

DIN NA 119-01-03-05-09 AK

Hormonelle Wirkung/Xenohormone

Zwischenbilanz und Relevanz für das Saarland

Dr. Christel Weins
Büro für wirkungsbezogene Analytik
Umwelt/Lebensmittel/Pharmazie
c.weins@weins.de

Motivation 2010

- Hormonähnlich wirkende Stoffe anthropogenen Ursprungs in der Umwelt (Xenohormone) können den natürlichen Hormonhaushalt von Lebewesen derart beeinträchtigen, dass deren **Reproduktion negativ beeinflusst** wird. Populationsrelevante Störungen können die Folge sein.
- In regulatorischer Hinsicht wurden bereits Maßnahmen mit dem Ziel ergriffen, negative Auswirkungen von Xenohormonen auf die Umwelt zu minimieren. Es wurden beispielsweise **Umweltqualitätsnormen** (UQN) für prioritäre Stoffe eingeführt, von denen einige in begründetem Verdacht stehen, hormonähnlich zu wirken.
- Hormonähnlich wirkende Stoffe werden diffus und über Punktquellen in die Gewässer emittiert. Zumindest für rezeptorgekoppelte Wirkungen ist eine **additive** Mischungstoxizität anzunehmen. Daher ist die alleinige Abbildung und **Kontrolle des Risikos über UQN nicht ausreichend**.
- Zur Komplementierung der Risikobewertung und zum Monitoring von Emissionen von Chemikalien mit Kombinationswirkung wie rezeptoraktivierende Xenohormone sollten Biotestverfahren eingesetzt werden. **Bisher existiert allerdings kein zertifiziertes Testverfahren für den aquatischen Bereich.**

Der Auftrag des DIN AKs

Bund-Länder erteilten Auftrag an den Normungsausschuss Wasserwesen (NAW), eine DIN Norm zu entwickeln für ein Messverfahren für hormonelle Wirkung speziell für Abwässer aus Kläranlagen.

Möglicherweise werden Ergebnisse dazu führen, dass die 4. Reinigungsstufe eingeführt wird.

Testverfahren

Bestimmung rezeptoraktivierender Xenohormone

- **Humane Zelllinien**

- E-Screen Proliferationstest mit einer humanen Brustkrebszelllinie (MCF-7)
- Human in vitro ER reporter gene assay (niederländische Methode,)

- **Transformierte Hefezellen**

- Yeast Estrogen Screen (YES) nach Routledge und Sumpter In vitro
- p-YES Test nach Routledge und Sumpter
Wirkungsbezogene Analytik (immobilisierte Probe)
- A-Yes Test (patentiert von Quo Data)

Testverfahren

Bestimmung rezeptoraktivierender Xenohormone

- **Humane Zelllinien**

- E-Screen Proliferationstest mit einer humanen Brustkrebszelllinie (MCF-7)
- Human in vitro ER reporter gene assay (niederländische Methode,)

- **Transformierte Hefezellen**

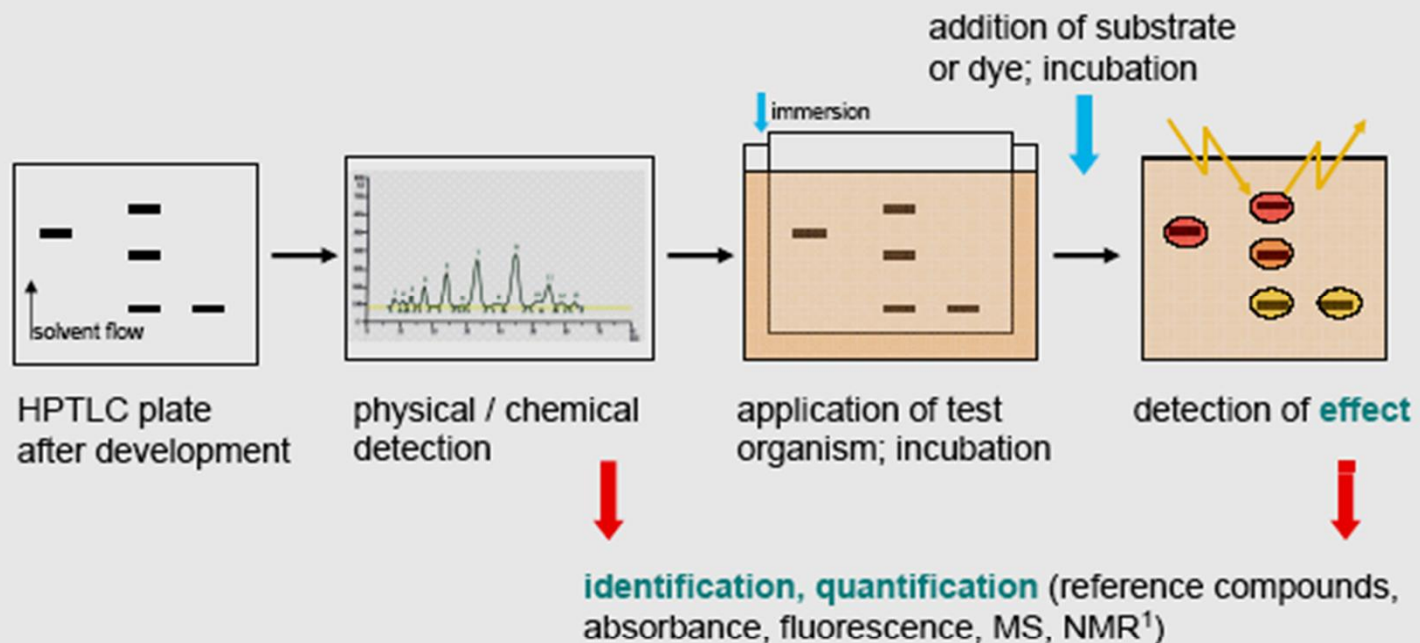
- Yeast Estrogen Screen (YES) nach Routledge und Sumpter In vitro
- p-YES Test nach Routledge und Sumpter
 - Wirkungsbezogene Analytik (immobilisierte Probe)
- A-Yes Test (patentiert von Quo Data)

Prinzip der wirkungsbezogenen Analytik

- **Schritt 1:** Bioaktive Stoffe werden auf der stationären Phase durch planare Flüssigkeitschromatographie nach Polarität getrennt
- **Schritt 2:** Verdampfen der mobilen Phase
- **Schritt 3:** Immobilisierung des Testorganismus auf der stationären Phase unter optimalen Kultivierungsbedingungen für den Testorganismus, Induktion des Zielenzyms im Testorganismus
- **Schritt 4:** Optimierte Bedingungen für den enzymatischen Umsatz eines selektiven Substrats (pH, Puffer,..)
- **Schritt 5.** Optimierte Bedingung für die Detektion des enzymatisch gebildeten Produktes

p-Yes Test

Schema der wirkungsbezogenen Analytik



- ➔ Screening methods for detection of bioactive compounds in complex mixtures
- ➔ Pharmaceutical research¹, environmental analysis^{2, 3}

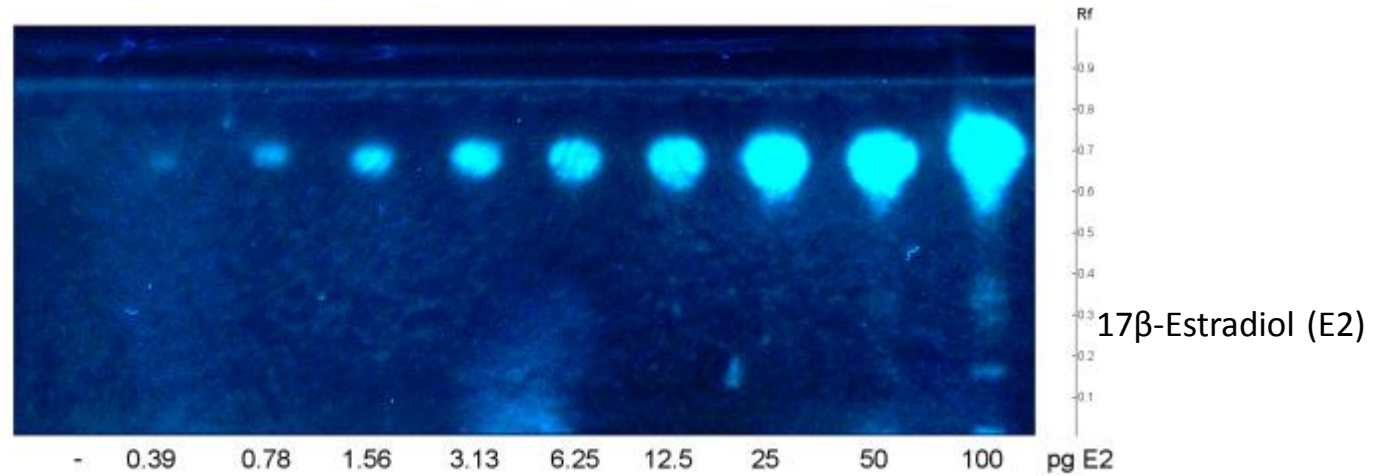
¹ Hostettmann et al. *Phytochem. Anal.* 1991, 2, 199-203.

² Weins, C.; Jork, H. J. *Chromatogr. A* 1996, 750, 403-407. ³ Eberz, G. et al. *Chromatographia* 1996, 43, 5-9.

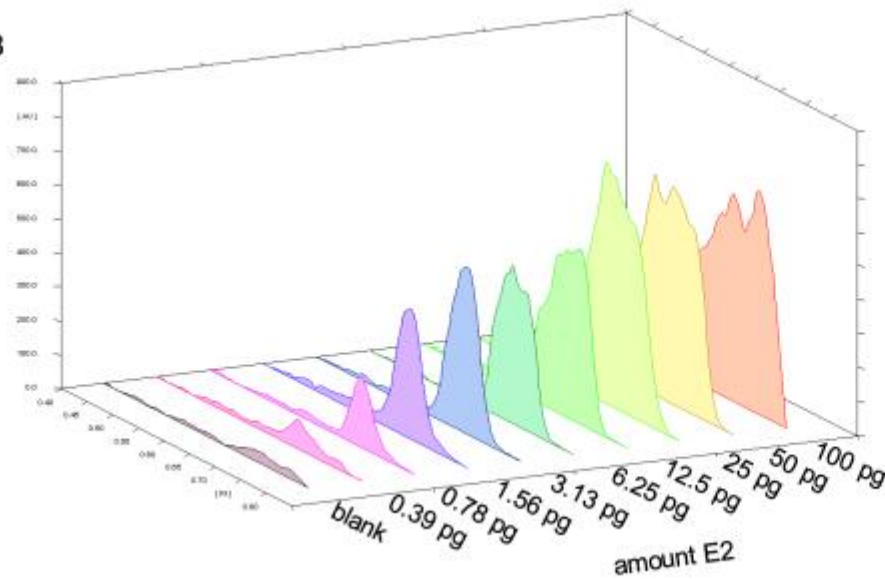
p - YES Test

Quantifizierung

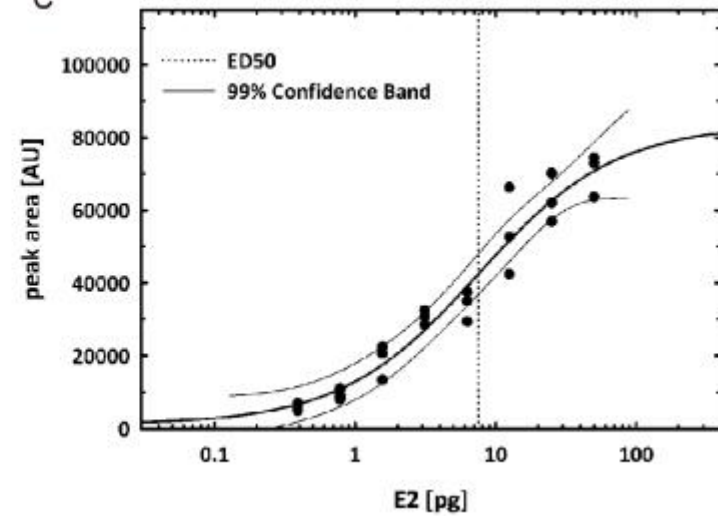
A



B



C



p - YES Test

Quantifizierung

Amount [pg/zone]

1250 – 25

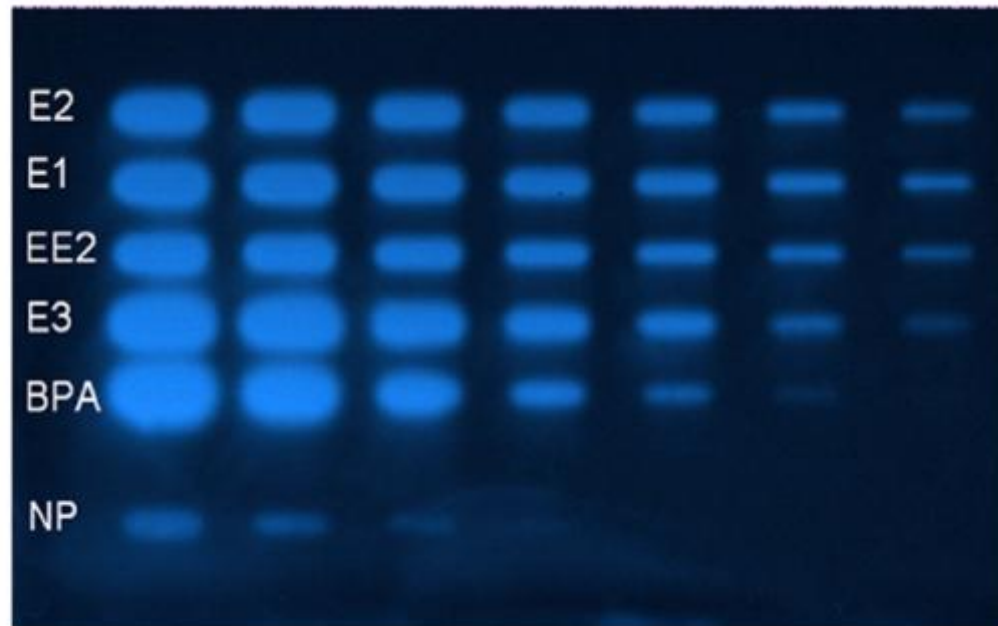
15×10^3 – 0.3×10^3

1250 – 25

62.5×10^3 – 1.25×10^3

1250×10^3 – 25×10^3

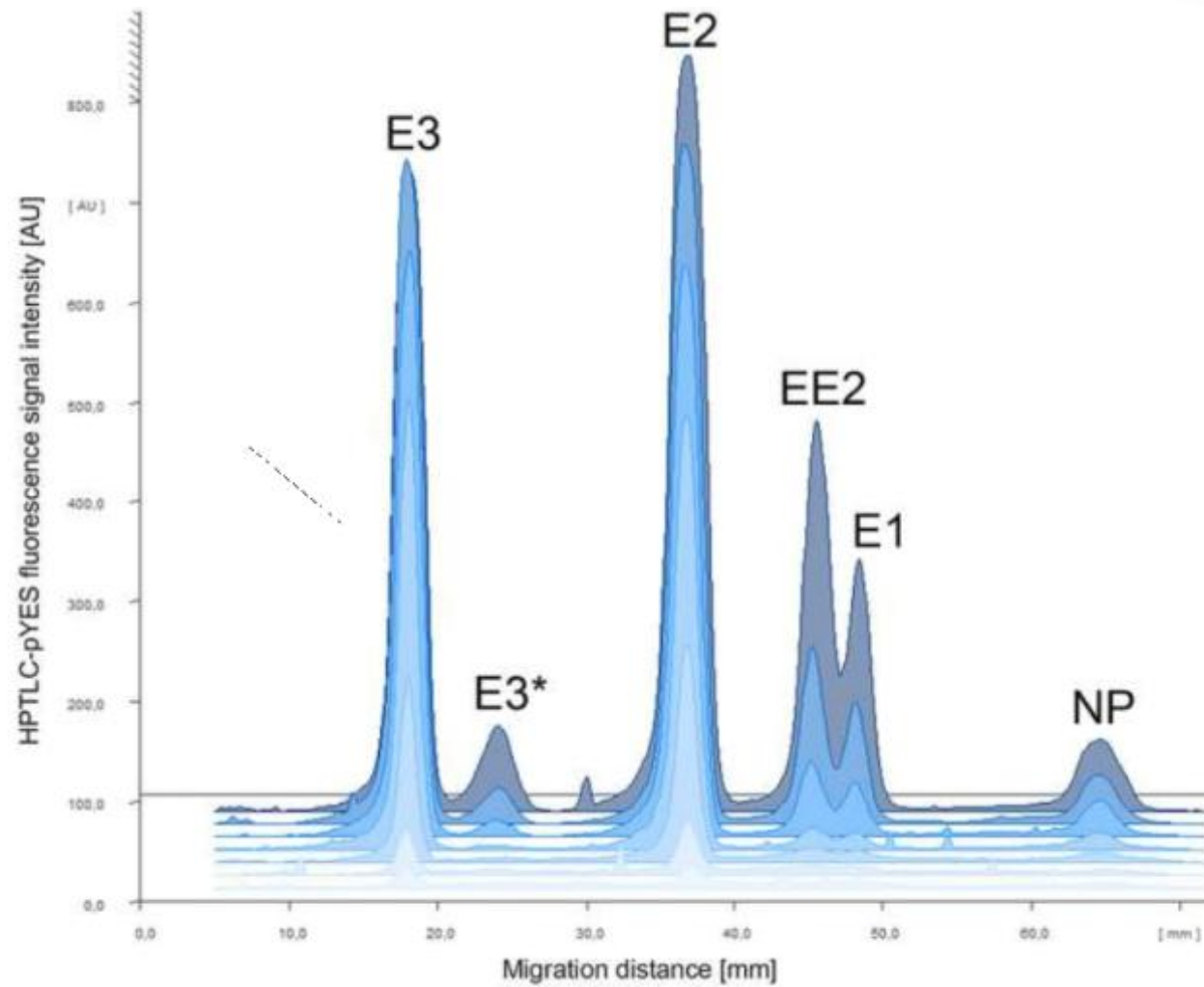
312.5×10^3 – 6.25×10^3



Klingelhöfer & Morlock 2014

p - YES Test

Quantifizierung



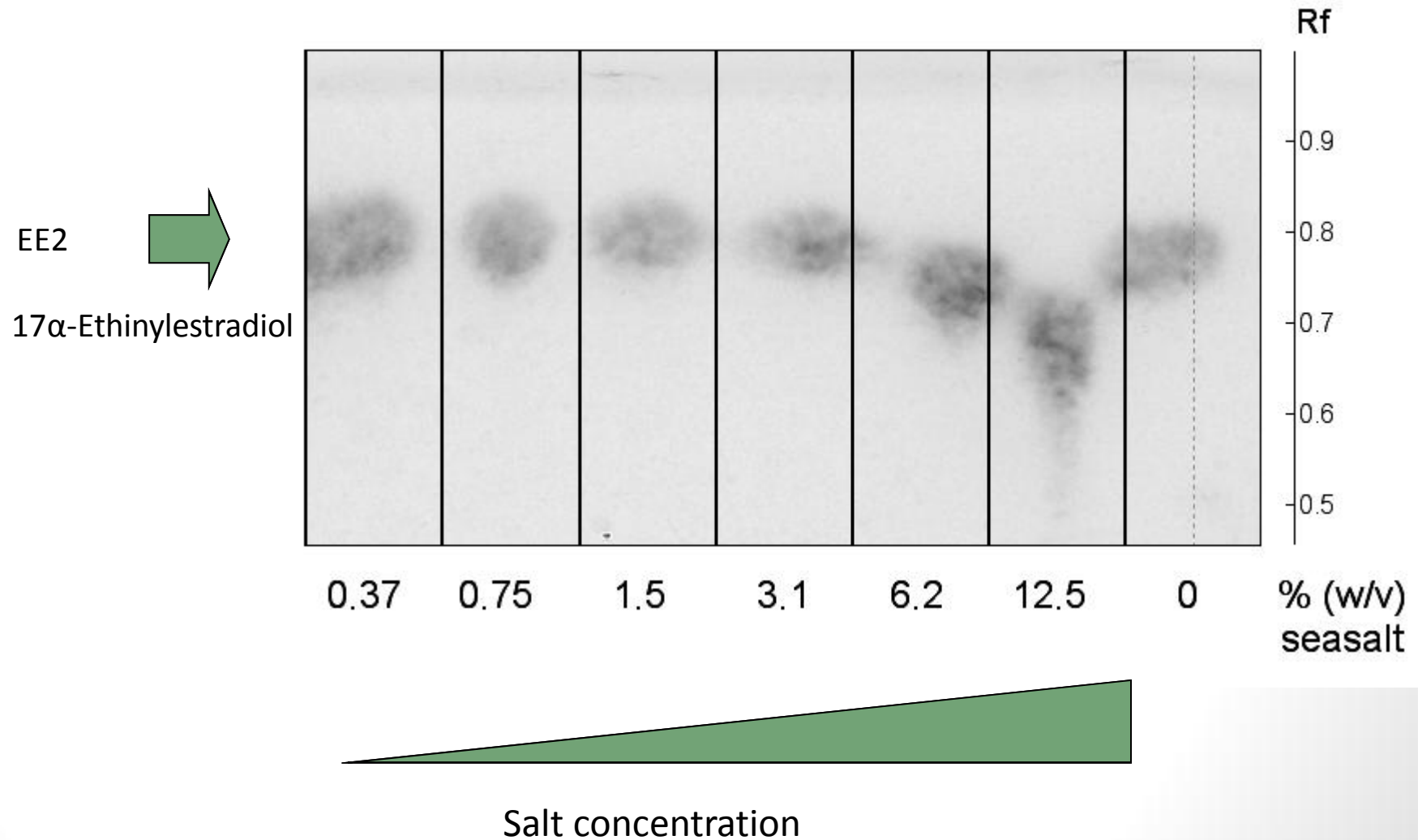
Derzeitiger Stand und weiteres Vorgehen

Argumente für eine internationale NORM (ISO Standard)

- Störung durch die Matrix werden eliminiert
- Proben mit hohen Salzgehalten und Störstoffen können analysiert werden
- Die Reduzierung der Testzeit von 72 auf < 4 h
- die derzeitige Nachweisgrenze liegt bei **0,5 pg**
- Erste Ergebnisse mit Realproben liegen vor

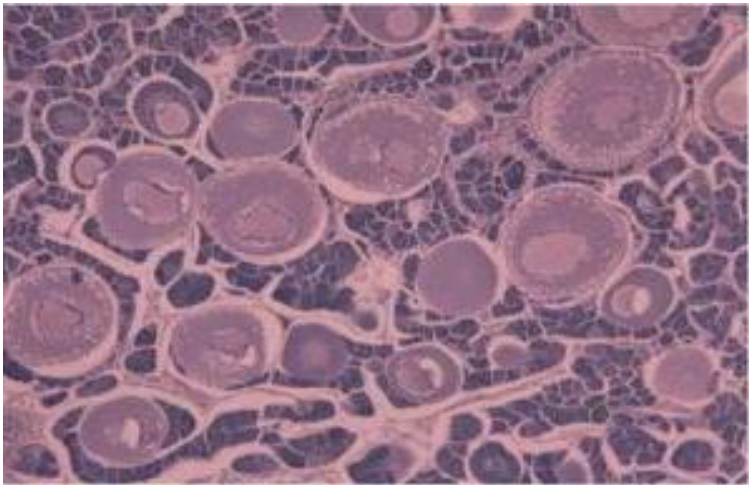
p- YES Test

Salz Toleranz



Wirkungsuntersuchungen beim Brassen (Vitellogenin)

Als endokrine Disruptoren gelten Chemikalien, die die Verweiblichung von Fischen beeinflussen können.

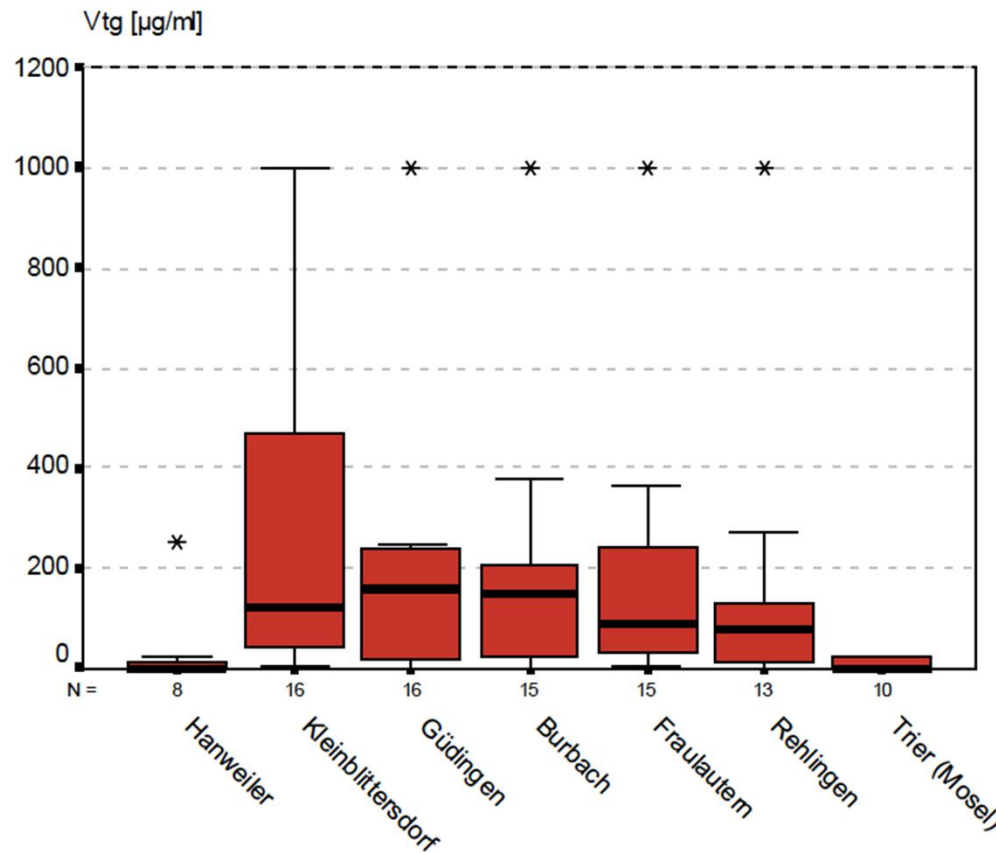


Vitellogenine (lat. *vitellum*, *Dotter*) im Allgemeinen sind Proteine, die von Tieren als Vorläufer für Lipoproteine und Phosphoproteine produziert werden. Der Nachweis von Vtg in männlichen Brassen, welche diese Vorlaufersubstanz der Dotterproteine natürlicherweise nicht bilden, wird als sicherer Hinweis auf die Anwesenheit von endokrin wirksamen Substanzen in der Umwelt angesehen.

Mittelwerte der Vtg - Gehalte in männlichen Brassern

Fluss	PNF	n	Vtg [$\mu\text{g/ml}$] MW \pm ST
Saar	Güdingen	19	26,0 \pm 37,4
	Rehlingen	6	37,0 \pm 74,8
Rhein	Weil	12	1,0 \pm 2,0
	Iffezheim	5	< Nachweisgrenze
	Koblenz	12	< Nachweisgrenze
	Bimmen	4	< Nachweisgrenze
Elbe	Prossen	11	< Nachweisgrenze
	Zehren	7	< Nachweisgrenze
	Barby	9	< Nachweisgrenze
	Cumlosen	8	7,5 \pm 19,7
	Blankenese	14	< Nachweisgrenze
Saale	Wettin	8	< Nachweisgrenze
Mulde	Dessau	11	20,3 \pm 33,7
Donau	Ulm	11	< Nachweisgrenze
	Kelheim	13	28,4 \pm 54,8
	Jochenstein	10	7,5 \pm 22,7

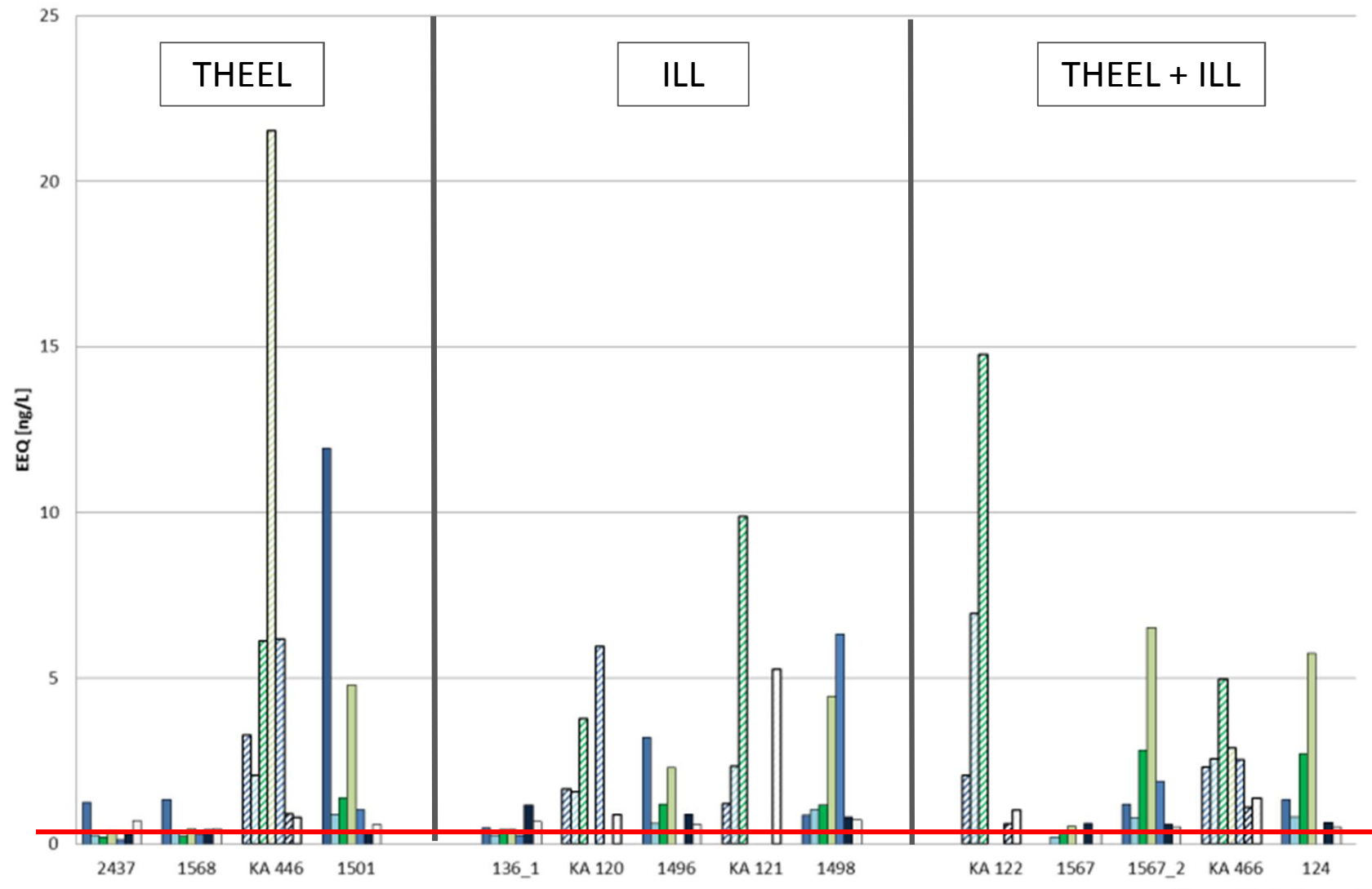
Mittelwerte der Vtg - Gehalte in männlichen Brassern



Ergebnisse der Vtg-Analyse [$\mu\text{g/ml}$] in Brassern der Saar (BARTEL et al. 2002)

“Bei Betrachtung der männlichen Tiere ist hinsichtlich der gemessenen Vtg-Gehalte an den Probenahme­flächen Gündingen, Rehlingen und Mulde (Dessau) von einer Exposition gegenüber östrogen wirksamen Substanzen auszugehen.“

Estrogene Gesamtaktivität (E-Screen)



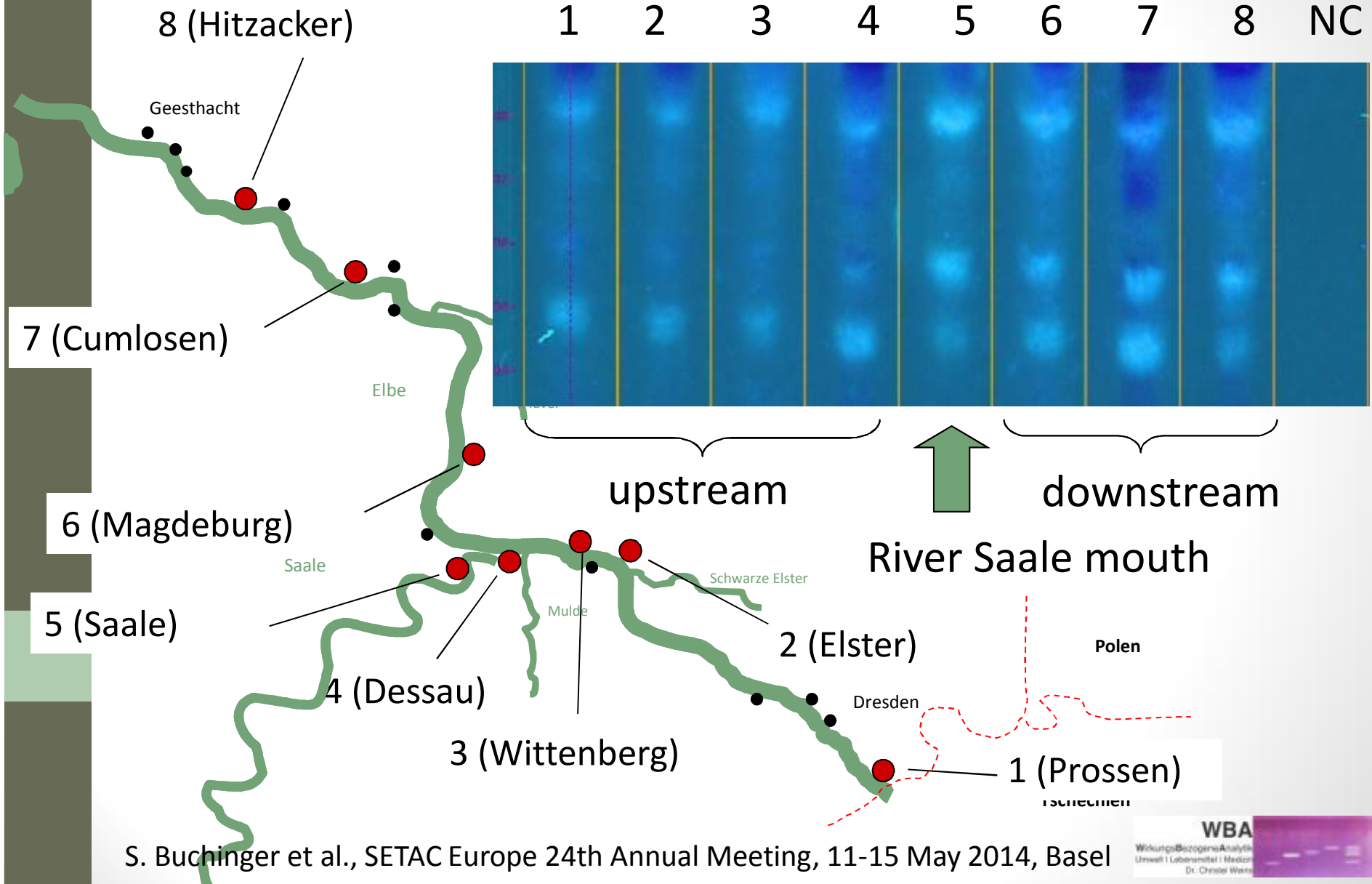
■ 11.02.2014 ■ 04.03.2014 ■ 25.03.2014 ■ 15.04.2014
 ■ 19.05.2014 ■ 07.07.2014 ■ 21.07.2014 ■ 12.08.2014

Dr. Bertram Kuch und Claudia Lange, University Stuttgart, Germany



p- YES Test

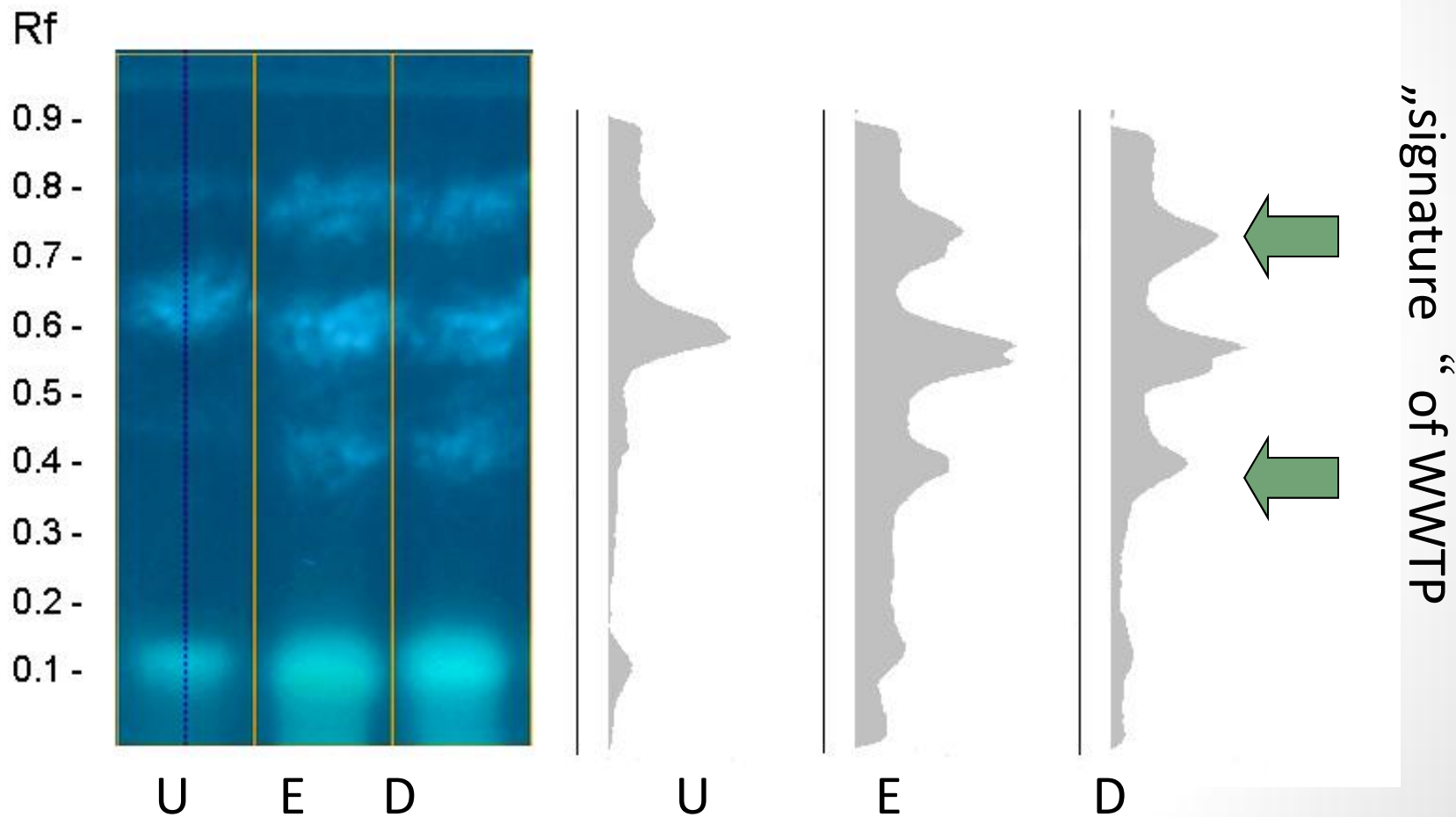
Beispiele für Sedimente



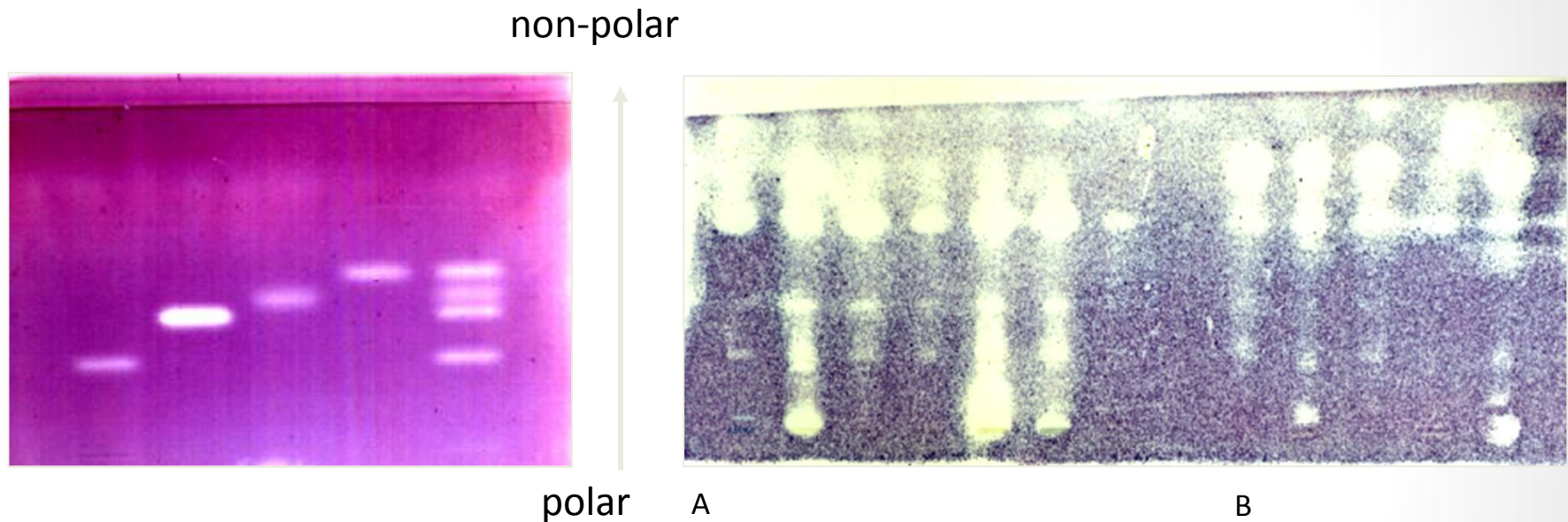
p- YES Test

Abwasser und Oberflächengewässer

10 µl SPE-Extract: 1000-fach konzentriert (U: upstream, E: effluent, D: downstream)



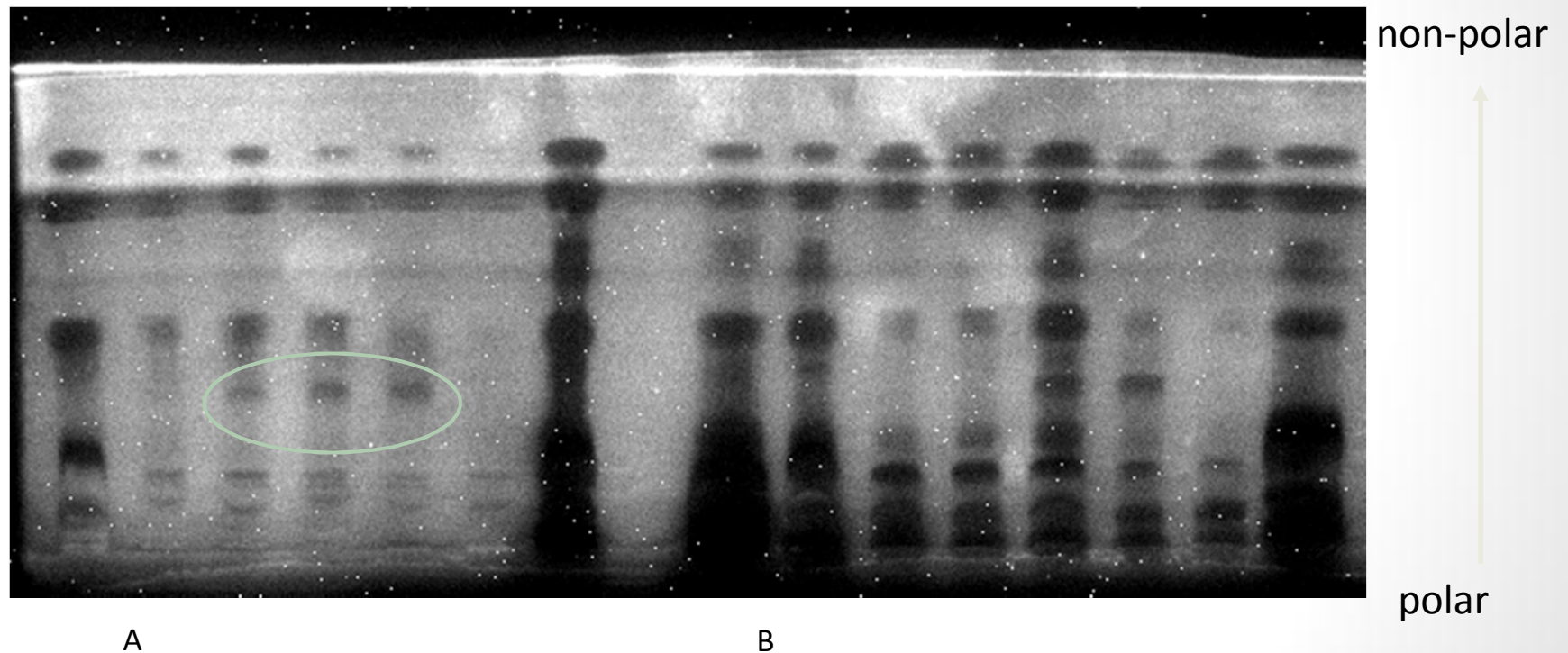
Detektion von Cholinesterase-Hemmstoffen und Antibiotika



Chromatogram of organophosphates:
Paraoxon-Methyl 0.4 ng/line, Paraoxon-Ethyl 2 ng/line, Naled 0.4 ng/line, Dichlorvos 2 ng/line), stationary phase HPTLC KG 60 F254, mobile phase THF-n-Hexan: 7:25 v/v, detection cholinesterase

Chromatogram of surface water extractions:
stationary phase HPTLC KG 60 F254 Gradient: Automated Multiple Development (AMD) MeOH, CH₂Cl₂, enrichment A 1:1000 (SPE RP18) and B 1:200 (freeze drying),
Detection bacillus subtilis

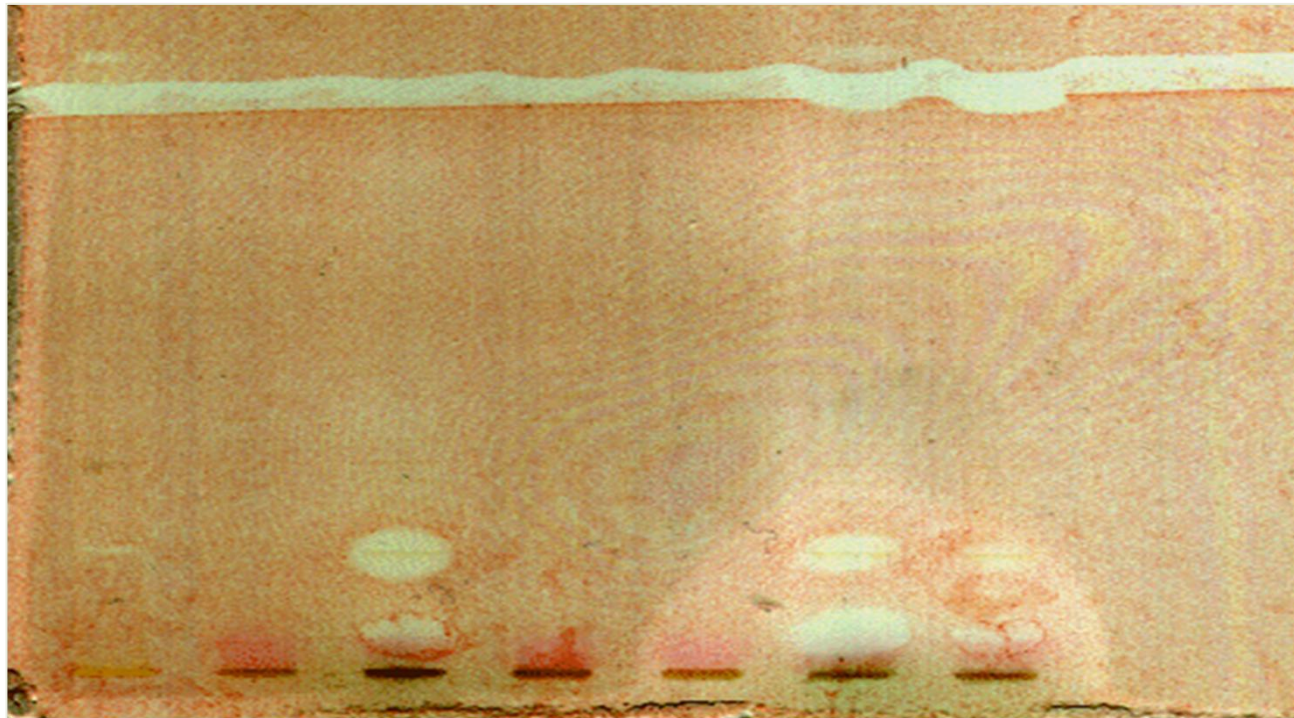
Detection von Inhibitoren der Leuchtbakterien in einem Oberflächengewässer



Chromatogram of surface water extractions:

stationary phase HPTLC KG 60 F254 Gradient: Automated Multiple Development (AMD) MeOH, CH₂Cl₂, enrichment A 1:200 (freeze drying) and B 1:1000 (SPE RP18), Detection vibrio fischerii

Detektion von Fungiziden in einem Gewässerprofil



non-polar



polar

Chromatogram of surface water extractions:
stationary phase HPTLC KG 60 F254 Gradient: Automated Multiple Development (AMD) MeOH, CH₂Cl₂,
1:1000 (SPE RP18), Detection Ruduturula rubra

Maßnahmen mit positiven Ergebnissen für die Zukunft

Vor der Investition von Millionen Euros in Projekte, die die natürliche Biodiversität erhalten sollen – erscheint neben der Verringerung des Stoffeintrags auch eine wirkungsbezogene Prozesskontrolle sinnvoll!!.



Prozesskontrolle durch eine wirkungsbezogene Analytik ist unabdingbar



Renaturierung der Theel

„Schönteich“ der KA Sotzweiler

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit

