

## Zusammenfassung

Es ist bekannt, daß Substanzen anthropogenen Ursprungs wie beispielsweise Bisphenol A (BPA), aber auch natürlich vorkommende Pflanzeninhaltsstoffe wie die Isoflavone Genistein und Daidzein, östrogene Aktivität zeigen und in hinreichend hoher Dosierung entwicklungs- und reproduktionstoxische Wirkungen bei Tieren verursachen können. Es besteht Besorgnis, daß solche Chemikalien bei Aufnahme über die Nahrung auch wirksame Spiegel im Menschen erreichen und über Eingriffe in hormonell gesteuerte Prozesse unerwünschte Effekte auslösen (sog. endokrine Disruption). In der vorliegenden Arbeit sind analytische Methoden zur Bestimmung von BPA, Genistein, Daidzein und Equol in Blutplasma, Geweben und Urinen entwickelt, optimiert und validiert worden, um Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung dieser endokrin aktiven Stoffe und ihrer Metaboliten zu untersuchen.

Für BPA, das in der Polycarbonatherstellung als Kopolymer dient und mit der Nahrung als Kontaminante aufgenommen wird, ist die Verteilung im Nager-Organismus und der transplazentare Transfer untersucht worden: In einer Kinetik Studie wurden, nach *i.v.* Applikation an trächtige Ratten, die Spiegel von BPA in Plasma- sowie in maternalen und fötalen Gewebeproben zu verschiedenen Zeiten ermittelt. Für die Analyse der Proben wurde eine flüssig/flüssig (fl./fl.) Extraktionsmethode mit anschließender GC-MS Analyse entwickelt, die es erlaubt, BPA in den biologischen Matrices zu analysieren. In Plasma und Geweben konnte BPA bis zur Nachweisgrenze von 14 ng/mL bzw. 32 ng/mg (nach DIN 32645 berechnet) mit Wiederfindungsraten (WR) von 84 - 110 % je nach Gewebe und Konzentration, bestimmt werden. Die Präzisionen zwischen den Serien wurden für Plasma mit 6 % und die für Lebergewebe mit 10 % bestimmt.

Die Analyse von Plasma- und Geweben trächtiger DA/Han Ratten, die am 18. Tag der Schwangerschaft mit 10 mg/kg KG BPA *i.v.* dosiert wurden, ergab folgende Befunde: Etwa 5 min nach Applikation wurden hohe maternale Plasmakonzentrationen (3,8 µg/mL) gemessen, die im weiteren Verlauf (nach 2 h) auf ein Zwanzigstel abnahmen. Zudem konnte eine rasche Metabolisierung von BPA durch Phase II Enzyme belegt werden. Aus den Plasma Konzentrationen-Zeit Verläufen ergaben sich Halbwertszeiten von 0,34 h für das BPA-Aglycon und 0,52 h für das Gesamt BPA (Konjugate). In allen Geweben zeigten sich 20 - 30 min nach Injektion die jeweils höchsten Konzentrationen, mit fallender Tendenz der Absolutwerte: Leber(Muttertier) > Niere(Muttertier) > Uterus > Plazenta > Leber(Fötus) > Fötenhomogenat. Im weiteren Verlauf nahmen die Werte rasch ab, und nach 6 h waren nur noch geringe

Mengen BPA in den Geweben nachweisbar. Ein vergleichbarer Verlauf der in Plazenta und fötaler Leber gemessenen Konzentrationen spricht für den ungehinderten Übergang von BPA zum Föten. Im Tierversuch konnte also gezeigt werden, daß BPA schnell in alle Gewebe verteilt, aber auch effizient konjugiert und ausgeschieden wird [Moors *et al.*, 2006, Arch. Toxicol. 80: 647-655].

Für Untersuchungen zur Aufnahme und Bioverfügbarkeit der Isoflavone Daidzein und Genistein, die vor allem in Soja vorkommen, wurden a) die Isoflavongehalte im Mastfutter von Schweinen und b) die Isoflavonkonzentrationen im Blut (Plasma) der Tiere bestimmt. Die Analyse der Futtermittel erfolgte mittels Mikro-HPLC-UV nach ethanolischer Extraktion unter Verwendung der Standardadditionstechnik. Die Nachweisgrenzen lagen bei 10 µg/g Futter. Zur Analyse der Schweineplasmaproben kam eine fl./fl. Extraktion mit anschließender GC-MS-Messung zur Anwendung. Dabei wurden Nachweisgrenzen von 11 ng/mL bzw. 9 ng/mL für Daidzein und Genistein (DIN 32645) sowie WR von 72 - 121 % je nach Substanz und Konzentration erreicht. Die Präzisionen lagen bei 5 - 15 %. Die Analysen dieser Arbeit zeigten, daß bei Tieren unter Fütterung mit isoflavonfreiem Futter kaum Daidzein oder Genistein im Plasma zirkulierte, die Tiergruppe mit einer Isoflavonaufnahme von etwa 2,1 mg/kg KG dagegen 10- bis 20-fach höhere Plasmakonzentrationen aufwies. Der Mastversuch ergab ferner, dass eine mittlere Isoflavonaufnahme von ~180 mg/Tag während der Wachstumsphase bei Schweinen nicht zu signifikanten Veränderungen etlicher biologischer Parameter führte [Kuhn *et al.*, 2004, Arch Anim. Nutr. 58: 265-276].

Zur Abschätzung der Humanexpositionen gegenüber BPA, Daidzein und Genistein wurde eine weitere Methode auf der Basis einer Festphasenextraktion mit anschließender GC-MS Analyse etabliert, die eine simultane Bestimmung der Substanzen bzw. deren Metaboliten in kleinen Volumina von Urinproben ermöglicht. Durch Kaltaufgabe konnten die Nachweisgrenzen nochmals gegenüber den obigen GC-MS Methoden auf 3, 4, 4 und 5 ng/mL für BPA, Equol, Daidzein und Genistein verbessert werden. Die Wiederfindungsraten betragen je nach Substanz und Konzentrationsbereich 80 - 127 %; die Präzisionen zwischen den Serien lagen bei 10 % für BPA, 9 % für Daidzein, 15 % für Equol und 18 % für Genistein.

Mit Hilfe dieser Methode wurden in zwei Stichproben von jeweils 7 bzw. 8 Personen die in Spoturinen bzw. Sammelurinen ausgeschiedenen Mengen an BPA, Daidzein, Equol und Genistein ermittelt, um die Exposition bei üblicher deutscher Ernährungsweise abzuschätzen. In den 24 h Urinen wurden im Mittel 9 µg/Tag BPA, 98 µg/Tag Daidzein, 38 µg/Tag Equol und 102 µg/Tag Genistein bestimmt. Um auch die Spannweite der Isoflavonaufnahme zu untersuchen, wurde ferner der Urin eines Probanden nach isoflavonfreier Diät und nach Soja-

proteinbolus untersucht. Nach 52 h isoflavonfreier Ernährung wurden im Urin keine messbaren Isoflavonkonzentrationen mehr gefunden. Eine definierte Aufnahme von 12,9 mg Daidzein und 25,2 mg Genistein, die einer typisch asiatischen Exposition entspricht, führte zu hohen Konzentrationen Daidzein, Equol und Genistein im 24 h Urin, mit Wiederfindungen von 13 % der Dosis für Daidzein (bzw. 37 %, unter Berücksichtigung des Metaboliten Equol) und 6 % der Dosis für Genistein [Moors *et al.*, submitted to Molec. Nutr. Food Res.].

Die Anwendung der entwickelten Methoden liefert neue Beiträge zu einer vergleichenden toxikologischen Risikoabschätzung für die Umweltöstrogene BPA, Daidzein und Genistein, die sich wie folgt zusammenfassen lässt: (a) In Human-Urin ermittelte Konzentrationen lassen auf eine geringe Exposition gegenüber BPA und Phytoöstrogen-Isoflavonen bei einer typisch „westlichen“ Ernährungsweise schließen. Die Exposition gegen BPA ist aber deutlich (mehr als 10-fach) geringer als die gegen Isoflavone. Berücksichtigt man die unterschiedlich hohe Fraktion der Dosis, die renal ausgeschieden wird, sind die Unterschiede noch grösser. (b) Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen des Tierversuchs zur Kinetik von BPA und weitere von anderen durchgeführte Versuche mit BPA und Isoflavonen in Ratten zeigen, dass durch schnelle Metabolisierung und Ausscheidung nur ein Bruchteil der Substanzen unverändert im Organismus bioverfügbar sind. In Anbetracht der geringen östrogenen Potenz der Stoffe und der niedrigen Expositionen ist daher mit einer sehr geringen Gefährdung für den Menschen zu rechnen. Allerdings werden Kleinkinder, deren Phase II Metabolismus noch nicht voll entwickelt ist und die aufgrund einer speziellen Ernährung mit Sojaprodukten relativ hoch gegen Isoflavone exponiert sind, von einigen Gremien [CERHR 2006, COT 2003, SKLM der DFG 1998] als Risikogruppe angesehen.