

Wirkungsbezogene Analytik am Beispiel östrogen wirksamer Stoffe in Wasser

- Probleme - Interpretation - Auswertung

Wirkungsbezogene Analytik am Beispiel östrogen wirksamer Stoffe in Wasser

Probleme – Interpretation - Auswertung

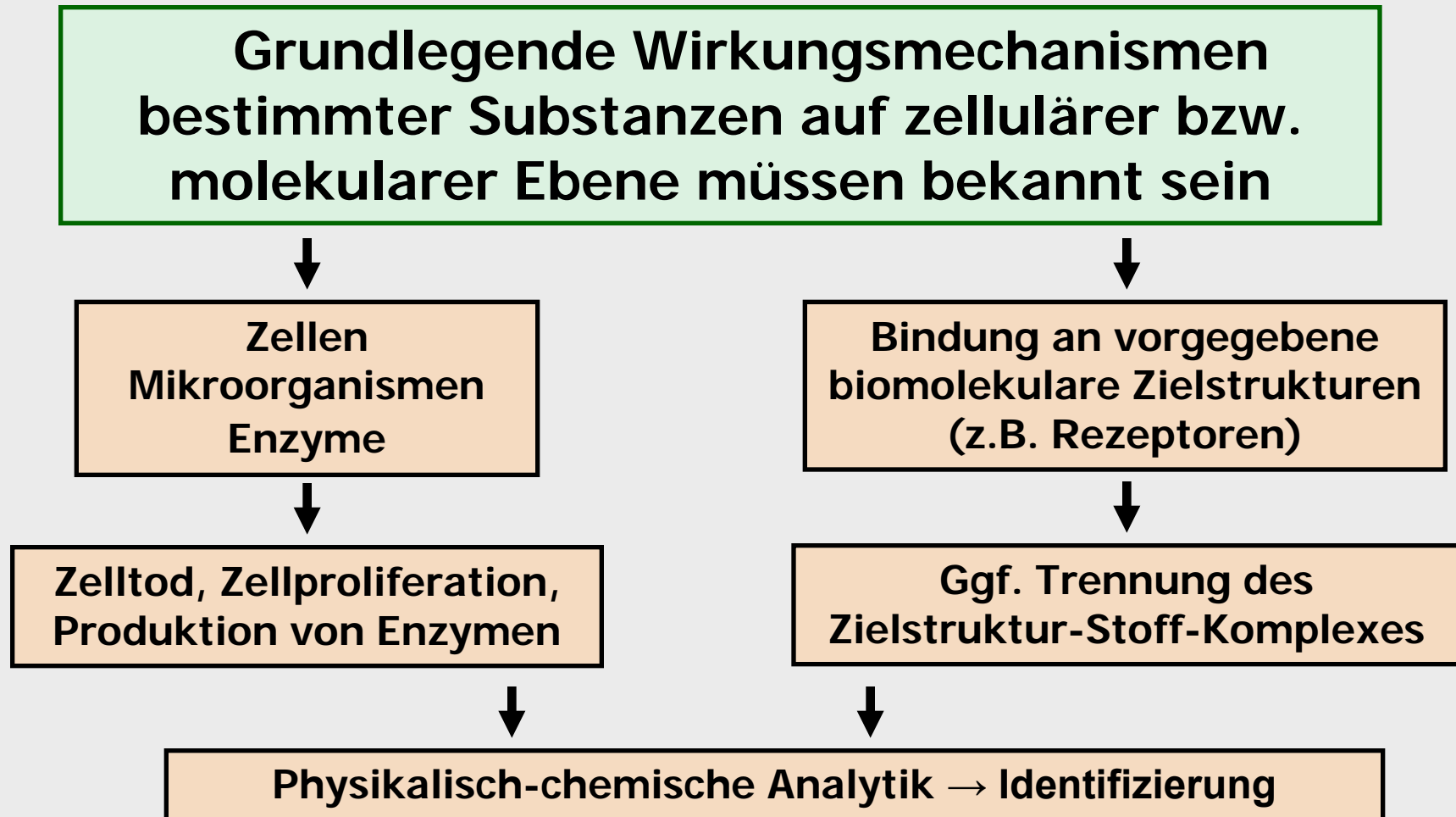
Dr. Gabriele Böhmeler
Lebensmittelinstitut Braunschweig



Inhalt des Vortrags

- **Grundprinzip und Anwendungsbereiche der wirkungsbezogenen Analytik**
- **Östrogen wirksame Substanzen in Wasser**
 - Vorstellung eigener Untersuchungsergebnisse
 - Vergleich mit anderen Studien
- **Probleme**
- **Aufgaben für die Zukunft**

Grundprinzip



Anwendungsbereiche

- **Wirkungsorientierter Ansatz (non-target-Analyse)**
Detektion eines bestimmten Effektes als Summenparameter,
z.B. estrogen, cytotoxisch, Ah-rezeptorvermittelte Wirkung
- **Substanzorientierter Ansatz (target-Analyse)**
Detektion einer oder weniger Substanzklasse(n),
deren Wirkung bekannt ist,
z.B. gezielter Nachweis von Dioxinen/Furanen

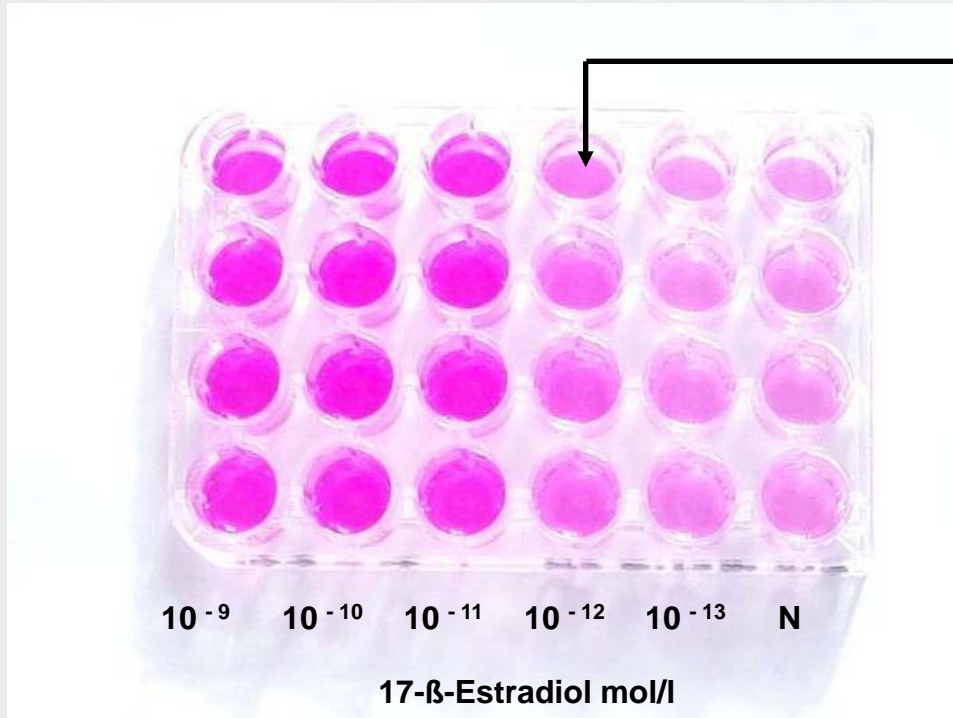
Inhalt des Vortrags

- **Grundprinzip und Anwendungsbereiche der wirkungsbezogenen Analytik**
- **Östrogen wirksame Substanzen in Wasser**
 - **Vorstellung eigener Untersuchungsergebnisse**
 - **Vergleich mit anderen Studien**
- **Probleme**
- **Aufgaben für die Zukunft**

E-Screen (Estrogen-Screen)

- *In-vitro* Testverfahren
- **Humane Brustkrebszellen (MCF-7-Zellen)**
 - nicht artifiziell verändert
 - **Ursprung: Frauenuniversitätsklinik Tübingen**
 - **von verschiedenen Autoren verwendet**
 - **nachweislich hohe Sensitivität und Stabilität**
- **Proliferationsrate der Zellen im Vergleich zu einer Negativ- bzw. Positivkontrolle wird ermittelt**





Geringste sicher erkennbare
Standardkonzentration
(0,27ng/l 17-β-Estradiol = E2)

**Ergebnis wird als Relativer Proliferationseffekt (RPE)
angegeben:**

$$\text{RPE} = [\text{PE} - 1 (\text{Testsubstanz}) / \text{PE} - 1 (\text{E2})] \times 100 \%$$

Bewertung der Ergebnisse

- **RPE > 14 %: Positives Ergebnis**

- Wiederholte Aufarbeitung und Dreifachmessung im E-Screen
- Co-Inkubation mit dem Östrogenrezeptor-Antagonisten Tamoxifen

- **RPE 11% - 14 %: Verdächtiges Ergebnis**

- Wiederholte Aufarbeitung und Dreifachmessung im E-Screen
- Ggf. Co-Inkubation mit dem Östrogenrezeptor-Antagonisten Tamoxifen

- **RPE < 11 %: Negatives Ergebnis**

Untersuchung von Wasserproben

2004/2005

Untersuchung von Trinkwasser sowie
verpacktem Mineralwasser aus dem Einzelhandel

2005

Untersuchung von Rohwasser und dazu-
gehörigem verpacktem Mineralwasser, das
2004/2005 als östrogen wirksam beurteilt wurde

2007

Erneute Probenahme der positiv
getesteten Rohwässer mit dem Ziel der
Identifizierung der verantwortlichen
Substanz

Zusammensetzung der Proben (2004/2005)



	Verpackung	Summe
Trinkwasser	/	7
Mineral- und Tafelwasser	PET	27
	Combibloc	8
	Glas	2
Summe	/	44

Ergebnisse



Probe	negativ	verdächtig	positiv	Summe
Trinkwasser	7	0	0	7
PET	20	0	7	27
Combibloc	7	1	0	8
Glas	1	0	1	2
Summe	35	1	8	44



Mögliche Ursachen

- **Verpackung (PET, Dichtungen)**
- **Reinigungsmittelreste in den Verpackungen**
- **Rohrsysteme**
- **Pumpensysteme**
- **Rohwasser**



Untersuchung von Wasserproben

2004/2005

Untersuchung von Trinkwasser sowie
verpacktem Mineralwasser aus dem Einzelhandel

2005

Untersuchung von Rohwasser und dazu-
gehörigem verpacktem Mineralwasser, das
2004/2005 als östrogen wirksam beurteilt wurde

2007

Erneute Probenahme der positiv
getesteten Rohwässer mit dem Ziel der
Identifizierung der verantwortlichen
Substanz

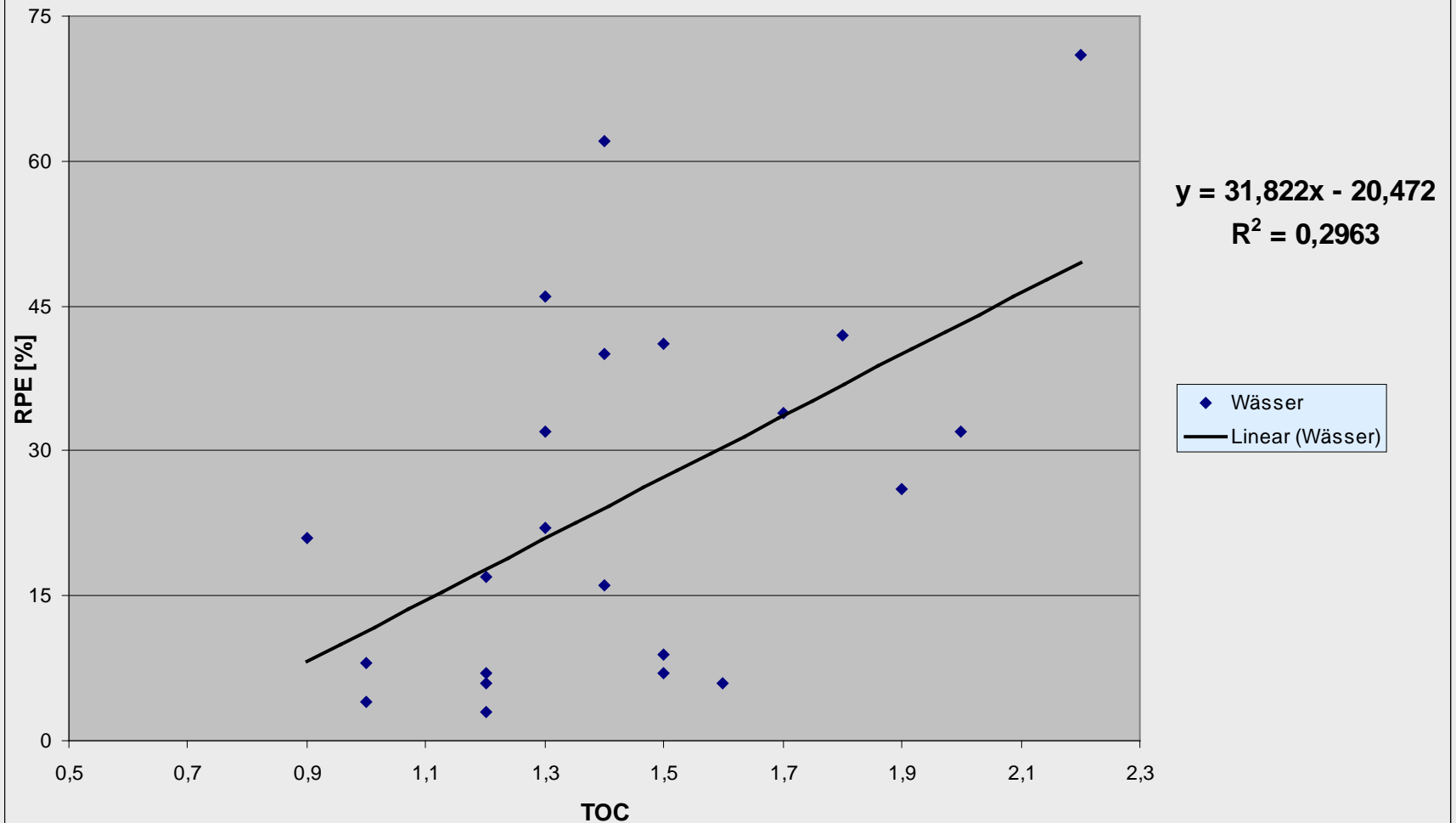
Nachweis östrogen wirksamer Substanzen



Pr.	Rohwasser (RPE % ± s)	TOC	Verpackte Probe (RPE % ± s)	TOC	
1, 2	Brunnen 1	42 ± 14	1,8	Probe 1: 16 ± 3 (PET)	1,4
	Brunnen 2	32 ± 8			
	Brunnen 3	8 ± 6	1,0	Probe 2: 22 ± 3 (PET)	1,3
	Brunnen 4	6 ± 5	1,2		
	Brunnen 5	17 ± 10	1,2		
	Brunnen 6	7 ± 4	1,2		
3	Brunnen 7	22 ± 11	-	26 ± 8 (Glas, transparent)	1,9
4	Brunnen 8	6 ± 2	1,6	Charge 1: 7 ± 3 (Grünglas)	1,5
	Brunnen 9	4 ± 1	1,0	Charge 2: 9 ± 2 (Grünglas)	1,5
5	Brunnen 10	46 ± 5	1,3	34 ± 5 (PET)	1,7
6	Brunnen 11	62 ± 20	1,4	40 ± 8 (PET)	1,4
7	Brunnen 12	32 ± 4	1,3	41 ± 8 (PET)	1,5
8 ¹⁾	-			Verpackt 1 3 ± 3 (PET)	1,2
	-			Verpackt 2 21 ± 13 (PET)	0,9
	-			Verpackt 3 71 ± 11 (PET)	2,2

¹⁾ Mineralwasser desselben Herstellers aus unterschiedlichen Quellen in denselben Verpackungen

Vergleich RPE mit TOC in Wässern



Anstieg der östrogenen Aktivität nach Lagerung

Probe	Verpackte Probe (RPE % \pm s)
4	Charge 1: 7 \pm 3 (Grünlas) Charge 2: 9 \pm 2 (Grünlas)



Lagerung für 6,5 Monate

Probe	Verpackte Probe (RPE % \pm s)
4	Charge 1: 28 \pm 8 (Grünlas) Charge 2: 21 \pm 6 (Grünlas)

Fazit

- **Überwiegend ist bereits in den Rohwässern eine östrogene Wirksamkeit nachzuweisen**
- **Keine lineare Beziehung zwischen RPE und TOC vorhanden**
- **Ein Übergang von östrogen wirksamen Substanzen von den Verpackungen scheint lediglich bei der Probe 4 eine bedeutende Rolle zu spielen**

Untersuchung von Wasserproben

2004/2005

Untersuchung von Trinkwasser sowie
verpacktem Mineralwasser aus dem Einzelhandel

2005

Untersuchung von Rohwasser und dazu-
gehörigem verpacktem Mineralwasser, das
2004/2005 als östrogen wirksam beurteilt wurde

2007

Erneute Probenahme der positiv
getesteten Rohwässer mit dem Ziel der
Identifizierung der verantwortlichen
Substanz

Chemisch-physikalische Analytik

Gezielte Untersuchung auf bekannte Xenoöstrogene (mit separater Aufarbeitung)

- Pestizide - HPLC
 - Phthalate - HPLC
 - Nonylphenol – GC/MS
 - Bisphenol A – GC/MS
 - PFT – LC-MS/MS (LAVES – VI H)
 - Ethinylestradiol – LC-MS/MS (LAVES - VI OL)
- LAVES – LI BS
- Universität Dortmund

Gezielte Untersuchung auf bekannte Xenoöstrogene anhand der exakten Massen

(Verwendung der Extrakte aus dem LI BS)

- Q-TOF-HPLC-MS (Forschungslabor Langenau)
- GC Twister (TU BS/LAVES)

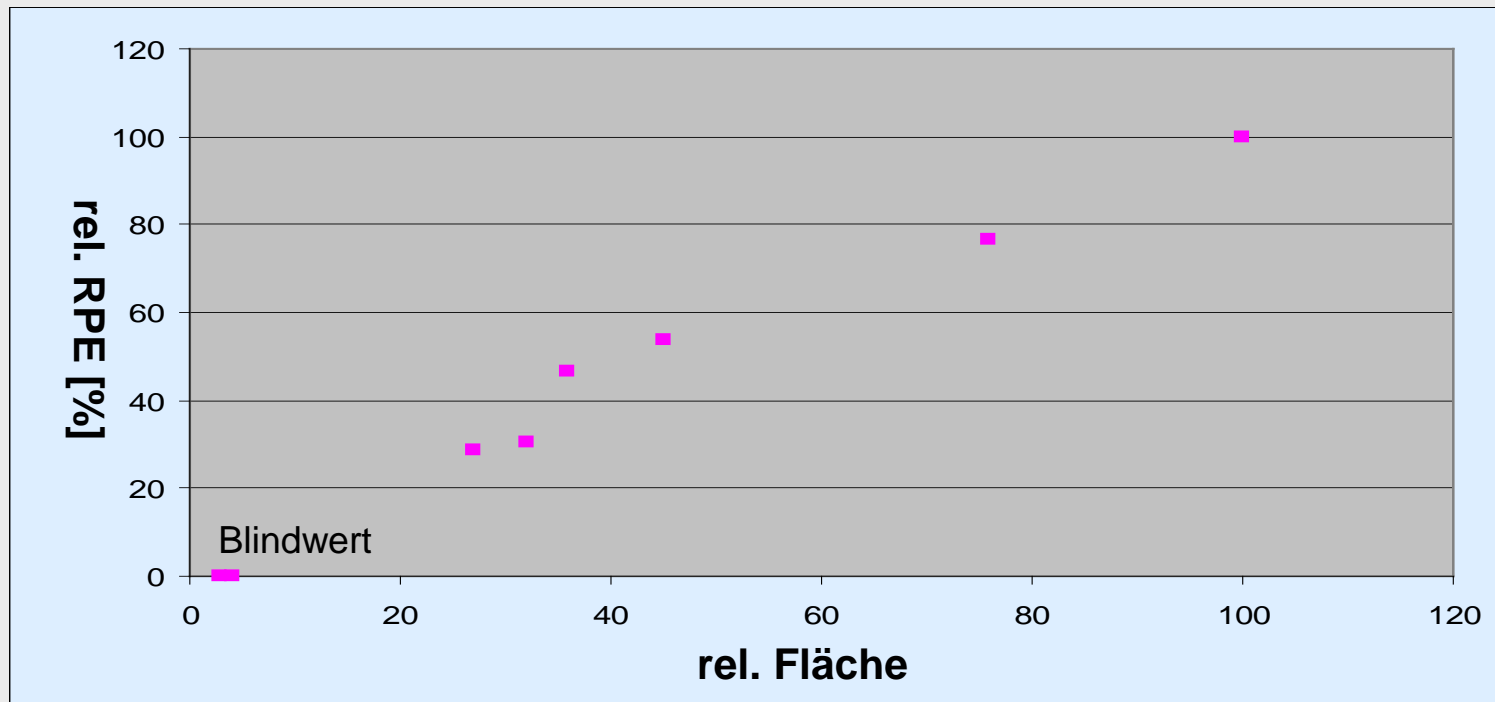
Fraktionierung der Extrakte mit anschließender Untersuchung im E-Screen

Q-TOF-HPLC-MS

- Eine Kooperation mit dem Betriebs- und Forschungslaboratorium des Zweckverbandes Landeswasserversorgung in Langenau
- Zur Auswertung wurde anhand verschiedener Literaturstellen eine Liste mit östrogen wirksamen Stoffen und deren Molekülmassen erstellt.
- Diese Liste enthielt folgende Substanzklassen:
 - **Insektizide/Fungizide/Herbizide**
 - **Steroidhormone und synthetische Estrogene**
 - **Phytoestrogene**
 - **östrogen wirksame Medikamente**
 - **Phthalate**
 - **Umweltchemikalien (Nonylphenol, Bisphenol A etc.)**

Q-TOF-HPLC-MS

- Aus den Messungen ergab sich eine Korrelation zwischen den RPE der Quellwässer und der Konzentration einer Substanz mit der **exakten Masse von $m/z = 221,154$**



Verhältnis zwischen den Flächen der Massenpeaks zu den RPE bei der Masse $m/z 221,154$

Inhalt des Vortrags

- **Grundprinzip und Anwendungsbereiche der wirkungsbezogenen Analytik**
- **Östrogen wirksame Substanzen in Wasser**
 - Vorstellung eigener Untersuchungsergebnisse
 - **Vergleich mit anderen Studien**
- **Probleme**
- **Aufgaben für die Zukunft**

Vergleich mit anderen Studien

Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit dem Nachweis östrogen wirksamer Substanzen in Mineralwasser

- **Böhmler et al. , LAVES, LI Braunschweig (2006)**
- **Pinto und Reali, Universität Pisa (2008)**
- **Wagner und Oehlmann, Universität Frankfurt (2009)**
- **Kuch, Universität Stuttgart (2009)**

Methodenvergleich

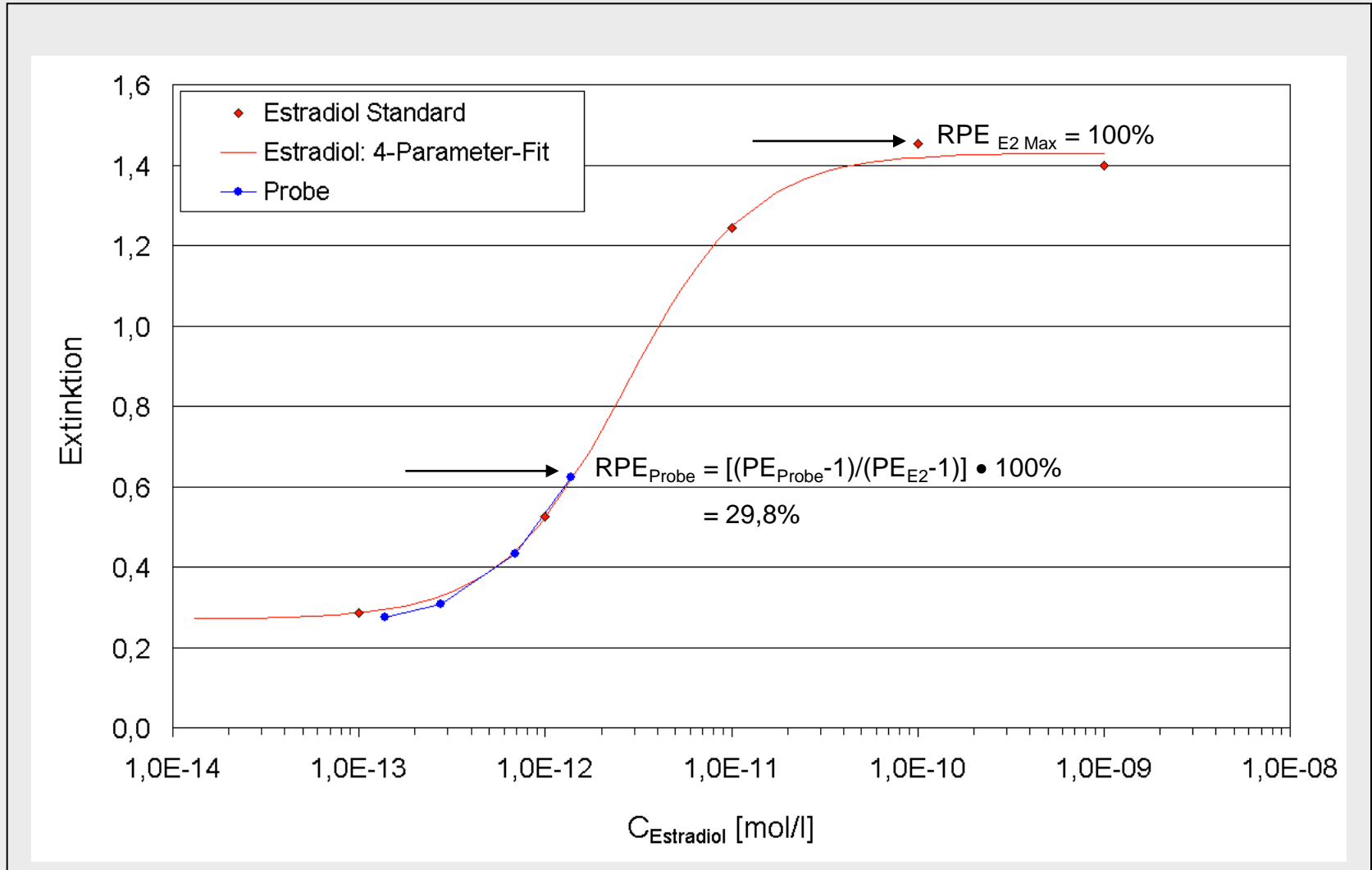
Arbeitsgruppe	Aufarbeitung	Testsystem	Auswertung
LAVES	Festphasen- extraktion (C18) 1 Liter	E-Screen (24-well) (MCF-7-Zellen*) Proliferationsassay 4 Konz.stufen (max. 20fach)	Qualitativ (RPE in %)
Univ. Pisa	Festphasen- extraktion (C18) 1,5 Liter	Gentechnisch veränderte Hefezellen (<i>S. cerevisiae</i> RMY326) β-Galaktosidase-Aktivität 2 Konz.stufen (max. 200fach)	Qualitativ (RIE in %) und quantitativ (EEQ in ng/l)
Univ. Frankfurt	Direkter Einsatz des Wassers ohne Aufarbeitung	Gentechnisch veränderte Hefezellen β-Galaktosidase-Aktivität 1 Konz.stufe (1,6fach verdünnt)	Quantitativ (EEQ in ng/l)
Univ. Stuttgart	Festphasen- extraktion (C18) 1 Liter	E-Screen (96-well) (MCF-7-Zellen*) Proliferationsassay 9 Konz.stufen (max. 200fach)	Quantitativ (EEQ in ng/l)

* Zellen desselben Ursprungs

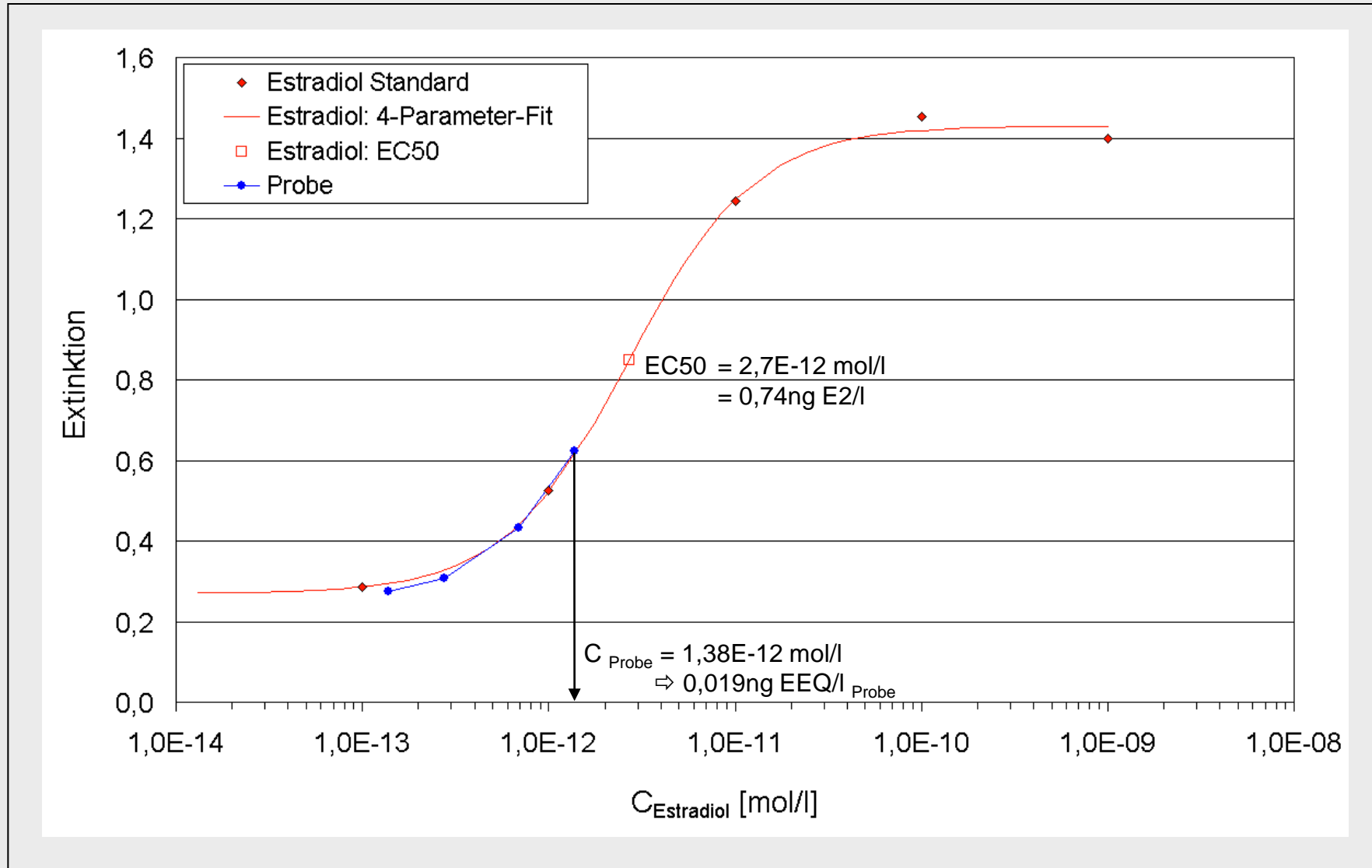
Methodenvergleich

AG	Auswertung
LAVES	<p><u>Qualitativ</u> (Relativer Proliferationseffekt in %)</p> $\text{RPE} = [\text{PE} - 1 (\text{Testsubstanz}) / \text{PE} - 1 (\text{E2})] \times 100 \%$
Univ. Pisa	<p><u>Qualitativ</u> (Relative inductive efficiency in %)</p> $\text{RIE} = [\text{max. } \beta\text{-Galactosidaseaktivität (Probe)} / \beta\text{-Galactosidaseaktivität (10nM } 17\beta\text{-Estradiol)}] \times 100 \%$ <p><u>Quantitativ</u> (EEQ in ng/l)</p> <p>Anpassung der Messwerte an die Estradiol-Standardkurve (Mittel aus 14 Standardkurven)</p>
Univ. Frankfurt	<p><u>Quantitativ</u> (EEQ in ng/l)</p> <p>Anpassung des Messwertes an die Estradiol-Standardkurve</p>
Univ. Stuttgart	<p><u>Quantitativ</u> (EEQ in ng/l)</p> $\text{EC50}_{\text{Standard}} [\text{ng/l}] / \text{EC50}_{\text{Probe}}$

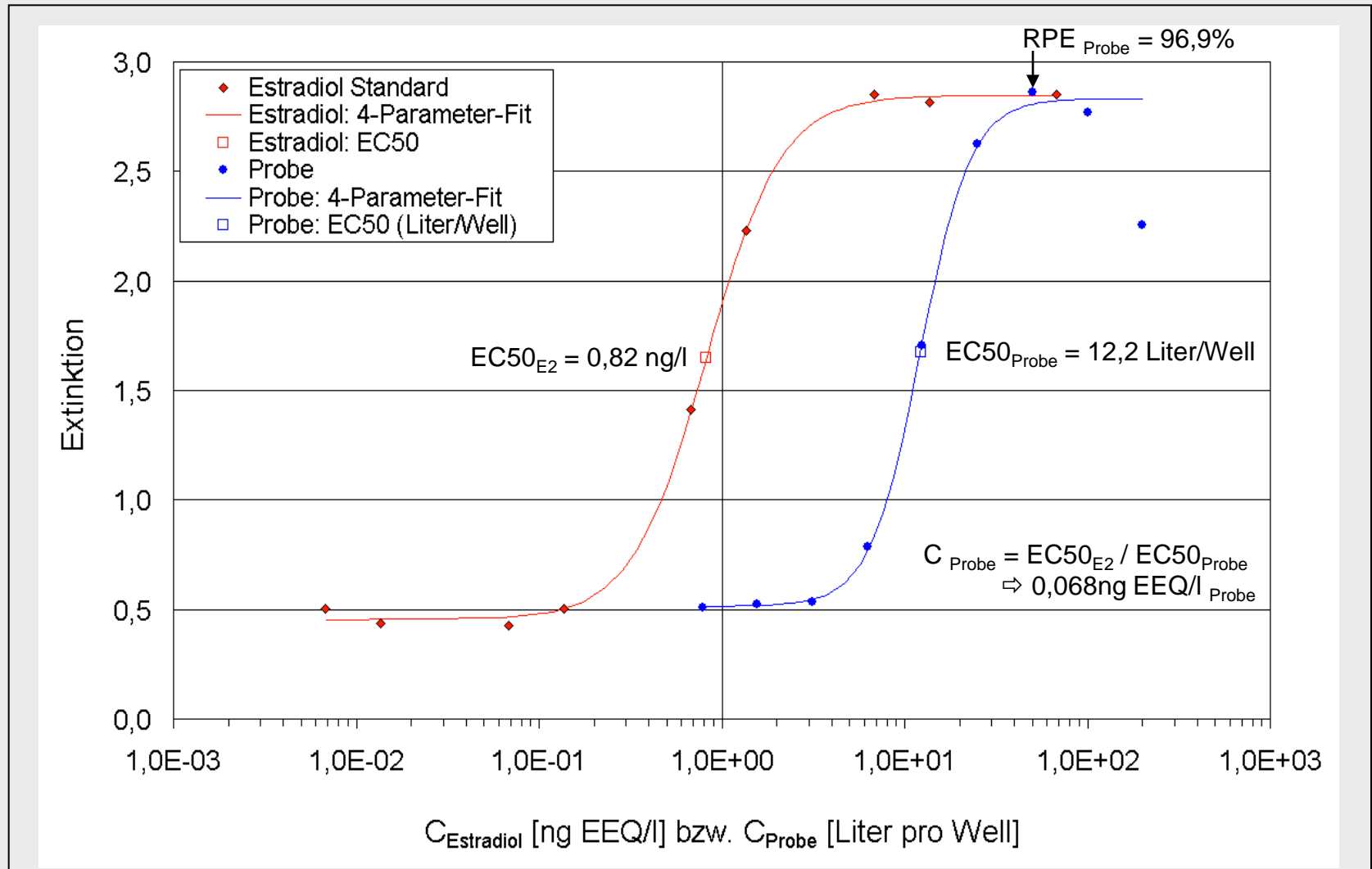
Nachweis östrogen wirksamer Substanzen



Nachweis östrogen wirksamer Substanzen



Nachweis östrogen wirksamer Substanzen





Vergleich der Ergebnisse

Arbeitsgruppe	Probenzahl	Anteil positiv	Ergebnis
LAVES	Mineralwasser: 37 (2xGlas, 27xPET, 8xTetra Pak) Rohwasser: 12	Mineralwasser: 8 (7xPET, 1xGlas) Rohwasser: 7	Mineralwasser: 16-71 % (RPE) Rohwasser: 17-42 % (RPE)
Univ. Pisa	Mineralwasser: 30 (30xPET)	90 % der Proben besaßen eine östrogene Potenz von unter 10 % (RIE)	1,58-11,32 % (RIE) und 0,9-23,1 EEQ ng/l
Univ. Frankfurt	Mineralwasser: 20 (9xGlas, 9xPET, 2xTetra Pak)	12 (3xGlas, 7xPET, 2xTetra Pak)	2,64-75,2 EEQ ng/l
Univ. Stuttgart	Noch nicht publiziert		

Inhalt des Vortrags

- **Grundprinzip und Anwendungsbereiche der wirkungsbezogenen Analytik**
- **Östrogen wirksame Substanzen in Wasser**
 - Vorstellung eigener Untersuchungsergebnisse
 - Vergleich mit anderen Studien
- **Probleme**
- **Aufgaben für die Zukunft**

Probleme

- **Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen sind nicht wirklich vergleichbar:**
 - unterschiedliche Endpunkte
 - unterschiedliche Aufarbeitung
 - unterschiedliche Formate in der Testdurchführung
 - unterschiedliche Anzahl und Konzentrationen der eingesetzten Standards und Proben(extrakte)
 - unterschiedliche DMSO-Gehalte in den Probenextrakten
 - unterschiedliche Auswertung/Berechnung

Probleme

- **Bisher ist es nicht gelungen, die für die östrogene Wirkung verantwortliche(n) Substanzen zu identifizieren**
→ **notwendig für eine Risikobewertung**

Inhalt des Vortrags

- **Grundprinzip und Anwendungsbereiche der wirkungsbezogenen Analytik**
- **Östrogen wirksame Substanzen in Wasser**
 - Vorstellung eigener Untersuchungsergebnisse
 - Vergleich mit anderen Studien
- **Probleme**
- **Aufgaben für die Zukunft**

Aufgaben für die Zukunft

1) Östrogen wirksame Substanzen:

- **Paralleluntersuchung positiver Wasserproben durch unterschiedliche Arbeitsgruppen**
- **Vergleich der Ergebnisse**
- **Identifizierung der verantwortlichen Substanzen**

Aufgaben für die Zukunft

2) Allgemein:

Standardisierung und Validierung



- Auswahl geeigneter Testsysteme
- Extraktionsmethoden
- Matrixeinflüsse auf Testsysteme
- Sensitivität
- Auswertung/Berechnung
- Bewertung der Ergebnisse

 **§ 64-LFGB-AG „Wirkungsbezogene Analytik“**

Aufgaben für die Zukunft

3) Optimierung der Identifizierung:

Geeignete Strategien für die Identifizierung



- **Fraktionierung mit Bioassay**
- **QSAR**
- **geeignete Datenbanken**
(Kopplung von Massen/Strukturen zu aus der Literatur bekannten Wirkungen)

Zusammenfassung

- **Biologische Testsysteme bieten die Chance möglicherweise gesundheitsrelevante Substanzen zu erkennen.**
- **In Mineralwasser (und Rohwasser) wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander östrogene Aktivität nachgewiesen. Ursache muss geklärt werden.**
- **Methoden (Aufarbeitung und biol. Testsysteme) müssen matrixabhängig standardisiert und validiert werden.**
- **Definierte Anforderungen an die Auswertung**
- **Optimierung der Instrumente zur Identifizierung der verantwortlichen Substanzen**



Niedersächsisches Landesamt
für Verbraucherschutz und
Lebensmittelsicherheit

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit