen SOP durchgeführt. Nach dem Waschen und Konditionieren der Säulen werden die entgasten Wasserproben mit einem Unterdruck von -0,6 bar über die Säulen gezogen. Nachdem die Proben vollständig aufgezogen und die Säulen anschließend getrocknet sind, können die gebundenen Analyten der Reihe nach mit je 4 mL Methanol (MeOH), Acetonitril (AcNi), Ethylacetat (EtAc) und n-Heptan (Hept) eluiert werden. Hierbei ersetzen Ethylacetat und n-Heptan das früher verwendete, gesundheitsschädigendere Dichlormethan und Hexan. Da die Elution mit zunehmend unpolaren Lösemitteln erfolgt, werden die aus den Proben extrahierten Substanzen schon bei der SPE in vier Fraktionen aufgetrennt.

Die Eluate werden unter einem leichten Stickstoffstrom bei 40°C getrocknet und in 2 mL Methanol rückgeführt. Dies ist notwendig, um die Proben im YES testen zu können (AcNi, EtAc und Hept zerstören die Mikrotiterplatten). Nach der Testung der Eluate im YES werden die Proben mit der höchsten östrogenen Aktivität im Rahmen des TIE-Ansatzes weiter aufbereitet und fraktioniert.

A9 Fraktionierung

Fraktioniert wird mit einem HPLC-System der Firma Dionex mit UV/VIS-Detektor und einem maximalen Probenvolumen von 250 µL, Säule: Acclaim 120, C18, Å 5 µm, 4,6 x 150 mm. Zur Optimierung wird zuerst mit zwei verschiedenen Programmen fraktioniert: Ein isokratisches Programm mit einem konstanten Methanol-Anteil von 60% (Laufzeit 24 min) und ein Gradientenprogramm, bei dem der Methanol-Anteil innerhalb von 15 min von 0% auf 100% erhöht und bis zur Beendigung des Programms bei 24 min gehalten wird. Die Säulentemperatur beträgt 30°C, die Flussrate wird auf 2 mL/min festgelegt, um von jeder Einzelfraktion ein ausreichendes Volumen zu gewinnen.

Zeitgleich mit der Injektion von 250 µL Probe ins System werden im Minutentakt Fraktionen der Probe (nach dem UV/VIS-Detektor) gesammelt, so dass jede Probe in 24 Fraktionen á 2 mL aufgetrennt wird. Diese Fraktionen werden wiederum unter einem leichten Stickstoffstrom bei 50°C eingedampft, um den Wasseranteil zu entfernen. Nach Rückführung in 2 mL Methanol können die Fraktionen im YES auf östrogene Aktivität getestet werden.

A10 LC-MS/MS

Flüssigchromatographisch wird mit einem API 4000 Tripel-Quadrupol Massenspektrometer analysiert. Über ESI (Elektrospray Ionisation) wird bei der Bisphenol A-Methode im negativen Modus und bei der PET-Additive/Screening-Methode im positiven Modus gemessen. Zur Messung von Bisphenol A wird als Laufmittel eine 10 mM Ammoniumacetatlösung mit 10% Acetonitril bei pH 5,7 (A) und eine Mischung aus 20% A und 80% Acetonitril (B) verwendet. Es wird eine Chromolith Performace RP-18e Säule (100 mm x 4,6 mm) eingesetzt.

Für das Screening der Proben im Q1-Full-Scan-Modus (150-1200 m/z) und das Bestimmen der PET-Additive wird Wasser (A) bzw. Acetonitril (B) mit jeweils 0,1 % Ameisensäure als Laufmittel eingesetzt. Für die HPLC wird eine Phenosphere-Next C18 Säule (150 mm x 2 mm x 3 µm) eingesetzt. Tabelle 1 beschreibt das Gradientenprogramm beider Methoden.

Tab. A 3: Gradientenprogramm der PET-Additive/Screening-Methode.

PET-Additive + Screening-Methode				
Step	Total Time [min]	A [%]	B [%]	Fluss [µL/min]
0	0	100	0	200
1	1	100	0	200
2	19	0	100	200
3	29	0	100	200
4	29,1	100	0	200
5	35	100	0	200

A11 Diskussionsprotokoll des Projektabschlussworkshops

Diskussionsprotokoll: Präsentation der Ergebnisse des F&E-Vorhabens Anwendung von Biotests zur Charakterisierung der Expositionspfade für Umwelthormone aus Kunststoffen

Montag, 13. September 2010

Umweltbundesamt Dessau

Wörlitzer Platz 1

06844 Dessau-Roßlau

Ziel und Inhalt von Projekt und Arbeitstreffen

Am 13. September 2010 fand in den Räumen des Umweltbundesamtes Dessau die Präsentation und Abschlusdiskussion der Ergebnisse des F&E-Vorhabens „Bewertung und Regulation von Umwelthormonen, Teilvorhaben 4: Anwendung von Biotests zur Charakterisierung der Expositionspfade für Umwelthormone aus Kunststoffen“ (FKZ 206 67 448/04) statt. Der Auftragnehmer in diesem F&E-Vorhaben ist die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Oehlmann, Goethe Universität Frankfurt/Main.

Die Charakterisierung subletaler chronischer Wirkungen ist ein wichtiger Bestandteil bei der Bewertung des Umweltrisikos von Stoffen. Nationale und internationale Regelungen bringen neue Anforderungen mit sich, da u.a. den endokrin wirksamen Substanzen herausgehobene Bedeutung zugewiesen wird. Dies erweitert zum einen den Bedarf nach Entwicklung eines methodischen Instrumentariums zur Prüfung dieser Substanzen. Zum anderen rückt die Evaluation bisher noch nicht berücksichtigter Expositionspfade für Mensch und Umwelt zunehmend in den Fokus. Sowohl das Auslaugen von Kunststoffinhaltsstoffen als auch deren potentiell endokrines Potential ist bisher wissenschaftlich nur unzureichend untersucht. Aus diesem Grund ist es notwendig, Migrationsprozesse adäquat zu beschreiben, entsprechende Stoffe zu identifizieren und deren endokrines Potential und Relevanz für Mensch und Umwelt toxikologisch und ökotoxikologisch zu evaluieren.

Ziel des hier vorgestellten Projektes ist:

- die Charakterisierung der Migration endokrin aktiver Komponenten aus Kunststoffen, z.B. aus Lebensmittelverpackungen,
- die Erfassung und Charakterisierung des endokrinen Potentials dieser Stoffe mittels biologischer Wirkungsanalytik,
- die Entwicklung entsprechender in-vitro und in-vivo Testmethoden und Verifizierung der methodischen Ansätze sowie
- die stoffliche Charakterisierung (Einzelsubstanzen, Mischungen) der die endokrinen Effekte verursachenden Substanzen durch chemische Analytik.

Die Referenten Martin Wagner und Jörg Oehlmann stellten in drei Vorträgen die grundlegenden Ergebnisse der Projektarbeiten, übergreifende Aspekte zum Thema Verbreitung und Auswirkungen von Plastikinhaltstoffen in der Umwelt sowie mögliche Konsequenzen für die weitere wissenschaftliche und regulatorische Arbeit auf diesem Gebiet vor. Alle Vorträge werden von den Referenten als „pdf-Dokument“ zur Verfügung gestellt: Kunststoffe als Quelle Endokriner Disruptoren: Erkenntnisse aus der Bioanalytik (Martin

Wagner); Inhaltsstoffe im Plastik und Wirkungen auf die Umwelt (Jörg Oehlmann); Blick voraus – Monitoring von Kunststoffen und assoziierten Chemikalien in der Umwelt (Martin Wagner).

Die Ergebnisse des Projektes sowie deren Diskussion verdeutlichten, wie vielschichtig die Fragen im Zusammenhang mit dem Thema „Charakterisierung von Umwelthormonen aus Kunststoffen“ sind. Im Folgenden sind die Kernfragen zusammengefaßt, die im Rahmen der Projektpräsentation und der sich anschließenden Diskussion erörtert wurden.

Kernfragen der Diskussion

I.) Stellen Kunststoffe eine relevante Quelle für endokrine Potentiale in der Umwelt dar?

Kunststoffe und Kunststoffverpackungen stellen in der Umwelt (und gegenüber dem Menschen) eine Quelle für endokrine Potentiale dar. Für den Einsatz im Lebensmittelbereich zugelassene Substanzen werden bisher zwar toxikologisch charakterisiert (u.a. mutagene Effekte), endokrine Aktivität spielt hierbei jedoch keine Rolle. Kunststoffendprodukte, welche zusätzlich Kontaminanten enthalten können, werden bisher unzureichend toxikologisch untersucht.

Ein Drittel der im Vorhaben untersuchten Kunststoffproben wies eine östrogene Aktivität auf, noch häufiger war ein antiöstrogenes Potential festzustellen. Es zeigte sich jedoch kein genereller Trend, dass bestimmte Kunststoffe bzw. Granulate immer eine bestimmte endokrine Aktivität aufweisen. Ursache könnte eine unterschiedliche Zusammensetzung der Ausgangsgranulate sein (unterschiedliche Beistoffe).

Es gibt erste Hinweise darauf, dass Kunststoffe auch Quelle für Substanzen sind, die weitere Rezeptorsysteme beeinflussen (z.B. Thyroidsysteem, Vitamin-D-Rezeptor, RXR-Rezeptor).

Die Relevanz der über Kunststoffe eingetragenen potentiell hormonell wirksamen Substanzen und Gemische für Umweltorganismen und Mensch ist bisher nicht abzuschätzen. Für diese Einschätzung muss dieser Eintragspfad in Relation zu anderen Expositionsquellen gesetzt werden.

II.) Sind die etablierten Tests geeignet, um ein endokrines Potential zu erfassen – in für die Auslaugung aus Kunststoffen relevanten Konzentrationsbereichen?

Die im Vorhaben eingesetzten, entwickelten und modifizierten biologischen Testverfahren sind geeignet und empfindlich genug, östrogene, antiöstrogene und antiandrogene Potenziale in den relevanten Konzentrationsbereichen zu erfassen. Die Verfahren integrieren die Effekte von Mischungen einschließlich bisher unbekannter Substanzen.

Ein methodisches Problem ist jedoch die Überlagerung verschiedener Effekte (z.B. östrogene und antiöstrogene Effekte), die auch die heterogenen und komplexen Migrationskinetiken des endokrinen Potentials aus Kunststoffen widerspiegeln. Diese Komplexität erschwert auch die stoffliche Zuordnung der Effekte.

Die hohe Sensitivität der eingesetzten Testsysteme erfordert dringend weitere Untersuchungen zur Übertragbarkeit von In-vitro- auf In-vivo-Daten, auch um die ökologische Relevanz besser abschätzen zu können.

Das Testdesign kann einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis haben. Soweit wie möglich ist daher für biologische Tests eine Standardisierung sowie unbedingt der Einsatz von adäquaten Kontrollen (auch Positivkontrollen) und Blindwerten erforderlich.

Die Auswertemethodik (z.B. relativer Proliferationseffekt versus Östradioläquivalent-Konzentrationen, abgeleitet aus einer Dosis-Wirkungs-Kurve) beeinflusst das Ergebnis der Tests. Auch hier ist ein standardisiertes Vorgehen bei der Auswertung anzustreben. Die Diskussion der geeigneten Methodik ist hier noch nicht abgeschlossen. Eine Vereinheitlichung der Darstellung endokriner Effekte ist wünschenswert. Eine Möglichkeit ist

die Angabe als BioÄquivalente. Hierfür existieren bisher allerdings keine standardisierten Quantifizierungsmethoden.

III.) Ist das endokrine „Summenpotential“ auf einzelne Substanzen zurückzuführen?

Die stofflichen Ursachen sind bisher ungeklärt. Neben den bereits bekannten Kunststoffinhaltsstoffen sind wahrscheinlich auch bisher nicht identifizierte Metabolite von Kunststoff-assoziierten Chemikalien als Ursache relevant. Vermutlich sind weniger Einzelstoffe als vielmehr Mischungen mehrerer gering konzentrierter Stoffe die Ursache für das beobachtete endokrine Summenpotenzial.

IV.) Ist eine adäquate Analytik vorhanden, um die Substanzen in wirkungsrelevanten Konzentrationsbereichen nachzuweisen? Eine Analytik im relevanten Konzentrationsbereich ist vorhanden, allerdings nur für bekannte endokrin wirksame Substanzen.

Der Einsatz einer leistungsfähigen Non-target Analytik zur Identifikation bisher unbekannter Chemikalien (u.a. LC-HRMS oder LC-NMR) könnte ein Ausweg sein, ist allerdings aufwändig.

Bei der Analytik endokriner Substanzen ist darauf zu achten, die vielfältigen Kontaminationsquellen auszuschließen (Reinstwasser, Lösemittel, Labormaterialien). Den Blindwerten kommt dabei besondere Bedeutung zu.

V.) Welche Rahmenbedingungen sind bei Analytik-Vorbereitung für endokrine Potentiale in Umweltproben relevant?

Grundlage für alle weiteren Untersuchungen ist die Extraktion.

Für die Extraktion und Aufreinigung potentiell endokriner Substanzen aus komplexen Proben existieren keine Standardmethoden, da die chemische Struktur endokrin aktiver Substanzen äußerst vielfältig ist. Jede Methode reinigt selektiv andere potentiell endokrine Substanzen auf und führt damit zu unterschiedlichen Ergebnissen in den Biotests.

Bei der Aufreinigung (z.B. SPE) muss ein Verlust flüchtiger potentiell endokriner Substanzen ausgeschlossen sein. Dazu bietet sich DMSO als "Keeper" an.

VI.) Bietet die Kombination von Bioassay als Summenparameter und chemischer Analytik einen Lösungsansatz, um beobachtete endokrine Effekte bei Freilandorganismen zu erklären?

Grundsätzlich erlaubt es diese Kombination, biologische Effekte und chemische Daten zusammenzuführen. Ein Vorteil des Bioassays als Summenparameter besteht darin, dass auch die Wirkung von unbekannten (neuen?) Substanzen mit erfasst wird.

Probleme sind auf biologischer Seite der beschränkte Probendurchsatz, auf chemischer Seite die Vielzahl nicht erfaßter und erfaßbarer Stoffe.

VII.) Läßt sich diese „Effekt-dirigierte Analytik“ in Monitoringkonzepte implementieren – Wasser, Boden, Luft?

Eine Voraussetzung für die Einbeziehung einer „effekt-dirigierter Analytik“ in Monitoringkonzepte ist die Kenntnis der „natürlichen Hintergrundbelastung“ mit endokrinen wirksamen Substanzen in Gewässern. Daten zur Hintergrundbelastung liegen zumindest aus Hessen und Baden-Württemberg vor.

Prinzipiell jedoch ist die effekt-dirigierte Analytik ein vielversprechender Ansatz zur Identifizierung „neuer“ Problemstoffe im Rahmen des Monitorings und könnte deshalb zur wissenschaftlichen Aufklärung der stofflichen Ursachen beitragen.

VIII.) Lassen sich mittels „Effekt-dirigierter Analytik“ Monitoringlücken schließen?

Die Frage wurde aus Zeitgründen nicht diskutiert.

Weitere Schritte

Der Abschlußbericht zum Projekt wird bis Ende November 2010 fertiggestellt.