

Andrea John

Biomarker lebensmittel- und umweltrelevanter Xenobiotika

Analytik von Glutathionkonjugaten
und Mercaptursäuren



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Biomarker lebensmittel- und umweltrelevanter Xenobiotika – Analytik von Glutathionkonjugaten und Mercaptursäuren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

"doctor rerum naturalium"

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

von

Andrea John

aus Hamburg

Potsdam, Januar 2010

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2010
Zugl.: Potsdam, Univ., Diss., 2010
978-3-86955-442-6

Gutachter:

1. Prof. Dr. Burkhard Kleuser, Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie, Universität Potsdam
2. Prof. Dr. Edmund Maser, Institut für Toxikologie und Pharmakologie, Universität Kiel
3. Prof. Dr. Walther Honscha, Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, Universität Leipzig

Tag der Disputation am Deutschen Institut für Ernährungsforschung in Potsdam-Rehbrücke:
06. Juli 2010

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2010
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2010

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-442-6

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Chemische Kanzerogenese und Fremdstoffmetabolismus.....	1
1.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	2
1.3 Niedermolekulare aromatische Kohlenwasserstoffe	6
1.4 Glutathionkonjugation und Mercaptursäurebildung	7
1.5 ABC-Transporter.....	8
1.6 Beeinflussung des Fremdstoffmetabolismus.....	9
1.7 Caco-2-Zellen.....	11
1.8 Massenspektrometrie.....	12
2 Zielsetzung	18
3 Material und Methoden	21
3.1 Material	21
3.1.1 Geräte	21
3.1.2 Chemikalien	22
3.1.3 Referenzsubstanzen	23
3.1.4 Arbeitslösungen.....	23
3.2 Zellkultur.....	23
3.2.1 Kultivierung	23
3.2.2 Inkubationen von Caco-2-Zellen.....	24
3.2.3 Induktion des Fremdstoffmetabolismus.....	24
3.2.4 Inhibierung von Transportproteinen.....	25
3.3 Methodvalidierung	25
3.4 Bestimmung von BPD-SG-Konjugaten	27
3.5 Bestimmung von DBPD-SG-Konjugaten	30
3.6 Bestimmung von BcPheD-SG-Konjugaten.....	32
3.7 Bestimmung von DB[a,l]P-Metaboliten	34
3.8 Bestimmung von B[a]P-Metaboliten	36
3.9 Bestimmung von B[c]Phe-Metaboliten.....	38
3.10 Bestimmung von Mercaptursäuren	40
3.11 Statistik.....	42

4	Ergebnisse	43
4.1	Glutathion-Analytik mittels LC-MS/MS	43
4.2	Benzo[<i>a</i>]pyren	45
4.2.1	BPD-SG-Bestimmung mittels LC-MS/MS	45
4.2.1.1	Qualitativer Nachweis von BPD-SG	46
4.2.1.2	Quantitative Bestimmung von BPD-SG	47
4.2.1.3	Bildung der BPD-SG-Konjugate und Transport ins Medium	54
4.2.1.4	Induktion des Transportes der BPD-SG-Konjugate	57
4.2.1.5	Inhibition des Transportes der BPD-SG-Konjugate	59
4.2.1.6	Inkubationen der Caco-2-Zellen mit BPDE	60
4.2.2	Bestimmung von B[<i>a</i>]P-Metaboliten mittels HPLC-FL	62
4.2.2.1	Bildung der B[<i>a</i>]P-Metaboliten und Transport ins Medium	62
4.2.2.2	Induktion des Transportes der B[<i>a</i>]P-Metaboliten	64
4.2.2.3	Qualitativer Nachweis von BPD-SG-Konjugaten	66
4.3	Dibenzo[<i>a,l</i>]pyren	66
4.3.1	DBPD-SG-Bestimmung mittels LC-MS/MS	66
4.3.1.1	Qualitativer Nachweis von DBPD-SG	66
4.3.1.2	Quantitative Bestimmung von DBPD-SG	67
4.3.1.3	DBPD-SG-Bildung aus <i>syn</i> -DBPDE	68
4.3.1.4	Bildung der DBPD-SG-Konjugate und Transport ins Medium	69
4.3.1.5	Transport der DBPD-SG-Konjugate im Transwell TM -System	71
4.3.2	Bestimmung von DB[<i>a,l</i>]P-Metaboliten mittels HPLC-UV	73
4.3.2.1	Konjugationsformen der vorliegenden Metaboliten	74
4.3.2.2	Bildung der DB[<i>a,l</i>]P-Metaboliten	75
4.3.2.3	Induktion des Transportes der DB[<i>a,l</i>]P-Metaboliten	76
4.3.2.4	Inhibition des Transportes der DB[<i>a,l</i>]P-Metaboliten	77
4.3.2.5	Qualitativer Nachweis von DBPD-SG-Konjugaten	78
4.4	Benzo[<i>c</i>]phenanthren	79
4.4.1	BcPheD-SG-Bestimmung mittels LC-MS/MS	79
4.4.1.1	Qualitativer Nachweis von BcPheD-SG	79
4.4.1.2	Quantitative Bestimmung von BcPheD-SG	86
4.4.1.3	Bildung der BcPheD-SG-Konjugate und Transport ins Medium	88
4.4.1.4	Inkubationen der Caco-2-Zellen mit BcPheDE	89
4.4.2	Bestimmung von B[<i>c</i>]Phe-Metaboliten mittels HPLC-UV	91
4.4.2.1	Bildung der B[<i>c</i>]Phe-Metaboliten und Transport ins Medium	91
4.4.2.2	Qualitativer Nachweis von BcPheD-SG-Konjugaten	93
4.5	Mercaptursäure-Analytik im Urin mittels LC-MS/MS	94
4.5.1	Bestimmung von Mercaptursäuren in Nichtraucher- und Raucher-Urinen	98

5	Diskussion	101
5.1	LC-MS/MS-Methodenetablierung für die Bestimmung der GSH-Konjugate	101
5.2	LC-MS/MS-Methodenetablierung für die Bestimmung der Mercaptursäuren	116
6	Zusammenfassung/Summary	120
7	Literaturverzeichnis	124
8	Abbildungsverzeichnis	135
9	Tabellenverzeichnis	137
10	Anhang	138

Abkürzungsverzeichnis

(-)- <i>anti</i> -BcPheDE	(-)- <i>anti</i> -3,4-Dihydroxy-1,2-epoxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[<i>c</i>]phenanthren
(-)- <i>anti</i> -BPDE	(-)- <i>anti</i> -7,8-Dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[<i>a</i>]pyren
(-)- <i>anti</i> -DBPDE	(-)- <i>anti</i> -11,12-Dihydroxy-13,14-epoxy-11,12,13,14-tetrahydrodibenzo[<i>a,l</i>]pyren
(+)- <i>anti</i> -BcPheDE	(+)- <i>anti</i> -3,4-Dihydroxy-1,2-epoxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[<i>c</i>]phenanthren
(+)- <i>anti</i> -BPDE	(+)- <i>anti</i> -7,8-Dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[<i>a</i>]pyren
(+)- <i>anti</i> -DBPDE	(+)- <i>anti</i> -11,12-Dihydroxy-13,14-epoxy-11,12,13,14-tetrahydrodibenzo[<i>a,l</i>]pyren
(11 <i>R</i> ,12 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-DBPD-SG	14 <i>S</i> -(<i>S</i> -Glutathionyl)-11 <i>R</i> ,12 <i>S</i> ,13 <i>S</i> -trihydroxy-11,12,13,14-tetrahydrodibenzo[<i>a,l</i>]pyren
(11 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i>)-DBPD-SG	14 <i>R</i> -(<i>S</i> -Glutathionyl)-11 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,13 <i>R</i> -trihydroxy-11,12,13,14-tetrahydrodibenzo[<i>a,l</i>]pyren
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-BcPheD-SG	(+)-1 <i>R</i> -(<i>S</i> -Glutathionyl)-2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> -trihydroxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[<i>c</i>]phenanthren
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-BcPheD-SG	(-)-1 <i>S</i> -(<i>S</i> -Glutathionyl)-2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> -trihydroxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[<i>c</i>]phenanthren
(7 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)-BPD-SG	(-)-10 <i>S</i> -(<i>S</i> -Glutathionyl)-7 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> -trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[<i>a</i>]pyren
(7 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-BPD-SG	(+)-10 <i>R</i> -(<i>S</i> -Glutathionyl)-7 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> -trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[<i>a</i>]pyren
[M - H] ⁻	Molekül-Ion - Wasserstoffatom
[M + H] ⁺	Molekül-Ion + Wasserstoffatom
11,12-Diol-DB[<i>a,l</i>]P	<i>trans</i> -11,12-Dihydroxy-11,12-dihydrodibenzo[<i>a,l</i>]pyren
1-MP-SG	1-Methylpyrenylglutathion
1-OH-B[<i>a</i>]P	1-Hydroxybenzo[<i>a</i>]pyren
1-OH-B[<i>c</i>]Phe	1-Hydroxybenzo[<i>c</i>]phenanthren
2-OH-B[<i>c</i>]Phe	2-Hydroxybenzo[<i>c</i>]phenanthren
3,4-Diol-B[<i>c</i>]Phe	<i>trans</i> -3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[<i>c</i>]phenanthren
3-OH-B[<i>a</i>]P	3-Hydroxybenzo[<i>a</i>]pyren
3-OH-B[<i>c</i>]Phe	3-Hydroxybenzo[<i>c</i>]phenanthren
4,5-Diol-B[<i>a</i>]P	<i>trans</i> -4,5-Dihydroxy-4,5-dihydrobenzo[<i>a</i>]pyren
4-OH-B[<i>c</i>]Phe	4-Hydroxybenzo[<i>c</i>]phenanthren
5,6-Diol-B[<i>c</i>]Phe	<i>trans</i> -5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrobenzo[<i>c</i>]phenanthren
7,8-Diol-B[<i>a</i>]P	<i>trans</i> -7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[<i>a</i>]pyren
7-OH-B[<i>a</i>]P	7-Hydroxybenzo[<i>a</i>]pyren
7-OH-DB[<i>a,l</i>]P	7-Hydroxydibenzo[<i>a,l</i>]pyren
8,9-Diol-DB[<i>a,l</i>]P	<i>trans</i> -8,9-Dihydroxy-8,9-dihydrodibenzo[<i>a,l</i>]pyren
9,10-Diol-B[<i>a</i>]P	<i>trans</i> -9,10-Dihydroxy-9,10-dihydrobenzo[<i>a</i>]pyren

9-OH-B[a]P	9-Hydroxybenzo[a]pyren
AhR	<i>Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor</i>
ARE	<i>Antioxidant Response Element</i>
B[a]P	Benzo[a]pyren
B[c]Phe	Benzo[c]phenanthren
B[k]F	Benzo[k]fluoranthren
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BG	Bestimmungsgrenze
BHT	Butylhydroxytoluol
BIU	Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene
BTEX	Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Xylol
C18	<i>Octadecyl-</i>
CID	<i>Collision-induced Dissociation</i> (Kollisions-induzierte Dissoziation)
CNL	<i>Constant Neutral Loss-Modus</i>
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
DAU	<i>Daughter Scan-Modus</i>
DB[a,l]P	Dibenzo[a,l]pyren
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESI-/ESI+	<i>Electrospray Ionisation</i> , negativer beziehungsweise positiver Modus
GSH	Glutathion (γ -Glutamylcysteinylglycin)
GST	Glutathion-S-Transferase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPLC-FL	HPLC mit Fluoreszenz-Detektion
HPLC-UV	HPLC mit Ultraviolett-Detektion
ISTD	Interner Standard
kV	kVolt
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
M	Molekulargewicht
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
MA	Mercaptursäure
mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase
MeOH	Methanol
MK571	(<i>E</i>)-3-[[[3-[2-(7-Chloro-2-quinolinyl)ethenyl]phenyl]-[[3-dimethylamino)-3-oxopropyl]thio]methyl]thio]-propansäure, Natrium Salz
MRP	<i>Multidrug Resistance-associated Protein</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie

MW	Mittelwert
NG	Nachweisgrenze
Nrf2	<i>NF-E2 related factor 2</i> (Transkriptionsfaktor)
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PAR	<i>Parent Scan</i> -Modus
PER	Perylen
ppb	<i>parts per billion</i>
psi	<i>pound per square inch</i>
Q0, Q1, Q2, Q3	Quadrupole des Massenspektrometers
RP	<i>Reversed Phase</i> (Umkehrphase)
S/N	<i>signal to noise ratio</i> (Signal-zu-Rausch-Verhältnis)
S-BMA	<i>S-Benzylmercaptursäure</i>
SD	Standardabweichung
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> -Modus
SG	<i>S-Glutathionyl-Rest</i>
S-NMA	<i>S-Naphthylmercaptursäure</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Festphasenextraktion)
S-PMA	<i>S-Phenylmercaptursäure</i>
S-PMA-d ₅	<i>S-Phenylmercaptursäure-d₅</i>
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i> -Modus
Tetrol-B[a]P	7,10/8,9-Tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyren
Tetrol-B[c]Phe	1,4/2,3-Tetrahydroxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[c]phenanthren
Tetrol-DB[a,l]P	11,13,14/12-Tetrahydroxy-11,12,13,14-tetrahydrodibenzo[a,l]pyren
TSQ	<i>Triple Stage</i> Quadrupol
V	Volt
v/v	Volumenprozent zu Volumenprozent
VK	Variationskoeffizient
VOC	<i>volatile organic compounds</i> (flüchtige organische Verbindungen)

1 Einleitung

1.1 Chemische Kanzerogenese und Fremdstoffmetabolismus

Die Kanzerogenese ist ein mehrstufiger Prozess, der sich in Initiation, Promotion und Progression unterteilt. Sowohl genetische Faktoren als auch krebserregende Einflüsse chemischer, physikalischer oder biologischer Natur gelten als Risikofaktoren für diesen Prozess. Neben den bekannten chemischen Kanzerogenen wie Bestandteilen des Tabakrauches können selbst Medikamente oder Lebensmittel kanzerogen wirkende Substanzen enthalten. Aus physikalischer Sicht ist beispielsweise UV-Licht als potentielle Gefahrenquelle anzuführen, während Onkoviren zu den biologischen Risikofaktoren für eine Krebsentstehung zählen. Eine Schädigung der DNA stellt den ersten Schritt der Kanzerogenese dar, deren weitere Schritte zur Bildung von Tumoren führen können.

Die genotoxische Wirkung kanzerogener Substanzen wie polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) beruht auf ihrer Fähigkeit, mit der DNA zu reagieren und hierbei DNA-Schädigungen auszulösen. Diese Fähigkeit erhalten die meisten Kanzerogene jedoch erst nach einer metabolischen Aktivierung während des sogenannten Fremdstoffmetabolismus. Dieser Prozess beinhaltet eine Abfolge chemischer Reaktionen im Körper, die lipophile Fremdstoffe in hydrophilere Metaboliten umwandeln und auf diesem Wege eine Ausscheidung der Fremdstoffe ermöglichen. Hierbei lassen sich zwei Phasen unterscheiden: Der Phase-I-Metabolismus wandelt apolare, lipophile Stoffe in polare Stoffe um und führt dabei funktionelle Gruppen ein oder aber demaskiert vorhandene Gruppen. Anschließend können Enzyme des Phase-II-Metabolismus Konjugationsreaktionen des vor- oder umfunktionalisierten Fremdstoffes mit endogenen, hydrophilen Molekülen katalysieren. Dieser Schritt erhöht die Wasserlöslichkeit des Fremdstoffes und fördert seine Exkretion über Leber und Niere. Verantwortlich für die Phase-I-Reaktionen sind die Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (CYPs), welche membrangebundene Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums (ER) darstellen. Es sind mehr als 1000 unterschiedliche CYP-Enzyme bekannt (Anzenbacher und Anzenbacherova 2001), was auf deren große Bedeutung im Zellstoffwechsel bei Eukaryoten und auch Prokaryoten hindeutet.

Die Aminosäurezusammensetzung der CYPs bestimmt deren Nomenklatur, wobei eine Identität der Aminosäuren von mehr als 40 Prozent die Enzyme in dieselbe Familie (zum Beispiel 1, 2, 3) und von größer als 50 Prozent in dieselbe Subfamilie (zum Beispiel A, B, C) einteilt. Eukaryotische Formen werden mit Familiennummern kleiner als 100 gekennzeichnet, prokaryotische Formen besitzen Familiennummern größer als 100. Das humane Genom umfasst 18 Familien, die sich in 43 Subfamilien mit 57 aktiven Genen klassifizieren (Guengerich 2004; Nelson 2009). Die CYPs verfügen über eine sehr breite Substratspezifität, die teilweise zusätzlich überlappend ist. Darüber hinaus sind die CYPs auch durch eine Vielzahl von Substraten induzierbar. Planare, lipophile Substanzen wie PAK induzieren zum Beispiel CYP1A1, 1A2 und 1B1.

Der Begriff „Monooxygenase“ basiert auf der Einführung eines Sauerstoffatoms in das Substratmolekül. Bei dieser von den CYPs katalysierten Reaktion wird das zweite Sauerstoffatom des Sauerstoffmoleküls zu Wasser reduziert.

Das Vorkommen der CYPs verteilt sich auf den Gastrointestinaltrakt (Ösophagus, Magen, Duodenum und Kolon), den Respirationstrakt (nasale Mukosa, Lunge), die Leber als wichtigstes Entgiftungsorgan sowie die Nebennieren, die Ovarien und die Plazenta. Nach Lin *et al.* (1999) verfügt die Leber über die höchsten CYP-Gehalte. Andere Organe wie zum Beispiel der Dünndarm sind jedoch auch an der Metabolisierung von Xenobiotika beteiligt.

Die Metabolisierung muss allerdings nicht in allen Fällen zu einer Detoxifizierung von giftigen Fremdstoffen führen, sondern kann auch eine chemische Aktivierung von Kanzerogenen zu reaktiven Metaboliten zur Folge haben. Solche genotoxischen Metaboliten können mit Proteinen und der DNA Addukte bilden. Die Addukte können im Anschluss über DNA-Mutationen und Aktivierung von Onkogenen mit gleichzeitiger Unterdrückung von Tumorsuppressor-Genen die Entstehung eines Tumors begünstigen (Abb. 1).

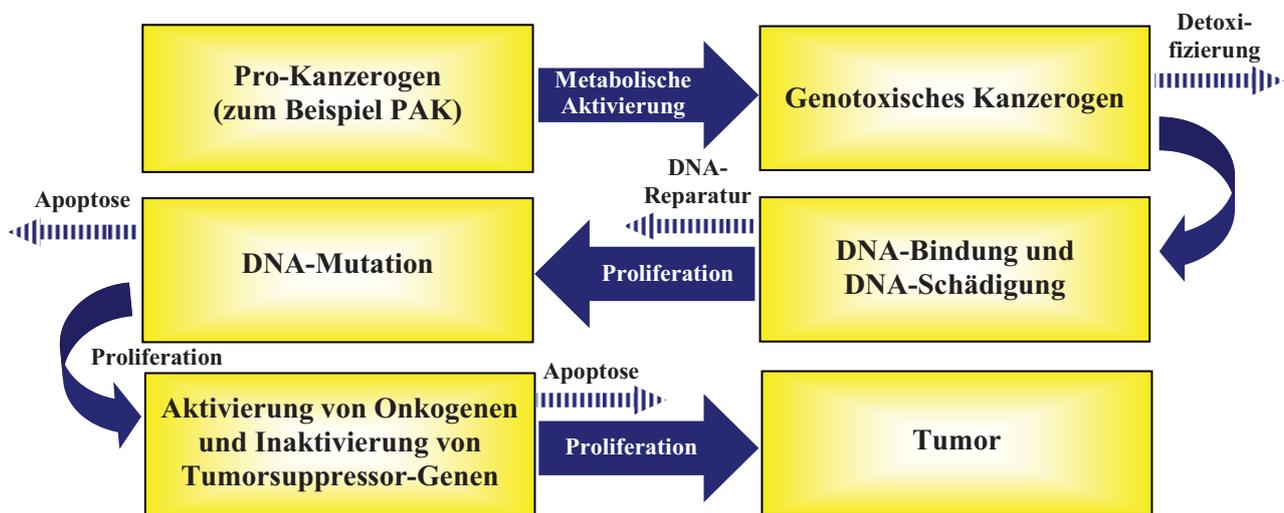


Abbildung 1: Mechanismus der chemischen Kanzerogenese (verändert nach Hengstler 2008)

Zur Bestimmung der metabolischen Prozesse werden sogenannte Biomarker im Rahmen eines Überwachungssystems (Biomonitoring) eingesetzt. Dabei repräsentieren Biomarker Indikatoren für Belastungen, die zum Beispiel aus der Exposition gegenüber bestimmten Schadstoffen resultieren. Die Messung dieser Biomarker gibt unter anderem Auskunft über den Grad einer Detoxifizierung, wie sie meist bei der Bildung von Glutathionkonjugaten und Mercaptursäuren einhergeht.

1.2 Polzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)

Die PAK stellen eine mehrere Hundert Einzelsubstanzen umfassende Stoffgruppe dar, deren Mitglieder aus mindestens zwei kondensierten Benzolringen bestehen. Der einfachste Vertreter ist das zwei Benzolringe umfassende Naphthalin. Die PAK sind meist neutrale,

unpolare Feststoffe, die eine geringe Wasserlöslichkeit aufweisen und mit steigender Anzahl an Ringen schwerer flüchtig und weniger wasserlöslich werden. Der bekannteste Vertreter der PAK ist das Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P), welches eine der am längsten beschriebenen kanzerogenen Substanzen repräsentiert. Des Weiteren dient es als Leitsubstanz für die Abschätzung der in einer Matrix insgesamt enthaltenen Menge an PAK.

Die Entstehung der PAK erfolgt beim unvollständigen Verbrennen (Pyrolyse) und beim Erhitzen von organischem Material unter Luftabschluss, wobei stets PAK-Gemische gebildet werden. Die Hauptquellen für PAK stellen Tabakrauch sowie Mineralöle und deren Folgeprodukte dar. In die Atmosphäre gelangen PAK zudem durch die Emission aus Müllverbrennungsanlagen und dem Kraftfahrzeugverkehr. Dieser Vorgang hat die ubiquitäre Verbreitung der PAK in der Luft und im Boden zur Folge, wodurch es wiederum zur Aufnahme dieser Stoffe durch Nutzpflanzen kommen kann. Der Räucherungsprozess für bestimmte Lebensmittel wie Fleisch- und Fischprodukte in einem rußhaltigen Heißrauch führt zur Anreicherung der PAK in der jeweiligen Nahrung. Der in der EU-Verordnung 208/2005 angegebene aktuelle Grenzwert für die PAK-Leitsubstanz B[*a*]P beträgt für Fleisch und Fleischerzeugnisse sowie für Räucherfisch jeweils 5 µg/kg Lebensmittel (EG-Verordnung 208/2005 vom 4. Februar 2005). Weitere Höchstgehalte bestehen gemäß dieser Verordnung für Öle und Fette (2 µg B[*a*]P/kg Lebensmittel), Babynahrung (1 µg B[*a*]P/kg Lebensmittel) und Schalentiere (10 µg B[*a*]P/kg Lebensmittel). Einen zusätzlichen lebensmittelrelevanten Entstehungsprozess für PAK stellt das Grillen von Fleisch dar. Hierbei entstehen je nach Fettanteil des Grillguts sowie der verwendeten Grilltechnik unterschiedlich hohe PAK-Anteile im für den Verzehr bestimmten Fleisch. Bei Fleisch mit hohem Fettgehalt ist durch Pyrolysevorgänge vom in die Holzkohle herabtropfenden Fett eine höhere Kontamination mit PAK zu erwarten als bei magerem Fleisch.

Die Hauptaufnahmekanäle für PAK basieren gegenwärtig auf Lebensmitteln mit prozentual hohem Verzehranteil wie pflanzliche Fette und Öle, Obst und Gemüse sowie Getreideprodukte. Bei Rauchern kommt je nach Höhe des täglichen Zigarettenkonsums eine zusätzliche PAK-Aufnahmekanäle hinzu. Neben der oralen und inhalativen Aufnahme von PAK kommt auch der dermalen Aufnahme eine Bedeutung zu, da PAK aufgrund ihrer Lipophilie gut durch die Lipoproteinschichten der Haut diffundieren können.

Während die akute Toxizität der PAK gering ist, stellen die Langzeitwirkungen eine wesentlich höhere Gefahr dar. So wirken verschiedene PAK kanzerogen, mutagen und reproduktionstoxisch. Eine kanzerogene Wirkung haben vor allem PAK, die aus vier oder mehr Benzolringen aufgebaut sind. Bei nicht linearer Anellierung mehrerer Benzolringe entstehen Bay- und Fjord-Region-PAK (Abb. 2). Vicinale Dihydrodiolepoxide mit einem Oxiranring in einer Bay- oder Fjord-Region sind sehr reaktiv gegenüber DNA. Die räumliche Anordnung des Oxiranrings erschwert eine Interaktion mit detoxifizierenden Enzymen.

Es existieren Einteilungen von PAK in Klassifikationsgruppen, die als erwiesenermaßen (Gruppe 1), wahrscheinlich (Gruppe 2A) oder möglicherweise krebserregend (Gruppe 2B) für den Menschen beurteilt werden (International Agency for Research on Cancer (IARC) 2008).

In Abbildung 2 ist stellvertretend für jede Gefahrengruppe ein PAK-Molekül dargestellt: B[a]P gehört der Gruppe 1 an, während Dibenzo[*a,l*]pyren (DB[*a,l*]P) in die Gruppe 2A und Benzo[*c*]phenanthren (B[*c*]Phe) in die Gruppe 2B eingeordnet ist. Darüber hinaus existieren Untersuchungen, die dem DB[*a,l*]P die stärkste kanzerogene Wirkung in der Klasse der PAK zusprechen (Devanesan *et al.* 1990; Jacob *et al.* 1999; Luch 2009). Aufgrund der sterischen Hinderung der Fjord-Region-Dihydrodiolepoide gehört das 11,12-Dihydroxy-11,12-dihydro-13,14-epoxydibenzo[*a,l*]pyren (DBPDE) zu den potentesten ultimalen Kanzerogenen der PAK (Jacob *et al.* 1999).

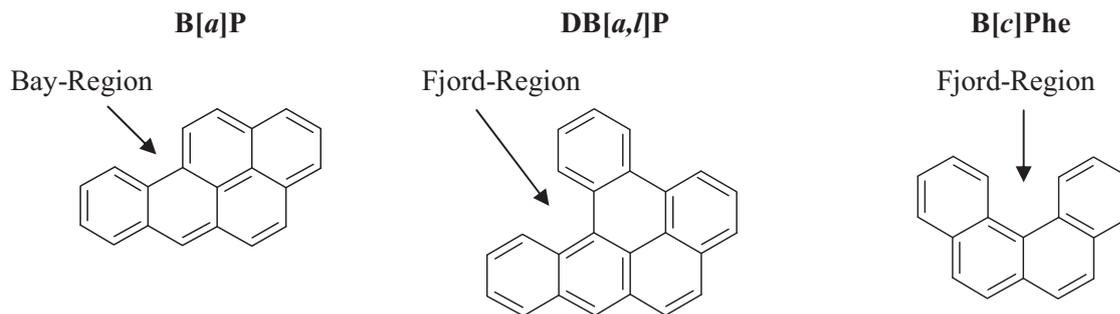


Abbildung 2: Strukturformeln der PAK B[a]P, DB[*a,l*]P und B[*c*]Phe

Bei Vorliegen der PAK in unveränderter Form besteht keine Kanzerogenität, sondern es ist eine metabolische Aktivierung zur Ausbildung der kanzerogenen Wirkung erforderlich. Folglich sind PAK pro-kanzerogen, da sie erst durch bestimmte enzymatische Reaktionen ihr kanzerogenes Potential entwickeln. Die Aktivierung des Pro-Kanzerogens B[a]P wurde schon von den Arbeitsgruppen Jerina (Thakker *et al.* 1977) und Conney (Conney 1982) beschrieben. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die im Körper durch die enzymatische Metabolisierung von B[a]P entstehenden unterschiedlichen Metaboliten wie Phenole, Dihydrodiole, sehr reaktive Dihydrodiolepoide und überwiegend detoxifizierte Konjugate (Glutathionkonjugate, Glucuronide, Sulfate) sowie Tetrole und weist außerdem auf die Bildung von DNA-Addukten hin. Bei den Konjugationsreaktionen sind nukleophile Metaboliten, wie hydroxylierte Verbindungen, potentielle Substrate für Sulfotransferasen (SULT) und UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT). Elektrophile Metaboliten, wie Epoxide und Chinone, können durch Glutathion-*S*-Transferasen (GST) konjugiert werden.

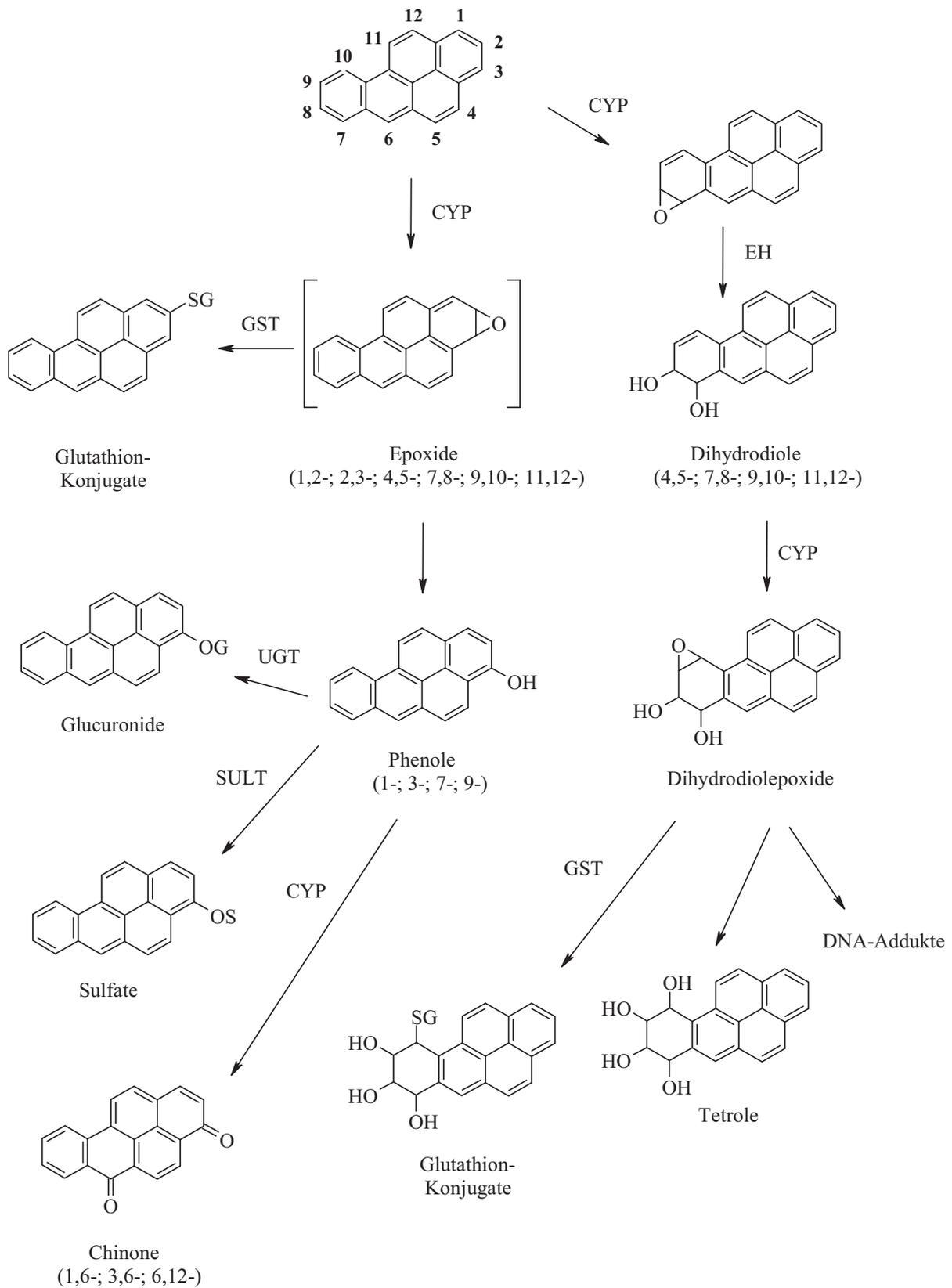


Abbildung 3: Ausgewählte Metabolisierungswege des B[a]P, verändert nach Nau, Steinberg, Kietzmann (2003). -SG: Glutathionrest, -OG: Glucuronidrest, -OS: Sulfatrest, EH: Epoxidhydrolase, GST: Glutathion-S-Transferase, SULT: Sulfotransferase, UGT: UDP-Glucuronosyltransferasen. Die absolute Stereochemie ist nicht aufgeführt.

1.3 Niedermolekulare aromatische Kohlenwasserstoffe

Neben der PAK-Exposition beruht ein weiteres kanzerogenes Potential auf einer Umweltbelastung mit niedermolekularen aromatischen Kohlenwasserstoffen mit nur einem Ringsystem. Beispiele dieser Stoffklasse sind Benzol und Toluol, die neben Ethylbenzol und Xylol zur sogenannten BTEX-Gruppe gehören. Während Benzol ein nicht-alkylierter Vertreter der BTEX-Gruppe ist, handelt es sich bei Toluol um einen alkylierten Vertreter. Diese Substanzen werden auch zu den flüchtigen organischen Verbindungen (*volatile organic compounds*, VOC) gezählt, treten ubiquitär auf und sind natürlichen oder anthropogenen Ursprungs (Cantor 1997; Churchill *et al.* 2001; Schnatter *et al.* 2005). Sie werden zum Beispiel im Straßenverkehr, über den Tabakrauch oder als Lösungsmittel freigesetzt. Toluol lässt sich in Farben, Lacken und Klebstoffen nachweisen.

Die VOC repräsentieren eine allgemeine Gesundheitsgefahr, da chronische Belastungen mit einzelnen Substanzen ein Risiko der Krebsentstehung bergen. Die IARC klassifiziert beispielsweise Benzol in die Gruppe 1 der Stoffe mit erwiesenermaßen krebserregender Wirkung beim Menschen (IARC 1987). Die Aufnahme der VOC erfolgt mittels Inhalation, über die Nahrung oder durch Hautkontakt, wobei insbesondere mit dem Zigarettenrauch hohe Mengen dieser Substanzen (im µg-Bereich pro Zigarette) eingeatmet werden (Brunnemann *et al.* 1989; Byrd *et al.* 1990; Darrall *et al.* 1998; Ding *et al.* 2009). Benzol und Toluol können im Körper im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus zu ihren korrespondierenden Mercaptursäuren umgesetzt werden (Abb. 4). Diese detoxifizierten Metaboliten werden anschließend mit dem Urin ausgeschieden.

Literaturdaten unterstreichen, dass die *S*-Phenylmercaptursäure (*S*-PMA) aufgrund ihrer Spezifität am besten als Biomarker für eine Benzolbelastung geeignet ist. Die Analytik der ebenfalls bei der Verstoffwechslung von Benzol entstehenden *trans,trans*-Muconsäure kann hingegen durch die gleichzeitige Aufnahme des Konservierungsstoffes Sorbinsäure beeinflusst werden (Boogaard und van Sittert 1995; Fustinoni *et al.* 2005). Die *S*-Benzylmercaptursäure (*S*-BMA) wurde zum ersten Mal von Takahashi *et al.* 1993 als ein Metabolit des Toluols beschrieben, der aus dem Benzylsulfat hervorgeht.

Ausgewählte Metabolisierungswege des Benzols sowie des Toluols sind in Abbildung 4 dargestellt. Neben der bereits beschriebenen Bildung der jeweiligen Mercaptursäure können ausgehend vom Benzol aus dem reaktiven Intermediat des Benzoloxids auch Phenol und über den Muconaldehyd die *trans,trans*-Muconsäure entstehen. Toluol bildet neben der *S*-BMA die Metaboliten Hippursäure (über die Zwischenstufen Benzylalkohol, Benzaldehyd und Benzoessäure) sowie Kresol. Diese Stoffwechselprodukte sind jedoch bei geringer Toluolbelastung weniger gut als Biomarker geeignet als die *S*-BMA (Inoue *et al.* 2004).

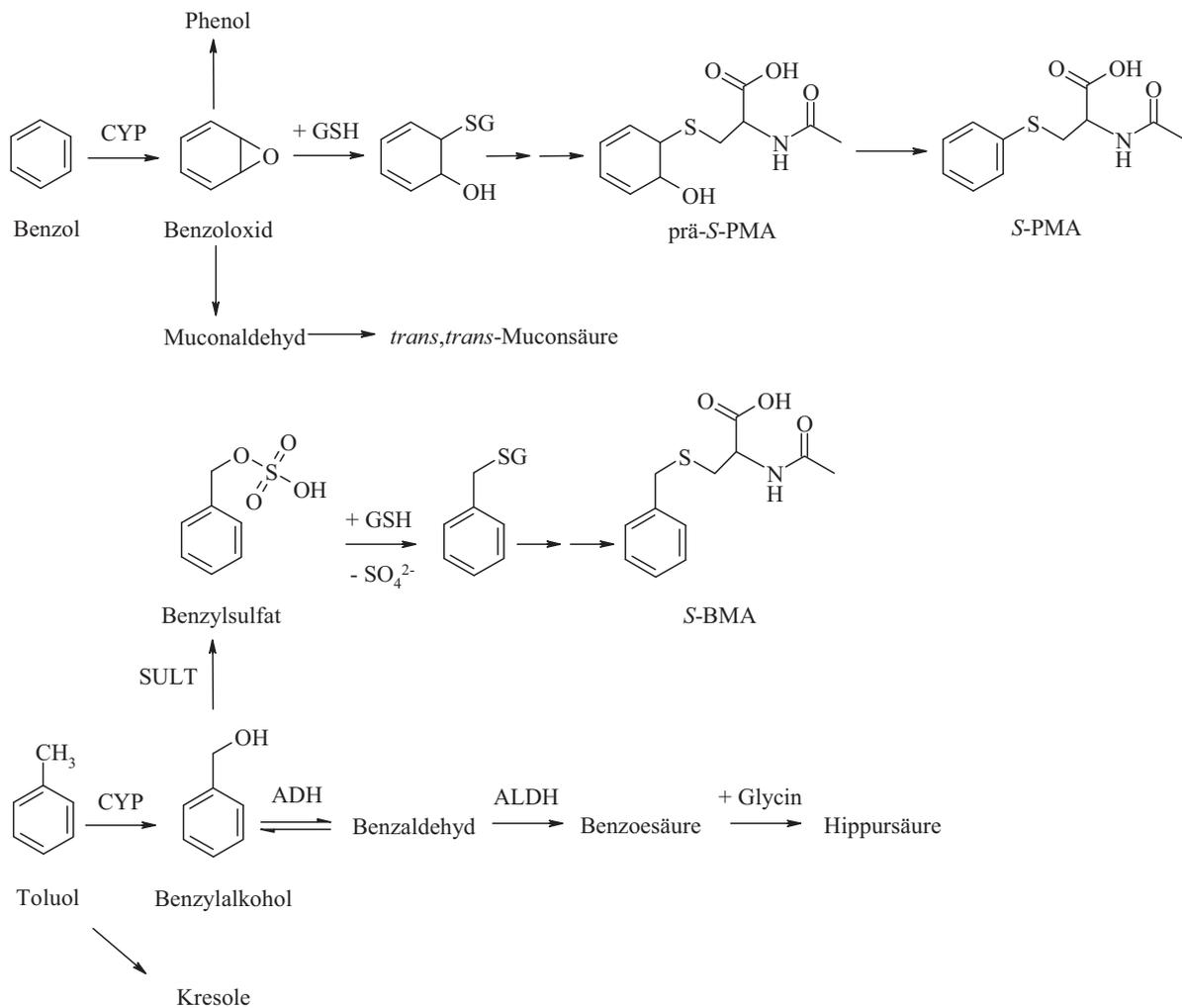


Abbildung 4: Ausgewählte Metabolisierungswege des Benzols sowie des Toluols, verändert nach Schettgen *et al.* (2008); ADH: Alkoholdehydrogenase, ALDH: Aldehyddehydrogenase

1.4 Glutathionkonjugation und Mercaptursäurebildung

Im Rahmen einer Konjugationsreaktion erfolgt eine Reaktion des Tripeptids Glutathion (GSH) mit elektrophilen Metaboliten, zu denen unter anderem PAK-Metaboliten wie Dielopoxide zählen. Dieser Schutzmechanismus der Zelle vor Elektrophilen läuft spontan ab, die Reaktion kann jedoch durch die Anwesenheit der Glutathion-S-Transferase (GST) deutlich gesteigert werden. Durch die Bildung von GSH-Konjugaten in der Zelle wird die GST-Aktivität inhibiert (Akerboom und Sies 1989), so dass der Transport, der Abbau und die Ausscheidung der Konjugate erforderlich werden. Der Transport der Glutathionkonjugate aus der Zelle geschieht über Plasmamembranproteine, zum Beispiel durch die *Multidrug Resistance-associated Proteins* (MRPs) (Zaman *et al.* 1995). Die GSH-Konjugate können in mehreren Schritten zum entsprechenden Cystein-Konjugat abgebaut werden (Abb. 5).

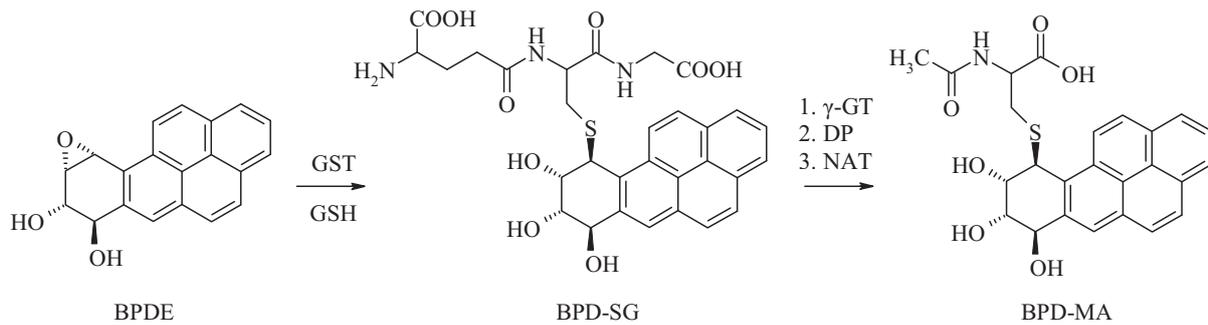


Abbildung 5: GSH-Konjugation und Mercaptursäurebildung: Ausgehend vom BPDE erfolgt durch GST-Katalyse eine GSH-Konjugation zum BPD-SG. Dieses wird durch die γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT) und die Cysteinylglycindipeptidase (DP) zum Cysteinyl-Konjugat abgebaut und anschließend mittels Cystein-S-Konjugat *N*-Acetyltransferase (NAT) zur Mercaptursäure acetyliert (Monks *et al.* 1990; Monks und Lau 1990; Hinchman und Ballatori 1994).

Diese Reaktionen werden durch die γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT) und die Cysteinylglycindipeptidase (DP) beziehungsweise Aminopeptidase M katalysiert. Im Anschluss daran kann das Cysteinylkonjugat durch die Cystein-S-Konjugat *N*-Acetyltransferase (NAT) zur Mercaptursäure acetyliert (Ding *et al.* 2009) oder aber durch die β -Lyase zum Sulphydrylderivat des Fremdstoffes abgebaut werden. Beim Menschen sowie bei der Ratte erfolgt eine Ausscheidung der Glutathionkonjugate überwiegend in Form von Mercaptursäuren (Commandeur *et al.* 1995).

1.5 ABC-Transporter

Bei den *ATP-binding cassette* (ABC) Transportern handelt es sich um eine Familie von Membranproteinen, die über eine ATP-bindende Kasette verfügen und bestimmte Substrate unter ATP-Verbrauch durch eine Zellmembran transportieren können (Drewe und Krähenbühl 2000). Diese Superfamilie ist für den letzten Schritt der Detoxifizierung von PAK und weiteren Xenobiotika verantwortlich, wobei dieser Prozess gelegentlich auch als Phase-III-Metabolismus bezeichnet wird.

Während im Arzneimittelbereich ein Abtransport von Arzneistoffen vom Wirkort unerwünscht ist und durch eine Hemmung der Transporter verhindert werden soll, ist die Exkretion detoxifizierter Lebensmittelfremdstoffe ein erwünschter Metabolismusweg. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass ebenfalls in der Nahrung enthaltene Hemmstoffe den Transport von GSH-Konjugaten aus der Zelle ins Medium inhibieren. Hierbei wäre durch den Anstieg der GSH-Konjugat-Konzentration in der Zelle und einer sich anschließenden Produkthemmung der Glutathion-S-Transferase eine gesteigerte Bildung von DNA-Addukten möglich (Srivastava *et al.* 2002).

Es bestehen unterschiedliche Arten des Transportes. Beim elektrogenen Transport werden elektrische Ladungen verschoben, außerdem existieren der Transport unter ATP-Verbrauch sowie der Natrium-abhängige Transport.

Ein wichtiges Phänomen bezüglich der Transportproteine stellt die *Multidrug Resistance* dar, die ursprünglich bei der Chemotherapie von Tumoren identifiziert wurde (Drewe und Krähenbühl 2000). Diese Medikamentenresistenz entwickelt sich zunächst lediglich gegen das Medikament, mit dem der Patient behandelt wurde. Schließlich richtet sich diese Resistenz aber zusätzlich auch gegen viele andere Medikamente, zu denen der Patient keinerlei Kontakt hatte. Der ursächliche Mechanismus hierfür ist ein „Schutz“ der Tumorzelle vor den Zytostatika. Hierbei werden die spezifischen Transportproteine überexprimiert und in die äußere Zellmembran eingebaut. Diese Transportproteine erkennen die Fremdstoffe und transportieren diese wieder aus der Zelle hinaus, bevor es zu einer gewünschten Wirkung am intrazellulären Angriffsort kommen kann.

Die zur Familie der ABC-Transporter gehörenden MDR (*Multidrug Resistance*)- und MRP (*Multidrug Resistance-associated*)-Transportproteinfamilien spielen eine relevante Rolle bei der Auslösung von *Multidrug*-Resistenzen. Sie transportieren unter ATP-Verbrauch Substrate wie Xenobiotika oder endogene Substanzen aus der Zelle ins umgebende Medium.

Das P-Glycoprotein ist das Genprodukt des humanen MDR1-Gens und besitzt eine breite Substratspezifität, wobei es vor allem lipophile, neutrale bis kationische Moleküle transportiert. Dieses Protein wurde als erstes *Multidrug Resistance* vermittelndes System identifiziert (Juliano und Ling 1976).

Bei den MRPs handelt es sich ebenfalls um eine Transportproteinfamilie, die aus mindestens sechs verschiedenen Transportern (MRP1 bis MRP6) besteht. MRPs sind verantwortlich für den Transport von organischen Anionen wie zum Beispiel Glutathion-, Glucuronid- und Sulfat-Konjugaten. Bislang zeigten lediglich die MRPs 1, 2 und 3 die Ausbildung einer *Multidrug Resistance* (Drewe und Krähenbühl 2000).

Ein weiteres Transportsystem repräsentiert das menschliche *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP), das nach der erstmaligen Klonierung aus einer multiresistenten Brustkrebszelllinie benannt ist, die mit Doxorubicin und Verapamil ko-selektiert wurde. Das Membranprotein BCRP gehört zur Familie der ABC-Transporter und wurde erstmals von Chen *et al.* (1990) erwähnt. Des Weiteren stellt das BCRP einen Halbtransporter dar, der erst nach Zusammenlagerung mit einer identischen Untereinheit aktiv wird (Ritter 2005).

Neben dem P-Glycoprotein sowie dem MRP2 ist auch das BCRP in der apikalen Membran der Hepatozyten und der Epithelzellen des Darms und der Niere enthalten.

Von Ebert *et al.* (2005a) konnte in Caco-2-Zellen gezeigt werden, dass das 3-Hydroxy-B[a]P und Phase-II-Konjugate wie das B[a]P-3-glucuronid mittels BCRP in apikaler Richtung transportiert wurden.

1.6 Beeinflussung des Fremdstoffmetabolismus

Die bereits beschriebenen Metabolisierungswege von PAK können durch gewisse Lebensmittelinhaltsstoffe, wie zum Beispiel sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, beeinflusst werden.

Zum Primärstoffwechsel der Zelle gehören alle Reaktionen, die ihren Energiehaushalt betreffen. Im Sekundärstoffwechsel werden hingegen Substanzen, die als Nebenprodukte des Primärstoffwechsels anfallen, metabolisiert. Die positiven Effekte einer an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen reichhaltigen Ernährung zur Prävention von Krankheiten wie Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Diabetes konnte schon von den Arbeitsgruppen Hertog *et al.* (1993) und Knekt *et al.* (1997) gezeigt werden. Zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zählen beispielsweise die Flavonoide. Eine Einteilung der Flavonoide erfolgt in Flavanone, Flavone, Flavonole, Flavanole, Isoflavone sowie Anthocyane. Diese Stoffklasse umfasst gemäß der Deutschen Gesellschaft für Ernährung über 6500 derzeit bekannte unterschiedliche Substanzen (DGE Ernährungsbericht 2004), die alle über eine gemeinsame, aus drei Ringsystemen bestehende Grundstruktur verfügen.

Flavonoide sind die in Lebensmitteln am häufigsten vorkommenden Polyphenole. Mit Ausnahme der Flavanole treten die Flavonoide in der Natur meist in gebundener Form als Flavonoidglycoside auf und liegen nicht frei als Aglycon vor. Dabei sind bisher mehr als 80 verschiedene Zucker in den Flavonoidglycosiden nachgewiesen worden und für Quercetin allein sind 179 verschiedene Glycoside bekannt (Watzl *et al.* 2001). Flavonoide sind überwiegend in den Randschichten von Pflanzen enthalten. Die Bioverfügbarkeit der Flavonolglycoside wird im Dünndarm durch einen aktiven Transport erreicht. Die Transportproteine MRP2 bewirken jedoch, dass die Glycoside auf der apikalen, das heißt der luminalen Seite der Intestinalzellen zu einem gewissen Anteil wieder aus der Zelle heraus transportiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass nur Quercetinglucoside, nicht aber Quercetindisaccharide im Dünndarm eine hohe Bioverfügbarkeit aufweisen, daher scheint für die Absorptionsrate der Zuckerrest verantwortlich zu sein (Watzl *et al.* 2001). Außerdem ließ sich nachweisen, dass Quercetin in humanen intestinalen Zelllinien (Caco-2, HT29) über die Zelle gleichmäßig verteilt vorliegt und nicht überwiegend in der Zellmembran vorzufinden ist. Nach oraler Aufnahme von Flavonolen und Flavanolen werden lediglich 1-2 % davon wieder in intakter Grundstruktur ausgeschieden, so dass eine ausgiebige Metabolisierung postuliert wird. Eine aus ernährungsphysiologischer Sicht relevante Erkenntnis ist, dass epidemiologische Studien sowie *in-vitro*- und tierexperimentelle Studien eine inverse Korrelation zwischen der Flavonoidaufnahme und dem Risiko für verschiedene Krankheiten zeigen. So ergibt sich durch die Flavonoidaufnahme zum Beispiel eine antikanzerogene Wirkung, für die folgende Mechanismen in Frage kommen: Hemmung von Phase-I-Enzymen, Induktion von Phase-II-Enzymen, direkte Wechselwirkung mit der DNA, Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose), Hemmung der Zellproliferation, antioxidative Wirkungen und die Modulation des Immunsystems (Watzl *et al.* 2001). Literaturdaten zeigen auf, dass Quercetin die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 unterdrückt, was vermutlich zum chemopräventiven Effekt dieser Substanz beiträgt (Surh 2003). Cruz-Correa *et al.* (2006) konnten zeigen, dass Quercetin in kombinierter Gabe mit Curcumin an Patienten, die an einem erblich bedingten Befall des Dickdarms mit Polypen (familiäre adenomatöse Polyposis,

FAP) litten, zu einer Verminderung von Größe und Anzahl von Krebsvorstufen (Darmpolypen) im Darm führte. Berücksichtigt werden sollte jedoch, dass in vielen Studien mit Flavonoidkonzentrationen im pharmakologischen Bereich gearbeitet wird, die so in pflanzlichen Lebensmitteln nicht vorkommen.

Gemäß des *World Cancer Research Fund* (WCRF)-Berichts 2007 konnte in diversen *cohort*- und *case-control*-Studien gezeigt werden, dass der Verzehr pflanzlicher Lebensmittel, wie nicht stärkehaltiges Gemüse und Obst, wahrscheinlich vor bestimmten Krebserkrankungen schützt. Insbesondere wurde auf die antioxidativen Eigenschaften der in pflanzlichen Lebensmitteln enthaltenen Substanzen hingewiesen. Hierzu gehören beispielsweise die Flavonoide, die gemäß dem WCRF-Bericht auch die Expression der Cytochrom-P450-Enzyme inhibieren, welche unter anderem für die Metabolisierung von Toxinen verantwortlich sind. Darmkrebs steht bei Frauen und bei Männern an zweiter Stelle der Krebstodesursachen (WCRF 2007) und seine Bekämpfung durch Umsetzung von Forschungsergebnissen im Zuge der Beeinflussbarkeit durch Lebensmittelinhaltsstoffe stellt daher ein wichtiges Ziel dar.

1.7 Caco-2-Zellen (*Human Caucasian Colon Adenocarcinoma cell line*)

Bei Caco-2-Zellen handelt es sich um eine permanente Zelllinie, die aus einem humanen Adenokarzinom des Kolons entnommen wurde (Fogh *et al.* 1977). Diese Zelllinie exprimiert verschiedene Phase-I-Enzyme wie die Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP1A1 (Boulenc *et al.* 1992), CYP1B1 (Buesen *et al.* 2002), CYP3A4 (Schmiedlin-Ren *et al.* 1997)). Darüber hinaus erfolgt eine Exprimierung von Phase-II-Enzymen wie Sulfo-transferasen (SULT) (Tamura *et al.* 2001), Glutathion-S-Transferasen (GST) (Peters und Roelofs 1989) und UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) (Munzel *et al.* 1999). Überdies exprimiert diese Zelllinie unterschiedliche ABC-Transporter wie das P-Glycoprotein (Hunter *et al.* 1993), die *Multidrug Resistance-associated Proteins* (zum Beispiel MRP1, MRP2, MRP3) (Hirohashi *et al.* 2000) und das *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP) (Taipalensuu *et al.* 2001). Caco-2-Zellen stellen ein *in-vitro*-Modell für den menschlichen Dünndarm dar (Villus-Zellen) und dienen als Modell für Permeabilitäts- und Transportstudien wie zur Ermittlung von passiven und aktiven Transportvorgängen.

Für die Untersuchung von Transportvorgängen dient beispielsweise das sogenannte TranswellTM-System. Es setzt sich zusammen aus einer 6-Well-Platte mit „Inserts“, die über eine permeable Membran (zum Beispiel Polycarbonat) verfügen, auf denen die Caco-2-Zellen kultiviert werden. Dabei kommt es zur Bildung eines zylindrischen Epithels aus polarisierten Zellen. In diesem Zwei-Kammer-System lässt sich die Zellmembran in apikale (Transport ins Lumen) und basolaterale (Transport in die Blutbahn) Bereiche einteilen (Abb. 6) und ermöglicht folglich analysierbare Transportvorgänge durch den Zellmonolayer. Dieses System ist ein etabliertes *in-vitro*-System zur Simulation der menschlichen Dünndarm-Barriere (Hidalgo *et al.* 1989; Ebert *et al.* 2005a).

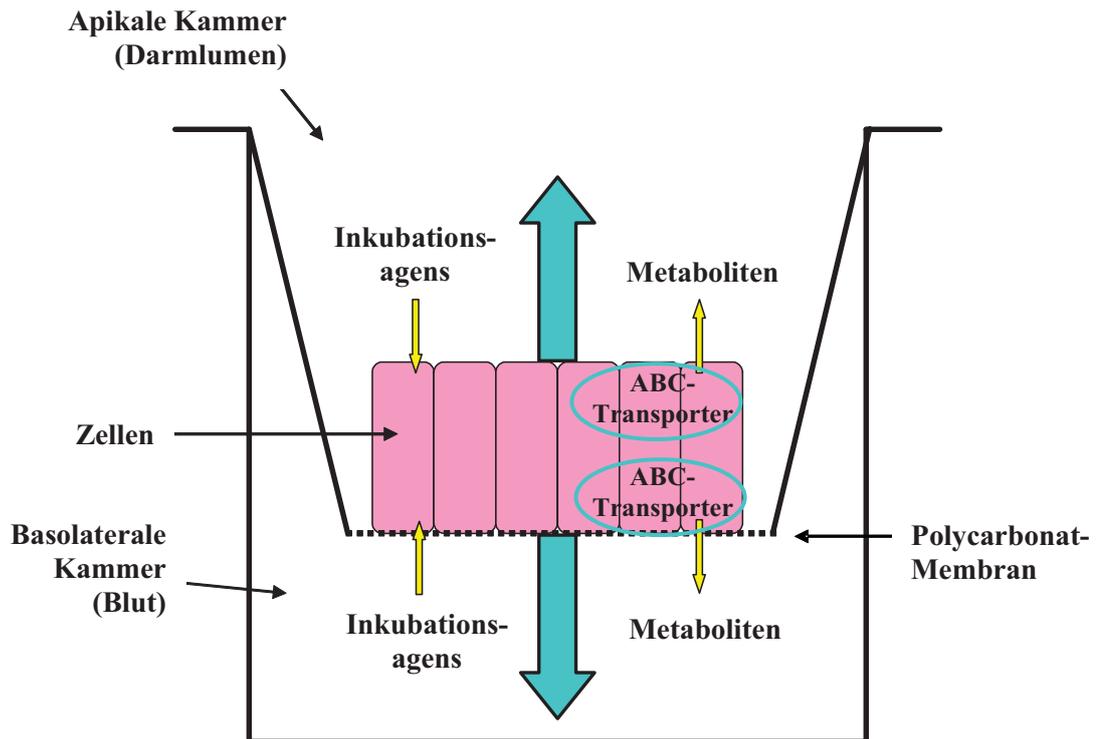


Abbildung 6: Schema des TranswellTM-Systems: Zugabe des Inkubationsagens in die apikale und in die basolaterale Kammer mit anschließender Bildung und Exkretion der jeweiligen Metaboliten

1.8 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie repräsentiert eine sensitive und selektive Technik für das Screening biologischer Matrices und die Identifizierung und Bestimmung ihrer Metaboliten. Hierbei hat sich zur Untersuchung nicht-flüchtiger Analyten die Kopplung mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bewährt. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Messung ist jedoch die Ionisierbarkeit der Moleküle. Das Grundprinzip der Massenspektrometrie basiert auf der Bildung und der Detektion von Ionen, welche Auskunft über die Molekülmasse und die Zusammensetzung unbekannter Substanzen geben können (Willoughby 1997; Niessen 1999). In Abbildung 7 sind das Grundprinzip und die Funktionsweise eines Massenspektrometers schematisch dargestellt. Ein Massenspektrometer setzt sich zusammen aus den Komponenten Probeneinlasssystem, Ionisationseinheit, Massenanalysator sowie Massendetektor. Die zu untersuchende Probe gelangt von der HPLC-Säule zunächst in die Probeneinlasskammer, in der sie in gasförmige Ionen überführt wird. Durch eine elektrische Beschleunigungsspannung wird der zuvor gebildete Ionenstrahl in den Massenanalysator geführt und nach dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) aufgetrennt. Anschließend erfolgt im Detektorsystem eine Anzeige der Ionen als Massenspektrum. Dieses zeigt die relativen Signalintensitäten gegen das m/z -Verhältnis an. Aufgrund eines Hochvakuums im Inneren des Massenspektrometers werden Kollisionen der gebildeten Ionen

mit Luftmolekülen verhindert, wodurch sich ihre Flugbahn stabilisiert. Die Unterschiede der einzelnen Massenspektrometer-Typen basieren hauptsächlich auf verschiedenen Massenanalysatoren und Massendetektoren.

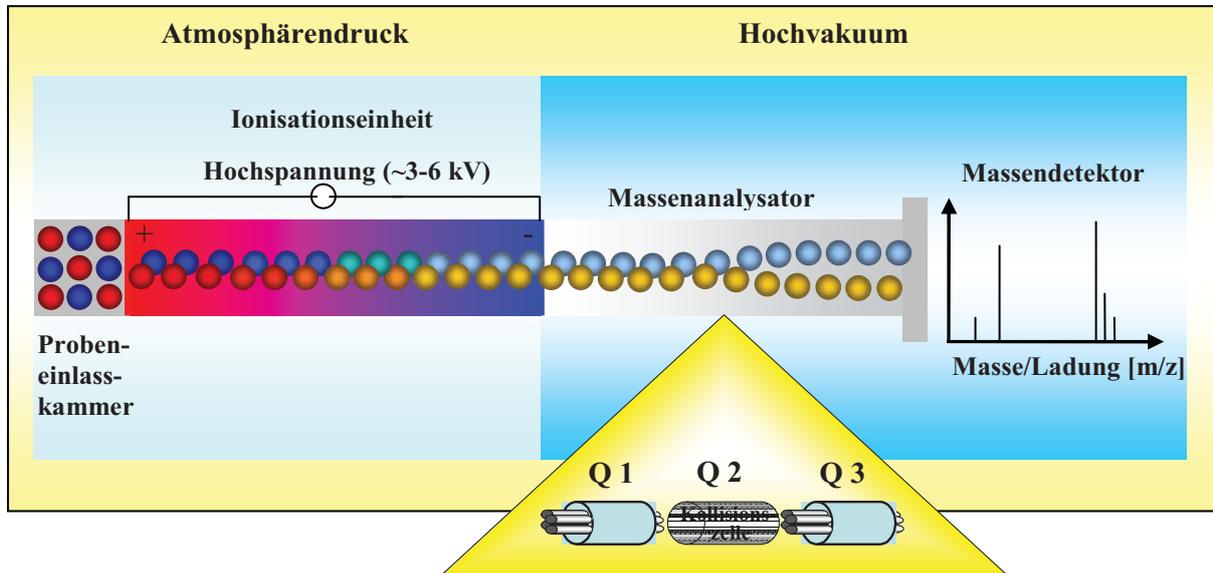


Abbildung 7: Aufbau und Funktionsweise eines Massenspektrometers, Q = Quadrupol

Darüber hinaus existieren unterschiedliche Ionisierungstechniken für die Massenspektrometrie. Die *Electrospray Ionisation* (ESI)-Methode stellt eine schonende Methode für die Analyse polarer Substanzen dar. Für die Arbeiten im Rahmen der ESI-Technik bekam Fenn im Jahre 2002 den Nobelpreis für Chemie aufgrund der Anwendbarkeit der Massenspektrometrie für Biomoleküle und die gleichzeitige Bedeutung der *omics* (*genomics*, *transcriptomics*, *proteomics*, *metabonomics*)-Analytik (Fenn 2003). Bei der ESI-Technik werden die im Eluenten vorhandenen Substanzen voneinander und von den Matrixbestandteilen getrennt, versprüht und ionisiert. Hierbei erfolgt eine Umformung der Analyten-Ionen in Lösung zu Analyten-Ionen in der Gasphase. Die Ionisierbarkeit bestimmter Gruppen in den Analyten kann durch Zusatz geringer Konzentrationen schwacher Säuren wie Ameisensäure oder Essigsäure beziehungsweise flüchtiger Puffer wie Ammoniumacetat oder -formiat zum Eluenten unterstützt werden.

Bei Anwendung der ESI-Ionisierung passiert die Probe mit dem Eluentenstrom eine *Electrospray*-Nadel, die unter Hochspannung gehalten wird. Dadurch wird ein feiner Nebel geladener Tröpfchen erzeugt, aus welchen durch Trocknung und nachfolgenden *Coulomb*-Explosionen Ionen unter Atmosphären-Druck gebildet werden. Zusätzlich werden Hilfsgase (Stickstoff) eingesetzt, um den Zerstäubungsprozess beziehungsweise die Vernebelung der mobilen Phase zu unterstützen. Die gebildeten Molekül-Ionen werden in den Massenanalysator durch Anlegen geeigneter Potentialdifferenzen geführt. An den dort befindlichen Quadrupolen kann bei fest eingestellten Spannungen ein Feld erzeugt werden, in

dem nur ausgewählte m/z -Werte in einer stabilen Flugbahn zwischen den Quadrupolstäben gehalten werden. Alle anderen m/z -Verhältnisse erleiden eine instabile Flugbahn und werden abgelenkt (Niessen 1999). Somit kann ein Massenspektrum (MS-Spektrum) aufgenommen werden, welches in Abbildung 8 beispielhaft für das Glutathion dargestellt ist.

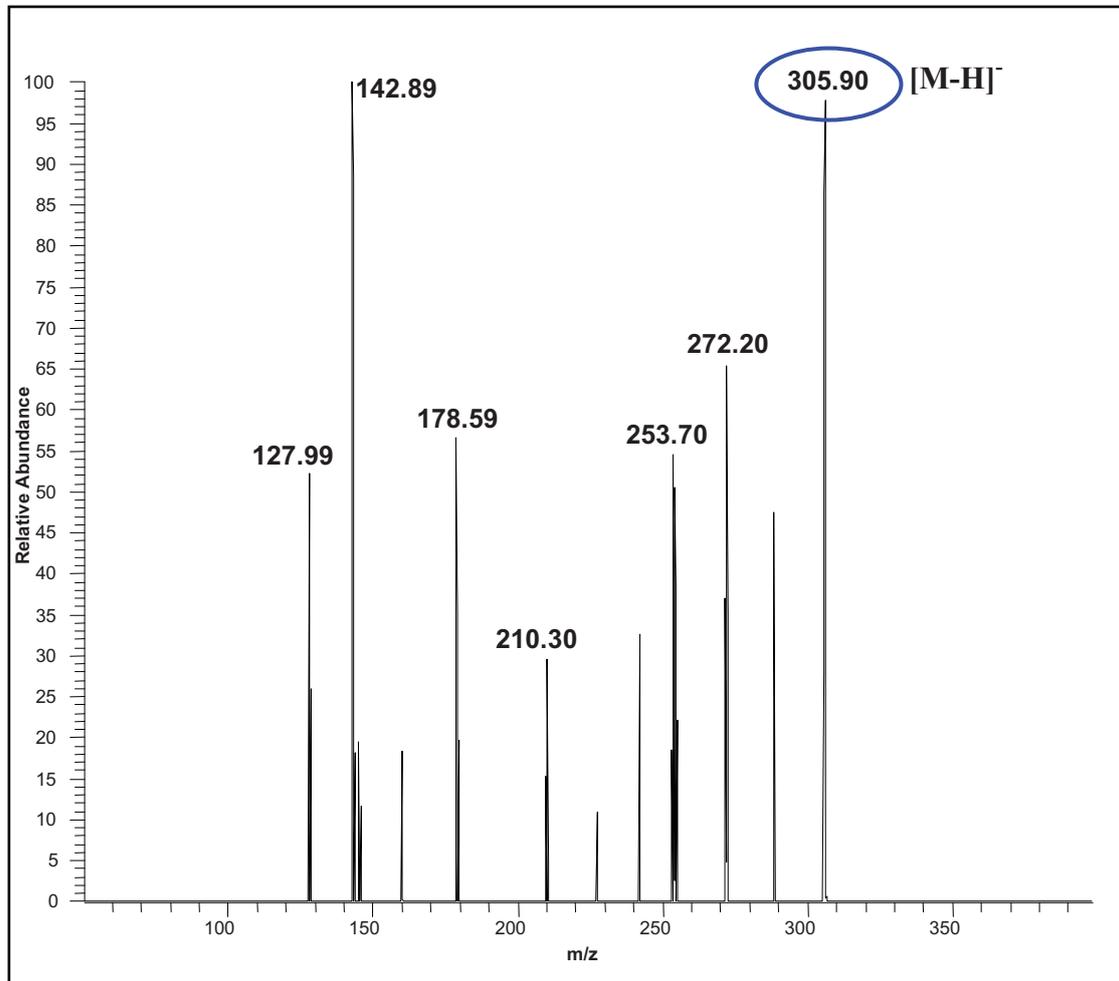


Abbildung 8: MS-Spektrum von Glutathion bei negativer Ionisierung

Um eine höhere Empfindlichkeit zu erhalten, werden in der quantitativen Analytik Quadrupole hintereinander geschaltet (Tandem-Massenspektrometrie, LC-MS/MS). Die in der Quelle gebildeten Ionen werden zunächst durch einen Quadrupol (Q0) fokussiert. Im ersten Quadrupol (Q1) wird dann die Masse des Molekül-Ions oder eines Adduktes, welches durch die Ionisierung bei Atmosphärendruck gebildet wurde, herausgefiltert. Danach passiert das selektierte Molekül-Ion eine Kollisionszelle (Q2), in der sich ein Stoßgas befindet (Kollisions-induzierte Dissoziation, *Collision Induced Dissociation*, CID). Bei ausreichend hoher Energie zerfällt das Molekül-Ion nach einem Stoß mit dem Kollisionsgas in ein Fragment (Produkt-Ion), das im nachgeschalteten Quadrupol (Q3) erneut gefiltert wird. Als Kollisionsgase werden inerte Gase (Argon, Stickstoff) verwendet, wodurch eine Übertragung der Ladung verhindert wird. Die gewählte Stoßenergie bestimmt das entstehende Produkt-Ion

maßgeblich, so dass dieser Parameter zum Erhalt einer hohen Ionenausbeute einer Optimierung unterliegt.

Die ESI-Ionisierung lässt sowohl die Aufnahme positiver als auch negativer Ionenspektren zu. Generell bilden saure Moleküle in Lösung negative Ionen, basische Moleküle ergeben hingegen positive Ionen. So ist beispielsweise eine höhere Empfindlichkeit bei der Analytik von Mercaptursäuren im negativen verglichen mit dem positiven Ionisierungsmodus in der Literatur beschrieben. Mit negativer ESI-Ionisierung wurden von Styrol-Mercaptursäuren doppelt so hohe Intensitäten erhalten wie im positiven Ionisierungsmodus. Des Weiteren ließ sich feststellen, dass die Bestimmung mit einer *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI)-Quelle um den Faktor 50 unempfindlicher war als bei Verwendung der ESI-Quelle (Manini *et al.* 2000).

Gelegentlich unterliegen biologische Matrizes im Rahmen der LC-MS-Analytik dem Phänomen der Ionensuppression. Hierbei kommt es aufgrund einer vorübergehenden Unterdrückung der Ionisierung der Analyten zu einer geringeren Signalintensität (Bottcher *et al.* 2007). Diesem Vorgang kann jedoch durch die Verwendung interner Standards entgegengewirkt werden.

Unterschieden wird bei der Massenspektrometrie zwischen verschiedenen Aufzeichnungsmodi, die je nach gewünschter Information zu den Proben und den enthaltenen Analyten ausgewählt werden. So gibt es den Scan-Modus, der in einem festgelegten Massenbereich die Anzahl an Ionenspuren aufzeichnet und aus der Summe dieser Ionenspuren den Totalionenstrom (*Total Ion Current*, TIC) berechnet. Darüber hinaus existiert der *Selected Ion Monitoring*-Modus (SIM), der bei höherer Empfindlichkeit und unter Verlust der Spezifität eine Einzelionenaufzeichnung ausgewählter Massen vornimmt. Außerdem gibt es verschiedene Modi mit höherer Sensitivität, bei denen neben dem Quadrupol 1 auch die Kollisionszelle Q2 und der Quadrupol 3 für die Analytik genutzt werden und dieser Prozess folglich als LC-MS/MS Analytik bezeichnet wird. Diese Modi wurden bereits von Manini *et al.* (2006) zur Bestimmung von Phase-I- und Phase-II-Metaboliten angewendet und aufgrund der lediglich geringen Notwendigkeit der Probenvorbereitung eingesetzt. Zu diesen Modi zählen der *Selected Reaction Monitoring*-Modus (SRM), der *Daughter (Product) Scan*-Modus (DAU), der *Parent (Precursor) Scan*-Modus (PAR) sowie der *Constant Neutral Loss*-Modus (CNL) (Abb. 9).

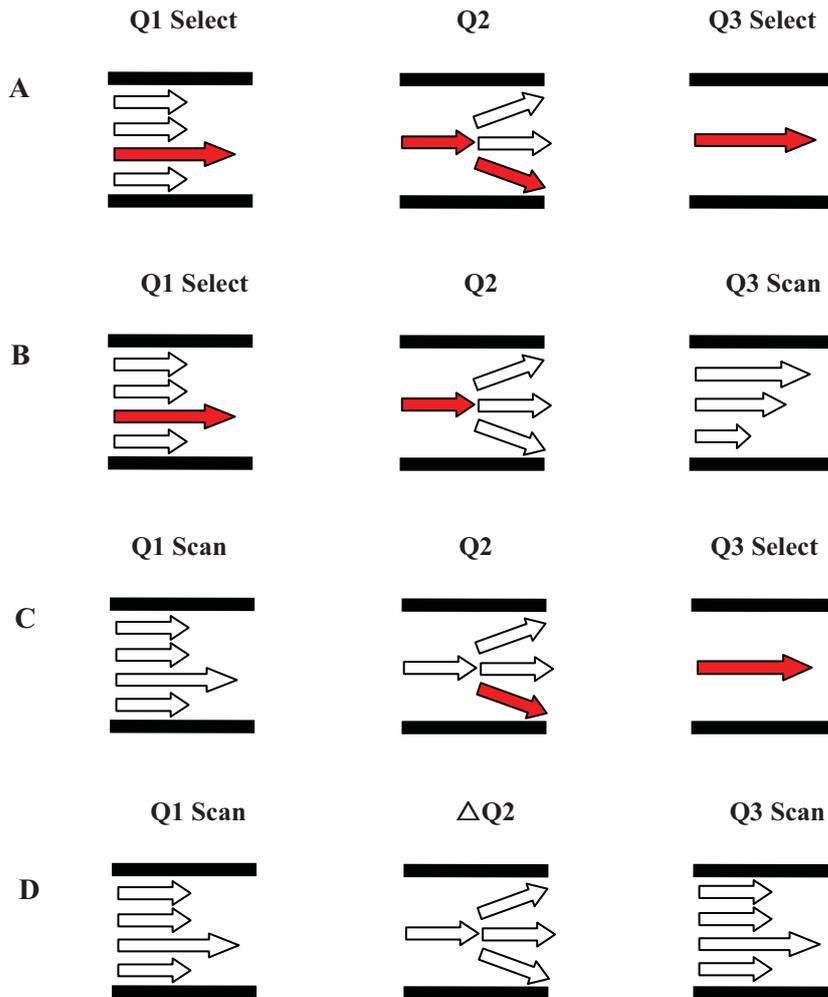


Abbildung 9: Scan-Modi der LC-MS/MS: (A) SRM-Modus, (B) DAU-Modus, (C) PAR-Modus, (D) CNL-Modus, verändert nach Manini *et al.* (2006)

Im SRM-Modus wird eine bestimmte Reaktion, wie die Fragmentierung eines Ions oder die Abspaltung eines Restes, aufgenommen. Wie die SIM-Methode erlaubt die SRM-Methode eine Analyse von Spurenkomponenten in komplexen Matrices. Jedoch kann mittels SRM-Modus durch die Auswahl zweier Ionen eine höhere Spezifität erzielt werden als durch Einsatz des SIM-Modus. Die für den ersten Schritt der Massenanalyse ausgewählten Ionen werden auch als *Parent*-Ionen bezeichnet, während die nach Fragmentierung gebildeten Ionen *Daughter*-Ionen genannt werden. Jede interferierende Substanz müsste nicht nur ein *Parent*-Ion desselben m/z -Verhältnisses wie das Ion des Analyten bilden, sondern dieses *Parent*-Ion müsste ebenso wie der Analyt fragmentieren und ein *Daughter*-Ion desselben m/z -Verhältnisses ergeben.

Im DAU-Modus werden im ersten Schritt nur die gebildeten Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses durch den ersten Quadrupol (Q1) gelassen. Diese Ionen passieren dann Q2, welcher von der Kollisionszelle umgeben ist. Dort können die Ionen durch Kollision mit Argon zu *Daughter*-Ionen fragmentiert werden, die dann Q3 erreichen und dort ein

entsprechendes Massenspektrum liefern. Dieser Analytik-Modus eignet sich zur Untersuchung charakteristischer Fragmente einer zu identifizierenden Substanz.

Der PAR-Modus besteht ebenfalls aus zwei Analyseschritten. Zunächst gelangen die in der Ionenquelle gebildeten Ionen in den Q1 und passieren dann die Kollisionszelle, in der eine Fragmentierung der Ionen mit Argon ablaufen kann. Anschließend erreichen die durch Fragmentierung gebildeten Ionen den Q3, durch welchen jedoch nur Ionen eines definierten m/z -Verhältnisses hindurchgeleitet werden. Das resultierende Massenspektrum zeigt folglich alle *Parent*-Ionen, die beim Fragmentieren das ausgewählte *Daughter*-Ion ergeben. In der Literatur wird für die Analytik von Glucuroniden bei negativer Ionisierung ein charakteristisches *Daughter*-Ion von m/z 113 beschrieben (Lutz *et al.* 2006; Lutz *et al.* 2008) und für die Untersuchung von Sulfaten werden *Daughter*-Ionen von m/z 80 sowie 97 angeführt (Lafaye *et al.* 2004), die für Messungen im PAR-Modus verwendet werden können. Beim CNL-Modus sind Q1 und Q3 verbunden, indem sie mit der gleichen Scan-Rate über einen Massenbereich der gleichen Breite scannen. Diese beiden Massenbereiche sind jedoch um eine ausgewählte Masse versetzt, so dass Q3 mit einer ausgewählten Anzahl von Massen niedriger scannt als Q1. Diese Einstellung kann gewählt werden, wenn eine bestimmte Substanzklasse, zum Beispiel ein für alle Mitglieder dieser Klasse charakteristisches Fragment, vom Molekül abspaltet. In diesem Fall ist ein Screening von unbekanntem Proben durch Wahl eines „*Constant Neutral Loss*“-Fragments möglich (ThermoQuest 1999; Manini *et al.* 2006). Eine Anwendung des CNL wird in der Literatur zum Beispiel für Mercaptursäuren beschrieben, wobei es zu einem Neutralverlust von m/z 129 im negativen Ionisierungsmodus kommt (Jones *et al.* 1993; Manini *et al.* 2000; Scholz *et al.* 2005).

Massenspektrometrische Datenbanken zur Identifizierung von Substanzen unbekannter m/z -Verhältnisse, wie sie zum Beispiel für die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) etabliert sind, stehen für die LC-MS bisher nur in begrenztem Maße zur Verfügung (Smith *et al.* 2005).

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen analytische Methoden etabliert werden, die eine Bestimmung von Glutathionkonjugaten sowie von Mercaptursäuren bedeutsamer kanzerogener polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe und ubiquitär auftretender Kontaminanten wie Benzol und Toluol erlauben. Eine Fokussierung auf die Metaboliten der genannten Substanzen soll die Identifizierung und Quantifizierung potentieller Biomarker toxikologisch relevanter Ausgangsstoffe ermöglichen.

Dabei basiert das analytische Konzept auf zwei Ebenen: Die erste Ebene besteht aus einer zellulären *in-vitro*-Analytik der im metabolischen Ablauf primär gebildeten GSH-Konjugate, während die zweite Ebene eine *in-vivo*-Analytik der sekundär entstehenden Mercaptursäuren im Urin beinhaltet. Da die Biosynthese von Mercaptursäuren unmittelbar aus den zuvor gebildeten GSH-Konjugaten erfolgt, stellt die Untersuchung der beiden Bereiche GSH-Konjugat- sowie Mercaptursäure-Analytik eine sinnvolle Ergänzung sowie einen relevanten Bereich der Verwendung von Biomarkern dar.

Die Exposition mit exogenen Faktoren wie Lebensmittelkontaminanten sowie Umwelteinflüssen und endogenen Faktoren wie oxidativem Stress ist eine Voraussetzung für die Bildung chemisch reaktiver Metaboliten im menschlichen Organismus durch bestimmte Enzymsysteme. Die elektrophilen Intermediate sind oft verantwortlich für intrazelluläre Bindungen an Makromoleküle wie Proteine und DNA, wodurch Krankheiten ausgelöst werden können. Die Konjugation mit Glutathion sowie die sich anschließende Umsetzung zu den jeweiligen Mercaptursäuren und deren Ausscheidung über den Urin stellen entscheidende metabolische Detoxifizierungsschritte dar. Das Resultat dieser Detoxifizierungsreaktionen kann folglich als Indikator im Sinne eines Belastungsmarkers dienen und der analytische Nachweis kann zur Bewertung dieser Entgiftungsreaktionen beitragen.

Das Zusammenspiel des Cytochrom-P450-Systems mit Glutathion-S-Transferasen und ABC-Transportproteinen ist als biochemische Barriere gegenüber toxikologisch bedeutsamen Substanzen ein wichtiger Bestandteil in der Mucosa des Darms. Primäres Ziel diesbezüglich ist die Untersuchung eines postulierten Transportes von GSH-Konjugaten aus Caco-2-Zellen in das umgebende Medium. Bisher ließen sich derartige Transportvorgänge beispielsweise mittels radioaktiver Markierung der potentiellen Analyten verfolgen (Verhoef *et al.* 1982; Meisenhelder und Semba 2001; Buesen *et al.* 2003). Die zu etablierende Analytik hingegen soll ohne radioaktiv markierte Stoffe auskommen und dennoch den sensitiven Nachweis ausgewählter Transportvorgänge erbringen. Im Falle der Bestätigung einer Exkretion soll diese durch ausgewählte Substanzen im Sinne einer Induktion oder Inhibition moduliert werden. Hierbei besteht die Intention darin, die verantwortlichen Transporter für die Überführung der GSH-Konjugate von der Zelle in das Medium zu identifizieren und durch Lebensmittelinhaltsstoffe oder potentielle Lebensmittelzusatzstoffe diesen Transport durch die biochemische Barriere beeinflussen zu können.

Dementsprechend werden folgende Versuchsansätze geplant: Es werden Caco-2-Zellen mit den jeweiligen metabolischen Vorstufen der GSH-Konjugate, den Dihydrodiolen oder Dihydrodiolepoxiden, der PAK B[a]P, DB[a,l]P und B[c]Phe inkubiert. Es wurden solche PAK ausgewählt, deren Struktur-Aktivitäts-Beziehungen eine deutliche biologische Wirkung erwarten lassen. Während B[a]P eine Bay-Region als Strukturmerkmal für eine kanzerogene Wirkung hat, sind es bei DB[a,l]P und B[c]Phe Fjord-Regionen. Die Substanzen gehören jeweils einer der drei IARC-Gruppen zur Klassifizierung von PAK entsprechend ihrer krebserregenden Wirkung an (Kapitel 1.2). Nach erfolgter Inkubation mit den Metaboliten wird eine Untersuchung des Mediums vorgenommen, um einen möglichen Transport des GSH-Konjugates aus der Zelle ins Medium zu detektieren. Parallel dazu erfolgt ebenfalls eine Bestimmung der Konjugat-Konzentrationen im Zellextrakt, um eine Vergleichbarkeit beider Milieus vollziehen zu können. Eine Ermittlung der Stabilität von GSH-Konjugaten im Medium und im Zellextrakt ist darüber hinaus von Bedeutung, um mögliche Zersetzungsreaktionen zu minimieren.

Die Identifizierung des oder der verantwortlichen Transporter für die postulierte GSH-Konjugat-Ausschleusung aus der Zelle ins umgebende Medium soll anhand von Inkubationen mit ausgewählten Hemmstoffen aufgeklärt werden. Zur Untersuchung einer potentiellen Induktion der Exkretion durch die intestinale biochemische Barriere sollen Lebensmittelinhaltsstoffe wie Flavonoide, beziehungsweise chemoprotektiv wirksame Substanzen wie Oltipraz, als prä-Inkubationsmittel verwendet werden. Den genannten Substanzen wird eine Induktion von GSTs und folglich ein positiver Effekt bezüglich der Förderung von Detoxifizierungsreaktionen zugesprochen. Die Ergebnisse dieser Experimente mit potentiellen antikanzerogenen Lebensmittelinhaltsstoffen könnten einen Beitrag zum Verständnis von Schutzmechanismen vor toxischen Substanzen im Bereich der Darmmucosa leisten.

Eine grundlegende Voraussetzung für die genannten Untersuchungen ist die Etablierung von spezifischen und empfindlichen analytischen Methoden und vorgeschalteten Probenvorbereitungen (*Clean-Up*), welche die Quantifizierung der GSH-Konjugate auch in komplexen Matrices erlauben. Zunächst steht die Etablierung einer Aufreinigungsprozedur der unterschiedlichen Probenmatrices an, wofür sich die Festphasenextraktion (*Solid Phase Extraction*, SPE) anbietet. Als instrumentelle Methode wird die LC-MS/MS gewählt, die auch bei komplexen biologischen Matrices wie Zellkulturproben und Urin eine hohe Selektivität und Sensitivität gewährleistet. Zusätzlich zur Entwicklung der *Clean-Up*- und Quantifizierungsmethoden spielt die Aufklärung des jeweils spezifischen massenspektrometrischen Verhaltens von GSH-Konjugaten eine wichtige Rolle bei der Identifizierung der Analyten.

Bei Inkubationen von Caco-2-Zellen mit den Dihydrodiolen und Dihydrodiolepoxiden der ausgewählten PAK ist der Stoffwechselweg zur Bildung der GSH-Konjugate vorgegeben. Ergänzende Untersuchungen von Inkubationen mit B[a]P, DB[a,l]P und B[c]Phe sollen zur

Orientierung einer möglichen GSH-Konjugat-Bildung aus den Mutterkohlenwasserstoffen dienen und eine Bewertung des jeweiligen Gesamtmetabolitenprofils ermöglichen.

Ein bereits erwähntes zusätzliches Ziel ist die Etablierung einer LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Mercaptursäuren, die vom jeweils gleichen Ausgangsmolekül wie die GSH-Konjugate stammen. Die geplanten Arbeiten sollen sich dabei auf Mercaptursäuren von Xenobiotika konzentrieren, insbesondere der VOC Benzol und Toluol sowie PAK mit hoher Flüchtigkeit wie Naphthalin. Von diesen Fremdstoffen ist aus der Literatur bekannt, dass ihre Stoffwechselprodukte im Urin bestimmt werden können. Im Gegensatz dazu eignen sich die für die Analytik auf *in-vitro*-Ebene ausgewählten PAK nicht zur Bestimmung im Urin, da Metaboliten höherer PAK meist über die Faeces ausgeschieden werden.

Da besonders Zigarettenrauch hohe Mengen der selektierten VOC (im μg -Bereich pro Zigarette) enthält (Ding *et al.* 2009) und eine Erhöhung reaktiver Intermediate im Organismus bewirkt, sollen Urine von Rauchern und Nichtrauchern vergleichend untersucht werden. Dabei repräsentiert diese Technik eine nicht-invasive Analytik, die zu Detoxifizierungsuntersuchungen im Sinne eines Biomonitorings herangezogen werden kann.

Darüber hinaus ist eine qualitative Untersuchung auf unbekannte Mercaptursäuren anhand Mercaptursäure-spezifischer Kenngrößen in der massenspektrometrischen Analytik vorstellbar. Bei erfolgreichem Nachweis dieser Biomarker kann so möglicherweise auf die ursprünglichen lebensmittel- und umweltrelevanten Fremdstoffe geschlossen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

- HPLC-Anlage:
Thermo Finnigan, San Jose, USA: Spectra System P 4000 (Pumpe)
Spectra System AS 3000 (Autosampler)
Spectra System UV 6000 LP (UV-Detektor)
Spectra Systems FL 3000 (Fluoreszenz-Detektor)
Software: Chromquest Version 2.51
- HPLC-Säulen:
Reprosil-Pur C18-AQ, 150 mm x 2 mm, 5 µm, Vorsäule: Reprosil-Pur C18-AQ,
10 mm x 2 mm, 5 µm, Maisch GmbH, Ammerbuch;
Bakerbond PAK-16 Plus, 250 mm x 3 mm, 5 µm, Vorsäule: 20 mm x 3 mm, 5 µm,
J.T. Baker, Deventer, Niederlande
- Massenspektrometer TSQ 7000 Series Systems API2, LC-MS/MS, Thermo Finnigan,
San Jose, USA
Software: X-Calibur
- Kompressor 2000-40 BS, Jun-Air Deutschland GmbH, Ahrensburg, Germany
- Stickstoff Generator ECO 2-ESP, DWT, Essen, Germany
- SPE-Kartuschen (*Glass Empty*, 8 ml, PTFE *frits*, J.T. Baker), Deventer, Niederlande
- SPE-Kartuschen (Oasis MAX, 30 µM, 6cc-150 mg), Waters, Eschborn
- HPLC-Vials (*Amber Screw Top Vial with 6.00 mm ID, Red PTFE/Silicone Septa*,
2 ml), Supelco, Taufkirchen
- Glas-Einsätze für HPLC-Vials (*Glass Insert with Kim-Spring*, 0.2 ml), Supelco,
Taufkirchen
- Mikrowaage SC 2 (Max 2,1 g), Sartorius AG, Göttingen
- Waage Atilon (Max 2200 g), Acculab Sartorius Group, Göttingen
- Rotationsverdampfer Rotavapor-R, Büchi Labortechnik GmbH, Essen
- Vortex (Heidolph Reax 2000), Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
- Finnpipetten (0,5-10 µl, 5-40 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl), Labsystems GmbH,
Quickborn
- Einkanalpipetten, 0,5-2500 µl, Eppendorf, Hamburg
- Schüttelwasserbad, GFL 1083, Walter F.C. Ebel, Hamburg
- 6- bis 96-*well* Platten, Greiner bio-one, Frickenhausen
- Absaugvorrichtung, neoLab Migge Laborbedarf, Berlin
- CO₂-Inkubator, Heraeus, Hanau
- Falcons, 15 ml und 50 ml, Fischerbrand, Schwerte

- Multifuge 1S-R, Heraeus, Hanau
- Nalgene Kryoröhrchen, VWR International, Darmstadt
- Nalgene Einfriercontainer, VWR International, Darmstadt
- Pasteurpipetten, VWR International, Darmstadt
- Pipettierhilfe Easypet, Eppendorf, Hamburg
- TEER-Messgerät: EVOM, WPI (World Precision Instruments), Berlin
- Transwell™-Platten, Fisher Scientific, Nidderau
- Wasserbad, GFL, Burgwedel
- Wheaton Probenfläschchen, Braunglas 4 mlneoLab Migge Laborbedarf, Berlin
- Zellkulturflaschen, Greiner bio-one, Frickenhausen
- Zellschaber, Greiner bio-one, Frickenhausen

3.1.2 Chemikalien

- Lösungsmittel mit HPLC-Qualität:
Methanol Baker HPLC Analyzed, J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Wasser Baker HPLC Analyzed, J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Acetonitril Baker HPLC Analyzed, J.T. Baker, Deventer, Niederlande
- Ameisensäure 98-100 % zur Analyse, Merck, Darmstadt
- Schwefelsäure 95-97 % zur Analyse, Merck, Darmstadt
- Natriumhydroxid Plätzchen zur Analyse, Merck, Darmstadt
- Ammoniak 25 % *reagent grade*, Scharlau Chemie S. A., Barcelona, Spanien
- Reinstgase Stickstoff 5.0, Argon 5.0 und Helium 5.0, Air Liquide, Düsseldorf
- Bakerbond C₁₈ 40 µm Prep LC Packing, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
- β-Glucuronidase/Arylsulfatase (*from Helix pomatia*), β-Glucuronidase (*from E.coli* K 12), Arylsulfatase (*from Helix pomatia*), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- *L-Glutathione reduced*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- Butylhydroxytoluol (BHT), Fluka AG, Steinheim
- Ko143, Prof. A.H. Schinkel. Krebsforschungsinstitut der Niederlande, Amsterdam, Niederlande
- MK571 Natriumsalz, Merck, Darmstadt
- Oltipraz, McKesson Bioservices, San Francisco, USA
- Quercetin, Sigma, Deisenhofen
- Butyrat, Sigma, Deisenhofen
- Benzo[*k*]fluoranthen, Community Bureau of Reference (BCR), Belgien
- Trypsin-EDTA, PAA, Cölbe
- DMEM mit L-Glu und Na-Pyruvat, PAA, Cölbe
- Fötale Kälberserum (*fetal calf serum*), PAA, Cölbe
- Penicillin/Streptomycin (100 x), PAA, Cölbe

3.1.3 Referenzsubstanzen

- Benzo[*a*]pyren, Community Bureau of Reference (BCR), Belgien
- Benzo[*a*]pyren-Metaboliten (Phenole, Diole, Tetrol, BPDE und BPD-SG), Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Großhansdorf
- Dibenzo[*a,l*]pyren, Community Bureau of Reference (BCR), Belgien
- Dibenzo[*a,l*]pyren-Metaboliten (Diole, Tetrol, DBPDE und DBPD-SG), Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Großhansdorf
- Benzo[*c*]phenanthren, Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Großhansdorf
- Benzo[*c*]phenanthren-Metaboliten (Phenole, Diole, Tetrol, BcPheDE und BcPheD-SG), Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Großhansdorf
- 1-Methylpyrenyl-SG, Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Großhansdorf
- Perylen, Fluka AG, Buchs, Schweiz
- *S*-Naphthylmercaptursäure (*N*-Acetyl-*S*-naphthyl-L-cystein), Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Großhansdorf
- DL-*S*-Phenylmercaptursäure (*N*-Acetyl-*S*-phenyl-DL-cystein), TCI Europe, Zwijndrecht, Belgien
- *S*-Phenyl-*d*₅-mercaptursäure (*N*-Acetyl-*S*-phenyl-*d*₅-L-cystein), Toronto Research Chemicals Inc., Ontario, Kanada
- *S*-Benzylmercaptursäure (*N*-Acetyl-*S*-benzyl-L-cystein), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

3.1.4 Arbeitslösungen

- HPLC-Eluenten (Methanol + 0,1 % Ameisensäure, Wasser + 0,1 % Ameisensäure)
- Pufferlösung Natriumacetat-Essigsäure (je 2 N; pH 5,5; für die Enzymspaltung mit β -Glucuronidase und Arylsulfatase)

3.2 Zellkultur

Die Caco-2-Zellen wurden im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) kultiviert, für Metabolismus- und Transportuntersuchungen inkubiert und bis zur Analyse im Biochemischen Institut für Umweltcarcinogene (BIU) in Glasgefäßen bei -20 °C gelagert. Zur Kultivierung der Zellen diente ein CO₂-Inkubator, der bei einer Temperatur von 37 °C, einer relativen Luftfeuchte von 95 % sowie einem CO₂-Gehalt von 5 % betrieben wurde. Alle erforderlichen Arbeitsschritte erfolgten unter einer Sterilwerkbank.

3.2.1 Kultivierung

Die Kultivierung der Zelllinie Caco-2 (European Collection of Cell Cultures, Porton Down, UK) erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM mit 4,5 g Glucose, Na-Pyruvat und L-Glutamin). Zusätzlich wurden 10 % (v/v) fötales, hitzeinaktiviertes

Kälberserum (FCS) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (P/S)-Lösung zum Medium gegeben. Um das Zuwachsen des Zellmonolayers zu unterbinden, wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80 bis 90 % passagiert, das heißt, die Zellen wurden auf ein Viertel beziehungsweise ein Fünftel ihrer Zellzahl verdünnt. Im Abstand von zwei bis drei Tagen wurde das Medium erneuert. Die Caco-2-Zellen wurden zum Ausdifferenzieren in unterschiedlichen Zellkulturplatten und -flaschen ausgesät. Für alle Inkubationsexperimente dienten ausschließlich ausdifferenzierte Caco-2-Zellen.

3.2.2 Inkubationen von Caco-2-Zellen

Zur Analytik der Bildung und des Transportes von Phase-I- und Phase-II-Metaboliten wurden Caco-2-Zellen nach dem Erreichen der Konfluenz für drei Wochen in 75 cm² Zellkulturflaschen oder im TranswellTM-System kultiviert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle zwei bis drei Tage. Zur Inkubation mit den Testsubstanzen wurde DMEM-Medium supplementiert mit 1 % ITS und 1 % P/S verwendet. Die PAK oder PAK-Metaboliten wurden in DMSO gelöst und diese Lösungen bei -20 °C gelagert.

Die Caco-2-Zellen einer konfluenten 75 cm² Zellkulturflasche wurden auf zwei TranswellTM-Platten mit jeweils sechs *Wells* ($A = 4,71 \text{ cm}^2$) ausgesät und für drei Wochen kultiviert. Der Austausch des Mediums erfolgte alle zwei Tage und die PAK beziehungsweise PAK-Metaboliten wurden in Triplikaten in beide Kompartimente gegeben. Nach Inkubationsende wurde das Medium aus beiden Kammern entnommen und bis zur anschließenden Analytik bei -20 °C gelagert.

3.2.3 Induktion des Fremdstoffmetabolismus

Um die Expression der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme und der Transportproteine zu beeinflussen, wurden die Caco-2-Zellen für 48 h mit verschiedenen Induktoren behandelt. Die Caco-2-Zellen wurden drei Wochen in 75 cm² Zellkulturflaschen oder aber im TranswellTM-System kultiviert und im Anschluss daran mit den Induktoren in folgenden Konzentrationen behandelt: Oltipraz wurde in einer Konzentration von 50 µM, Butyrat von 5 mM und Quercetin von 50 µM zu den Caco-2-Zellen hinzugegeben. Für ausgewählte Inkubationsversuche mit den PAK-Mutterkohlenwasserstoffen wurden Vorinkubationen mit 5 µM Benzo[*k*]fluoranthren (B[*k*]F) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen PAK oder ihren Metaboliten, wobei parallel Kontrollansätze aus mit 0,1 % DMSO behandelten Zellen hergestellt wurden.

Nach Ende der Inkubationszeit erfolgte die Abnahme der Überstände aus den apikalen und basolateralen Kompartimenten des TranswellTM-Systems beziehungsweise aus den 75 cm² Zellkulturflaschen. Der Zellmonolayer der Zellkulturflaschen wurde anschließend mit PBS gewaschen und in Methanol aufgenommen. Bis zur Analytik wurden die erhaltenen Medienüberstände sowie die Zelllysate bei -20 °C gelagert.

Abbildung 10 zeigt die Strukturformeln von Quercetin, Oltipraz, Butyrat sowie B[k]F.

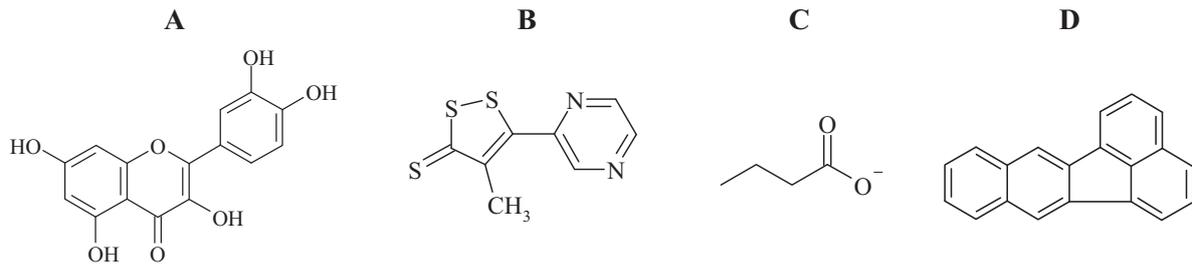


Abbildung 10: (A) Quercetin, (B) Oltipraz, (C) Butyrat und (D) Benzo[k]fluoranthen (B[k]F)

3.2.4 Inhibierung von Transportproteinen

Ziel war es, die an der Exkretion der GSH-Konjugate beteiligten Transportproteine zu identifizieren. Hierzu erfolgte eine einstündige Inkubation mit den Inhibitoren der Transportproteine vor Zugabe der jeweiligen PAK. Der BCRP-spezifische Inhibitor Ko143 wurde in einer Konzentration von 5 μM zu den Caco-2-Zellen zugegeben, der unspezifische MRP-Inhibitor MK571 hingegen in einer Konzentration von 50 μM . Die Strukturformeln der verwendeten Inhibitoren sind in Abbildung 11 aufgeführt.

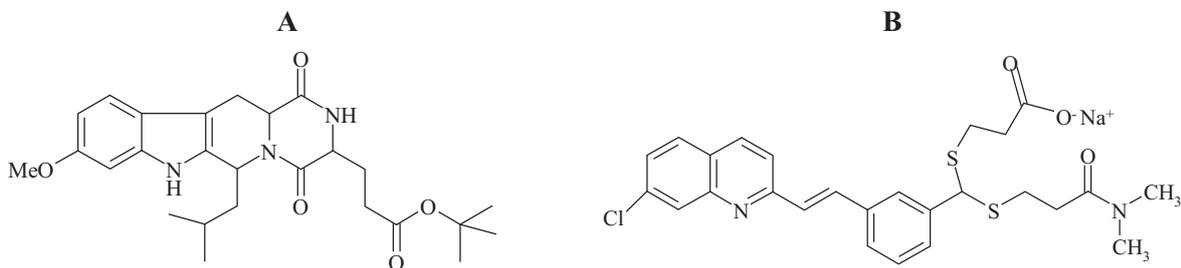


Abbildung 11: (A) Ko143, (B) MK571

3.3 Methodvalidierung

Die Validierungsparameter sollten mit einer biologischen Leermatrix (*Blank*-Proben) bestimmt werden, welche die zu quantifizierenden Analyten ursprünglich nicht enthält. Dies ist bei Zellextrakten und Medienproben möglich, bei Urinproben hingegen ist diese Voraussetzung nicht immer gegeben. Sämtliche Validierungsmethoden basieren auf Vorschlägen der *Food and Drug Administration* (FDA) (FDA 2001) sowie von Causton (1997).

Selektivität

Für die Bestimmung der Selektivität wurden sechs *Blank*-Proben der jeweiligen Matrix auf Störpeaks untersucht. Es durften keine Störpeaks bei der zu erwartenden Retentionszeit der Analyten auftreten.

Richtigkeit (Wiederfindung)

Die Richtigkeit einer analytischen Methode beschreibt die Abweichung einer quantifizierten Standardprobe gegenüber ihrer richtigen Konzentration. Es wurden Proben gemessen, deren ermittelte Konzentrationen nicht mehr als 15 % von der richtigen Konzentration abweichen durften. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden sechs dotierte *Blank*-Proben aufgearbeitet, um die Ausbeute in allen Schritten der Analyse nach der Methode des internen Standards bestimmen zu können. Der Konzentrationsbereich der Standardreihen sollte so gewählt sein, dass die eigentlich zu untersuchenden Proben eingeschlossen waren.

Präzision (Wiederholbarkeit)

Die Präzision einer analytischen Methode ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen unabhängigen Messergebnissen unter definierten Bedingungen. Ihre Bestimmung ist abhängig von verschiedenen Parametern wie zum Beispiel Temperatur, pH-Wert, Lösungsmittelzusammensetzung und Sauberkeit des Massenspektrometers. Hierfür wurden sechs dotierte *Blank*-Proben aufgearbeitet.

Nachweisgrenze (NG), (*limit of detection*, LOD)

Hierbei wurde die kleinste noch messbare Konzentration ermittelt.

Bestimmungsgrenze (BG), (*limit of quantification*, LOQ)

Hierbei wurde die kleinste noch quantifizierbare Konzentration ermittelt.

Stabilität

Um die Stabilität der Analyten in der jeweiligen Matrix zu kontrollieren, wurden *Blank*-Matrizes mit den entsprechenden Analyten versetzt und es wurde der Einfluss der Lagerung bei Raumtemperatur sowie unter Zusatz von Säuren, Antioxidationsmitteln und Stickstoff ermittelt.

Die Ergebnisse der Methodvalidierungen sind im Anhang unter Kapitel 10.1 dargestellt.

3.4 Bestimmung von BPD-SG-Konjugaten

Als GSH-Konjugate des Mutterkohlenwasserstoffes B[a]P wurden die in Abbildung 12 dargestellten Modellsubstanzen als Referenzverbindungen eingesetzt, deren Synthese gemäß Funk (Dissertation 1992; Funk *et al.* 1993) im BIU erfolgte. Abbildung 12 (A) zeigt das (-)-10*S*-(*S*-Glutathionyl)-7*R*,8*S*,9*S*-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyren ((7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-BPD-SG), während in Abbildung 12 (B) das (+)-10*R*-(*S*-Glutathionyl)-7*S*,8*R*,9*R*-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyren ((7*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-BPD-SG) dargestellt ist. Zur Bestimmung dieser BPD-SG-Konjugate diente die Substanz 1-Methylpyrenylglutathion (1-MP-SG) als interner Standard (Abb. 12 (C)).

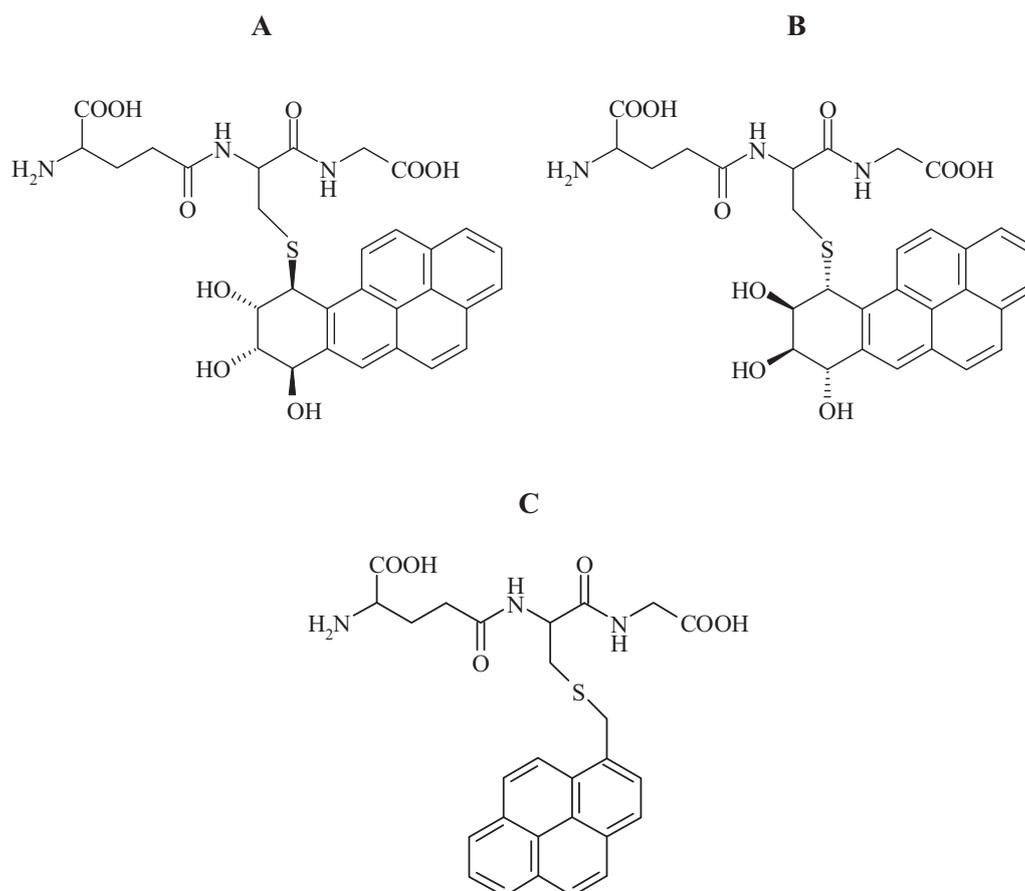


Abbildung 12: (A) (-)-10*S*-(*S*-Glutathionyl)-7*R*,8*S*,9*S*-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyren ((7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-BPD-SG), das aus (+)-*anti*-BPDE gebildet wird und (B) (+)-10*R*-(*S*-Glutathionyl)-7*S*,8*R*,9*R*-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyren ((7*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-BPD-SG), welches aus (-)-*anti*-BPDE entsteht. (C) zeigt den internen Standard 1-Methylpyrenylglutathion (1-MP-SG).

Zur Bildung dieser GSH-Konjugate erfolgte die Inkubation der Zellkulturen mit (±)-*trans*-7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[*a*]pyren (7,8-Diol-B[a]P) oder mit (±)-*anti*-7,8-Dihydroxy-7,8-dihydro-9,10-epoxybenzo[*a*]pyren (BPDE) (Abb. 13), welche die metabolischen Vorstufen der GSH-Konjugate darstellen.

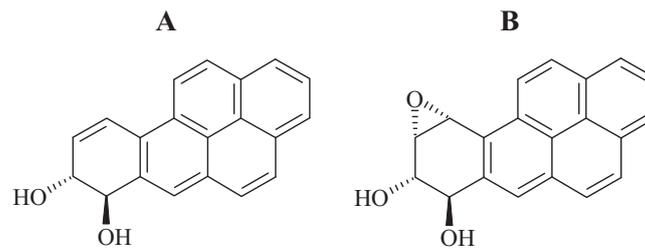


Abbildung 13: (A) (\pm) -*trans*-7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[*a*]pyren (7,8-Diol-B[*a*]P), (B) (\pm) -*anti*-7,8-Dihydroxy-7,8-dihydro-9,10-epoxybenzo[*a*]pyren (BPDE). Es ist jeweils ein Stereoisomer gezeigt.

Die im Ergebnisteil (Kapitel 4.2.1) und im Anhang (Kapitel 10.1.1) dargestellten Methodenoptimierungen ergaben die folgenden Messbedingungen für die BPD-SG-Konjugate:

Clean-Up:

Vor der LC-MS-Analytik war eine Aufreinigung der Proben notwendig, um störende Matrixbestandteile weitestgehend zu entfernen (Abb. 14). Diese Prozedur erfolgte mittels Festphasenextraktion (SPE) an einem C-18-Material (0,5 g, Bakerbond). Hierzu wurde die wässrige Mediumprobe mit dem als internen Standard fungierenden 1-MP-SG versetzt und auf die zuvor mit Methanol und Wasser vorkonditionierte SPE-Säule aufgegeben. Nach Spülen mit 5 ml Wasser wurden die GSH-Konjugate mit 10 ml Methanol von der Säule eluiert und das Methanol wurde am Rotationsverdampfer fast vollständig entfernt. Der Rückstand wurde in einem Gemisch aus Methanol und Wasser (40:60, v/v) wieder aufgenommen. Bei der Analytik von Zellextrakten musste vor der Festphasenextraktion das Methanol aus der Probe entfernt werden. Dies erfolgte durch Einengen am Rotationsverdampfer und der Rückstand wurde in Wasser wieder aufgenommen.

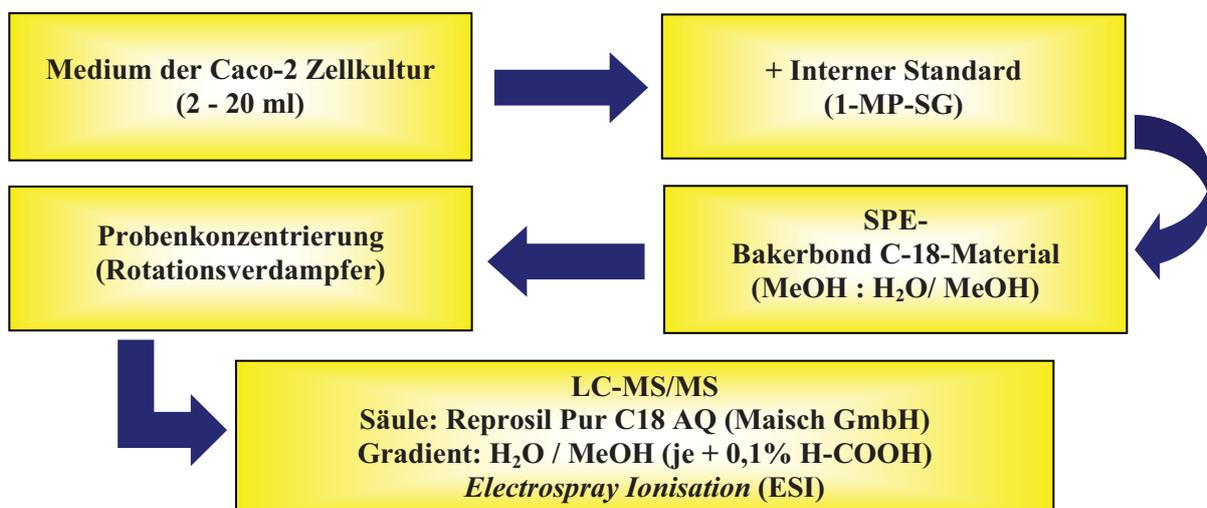


Abbildung 14: Probenvorbereitung (*Clean-Up*) für die BPD-SG-Konjugate

Geräte:

HPLC (Thermo Finnigan): Spectra System P 4000 (Pumpe)
 Spectra System AS 3000 (Autosampler)
 Spectra System UV 6000 LP (UV-Detektor)
 Software: Chromquest, Version 2.51

Massenspektrometer: TSQ 7000 (Thermo Finnigan)
 Software: XCalibur

Säule: Reprosil-Pur C18-AQ, 150 mm x 2 mm, 5 µm (Maisch GmbH)

Vorsäule: Reprosil-Pur C18-AQ, 10 mm x 2 mm, 5 µm (Maisch GmbH)

Tabelle 1: HPLC-Bedingungen BPD-SG

Zeit [min]	MeOH + 0,1 % Ameisensäure [%]	H ₂ O + 0,1 % Ameisensäure [%]
0	40	60
2	40	60
8	50	50
15	50	50
20	100	0
30	100	0

Flow: 0,2 ml/min

Säulentemperatur: 30 °C

Injektion: 20 µl

MS-Bedingungen:

Aufnahmemodus: ESI-negativ, MS/MS: SRM-Modus

Analyten: m/z 608 → 272 (22 V)

Interner Standard: m/z 520 → 272 (25 V)

Sheath Gas: 80 psi

Auxiliary Gas: 40 arbitrary units

Heated Capillary Temperature: 350 °C

Spray Voltage: -6,0 kV

CID: 3 mT

Die quantitative Bestimmung der Analyten erfolgte über den internen Standard 1-MP-SG. Vor jeder Serie von quantitativen Bestimmungen wurde eine 3-Punkt-Kalibrierung vorgenommen. Hierzu wurden drei Kalibrierlösungen, deren Konzentrationen von Analyten und internem Standard unterhalb und oberhalb der in der Probe enthaltenen Konzentrationen lagen, mehrfach injiziert. Die Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich der elektronisch registrierten Flächenintensitäten von Analyt zu internem Standard in Bezug zu der aufgenommenen Kalibrierfunktion.

3.5 Bestimmung von DBPD-SG-Konjugaten

Bezüglich des Mutterkohlenwasserstoffes DB[*a,l*]P wurden die in Abbildung 15 dargestellten GSH-Konjugate 14*S*-(*S*-Glutathionyl)-11*R*,12*S*,13*S*-trihydroxy-11,12,13,14-tetrahydrodibenzo[*a,l*]pyren ((11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG) und 14*R*-(*S*-Glutathionyl)-11*S*,12*R*,13*R*-trihydroxy-11,12,13,14-tetrahydrodibenzo[*a,l*]pyren ((11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG) als Referenzsubstanzen eingesetzt.

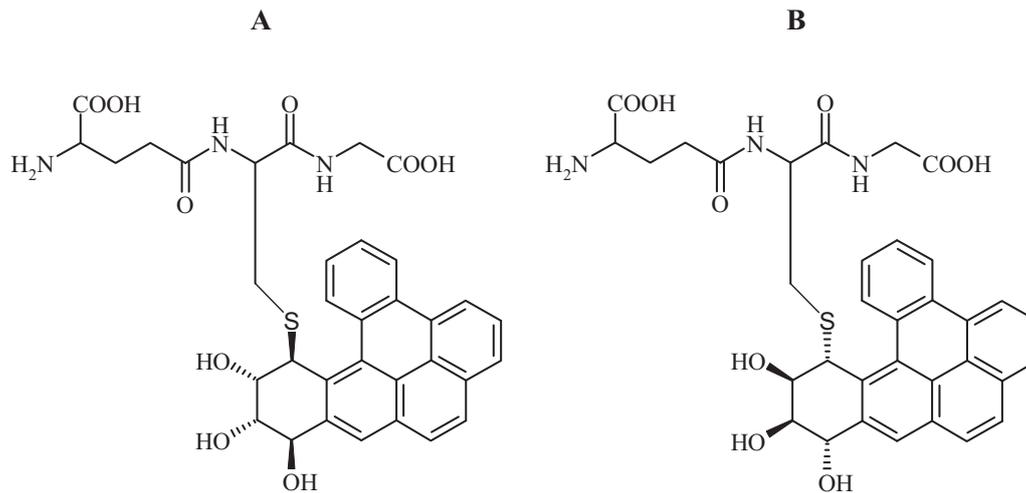


Abbildung 15: (A) 14*S*-(*S*-Glutathionyl)-11*R*,12*S*,13*S*-trihydroxy-11,12,13,14-tetrahydrodibenzo[*a,l*]pyren ((11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG), das aus (-)-*anti*-DBPDE entsteht und (B) 14*R*-(*S*-Glutathionyl)-11*S*,12*R*,13*R*-trihydroxy-11,12,13,14-tetrahydrodibenzo[*a,l*]pyren ((11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG), welches aus (+)-*anti*-DBPDE gebildet wird.

Die Inkubation der Zellkulturen wurde hierbei mit den Vorläufern der GSH-Konjugate, (\pm)-*trans*-11,12-Dihydroxy-11,12-dihydrodibenzo[*a,l*]pyren (11,12-Diol-DB[*a,l*]P) oder (\pm)-*anti*-11,12-Dihydroxy-11,12-dihydro-13,14-epoxydibenzo[*a,l*]pyren (DBPDE) (Abb. 16) durchgeführt.

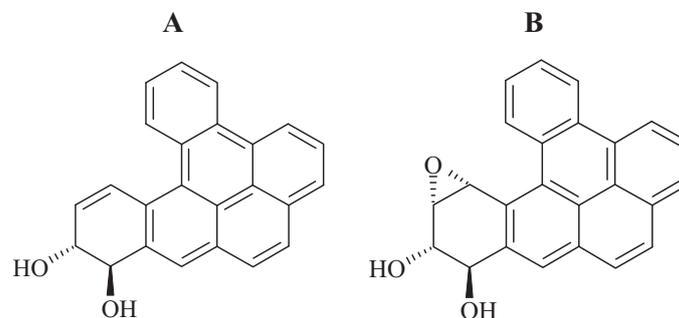


Abbildung 16: (A) (\pm)-*trans*-11,12-Dihydroxy-11,12-dihydrodibenzo[*a,l*]pyren (11,12-Diol-DB[*a,l*]P), (B) (\pm)-*anti*-11,12-Dihydroxy-11,12-dihydro-13,14-epoxydibenzo[*a,l*]pyren (DBPDE). Es ist jeweils ein Stereoisomer gezeigt.

Die im Ergebnisteil (Kapitel 4.3.1) und im Anhang (Kapitel 10.1.2) aufgeführten Methodenoptimierungen ergaben folgende Messbedingungen für die DBPD-SG-Konjugate:

Clean-Up:

Die Aufreinigung der Proben vor der eigentlichen LC-MS-Analytik erfolgte analog zum BPD-SG (Kapitel 3.4). Es wurde ebenfalls der interne Standard 1-MP-SG verwendet.

Geräte:

HPLC (Thermo Finnigan): Spectra System P 4000 (Pumpe)

Spectra System AS 3000 (Autosampler)

Spectra System UV 6000 LP (UV-Detektor)

Software: Chromquest, Version 2.51

Massenspektrometer: TSQ 7000 (Thermo Finnigan)

Software: XCalibur

Säule: Reprosil-Pur C18-AQ, 150 mm x 2 mm, 5 μ m (Maisch GmbH)

Vorsäule: Reprosil-Pur C18-AQ, 10 mm x 2 mm, 5 μ m (Maisch GmbH)

Tabelle 2: HPLC-Bedingungen DBPD-SG

Zeit [min]	MeOH + 0,1 % Ameisensäure [%]	H ₂ O + 0,1 % Ameisensäure [%]
0	60	40
2	60	40
10	100	0
20	100	0

Flow: 0,2 ml/min

Säulentemperatur: 30 °C

Injektion: 20 μ l

MS-Bedingungen:

ESI-negativ, MS/MS: SRM-Modus

Analyten: m/z 658 \rightarrow 272 (24 V)

Interner Standard: m/z 520 \rightarrow 272 (25 V)

Sheath Gas: 80 psi

Auxiliary Gas: 40 arbitrary units

Capillary Temperature: 350 °C

Spray Voltage: -6,0 kV

CID: 3 mT

Die Kalibrierung erfolgte analog zum BPD-SG (Kapitel 3.4).

3.6 Bestimmung von BcPheD-SG-Konjugaten

Die verwendeten GSH-Konjugate des Mutterkohlenwasserstoffes B[c]Phe, (-)-1*S*-(*S*-Glutathionyl)-2*S*,3*S*,4*R*-trihydroxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[*c*]phenanthren ((1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)-BcPheD-SG) und (+)-1*R*-(*S*-Glutathionyl)-2*R*,3*R*,4*S*-trihydroxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[*c*]phenanthren ((1*R*,2*R*,3*R*,4*S*)-BcPheD-SG) sind in Abbildung 17 dargestellt, während Abbildung 18 die für die Inkubation der Caco-2-Zellen verwendeten Substanzen (±)-*trans*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[*c*]phenanthren (3,4-Diol-B[c]Phe) und (±)-*anti*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydro-1,2-epoxybenzo[*c*]phenanthren (BcPheDE) zeigt.

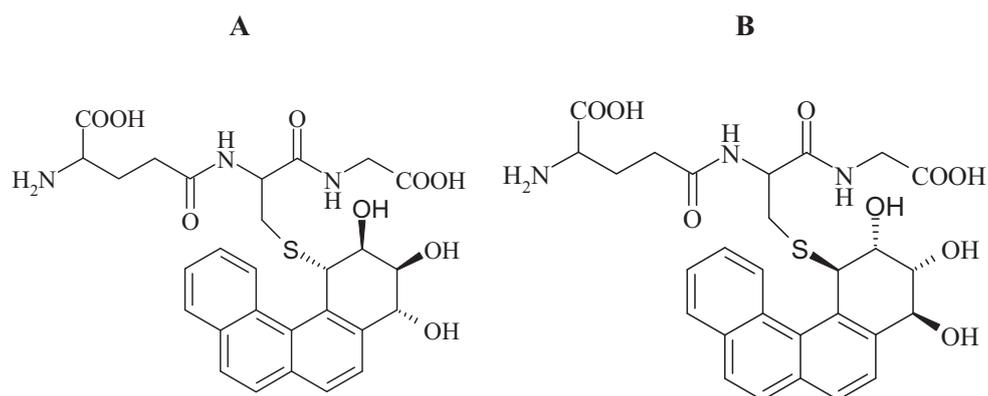


Abbildung 17: (A) (-)-1*S*-(*S*-Glutathionyl)-2*S*,3*S*,4*R*-trihydroxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[*c*]phenanthren ((1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)-BcPheD-SG), welches aus (-)-*anti*-BcPheDE gebildet wird und (B) (+)-1*R*-(*S*-Glutathionyl)-2*R*,3*R*,4*S*-trihydroxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[*c*]phenanthren ((1*R*,2*R*,3*R*,4*S*)-BcPheD-SG), das aus (+)-*anti*-BcPheDE entsteht.

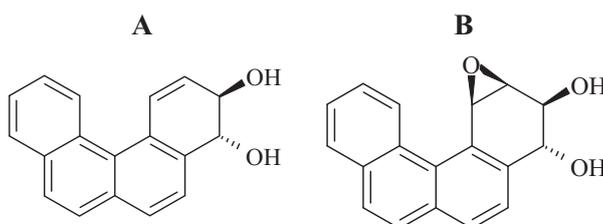


Abbildung 18: (A) (±)-*trans*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[*c*]phenanthren (3,4-Diol-B[c]Phe), (B) (±)-*anti*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydro-1,2-epoxybenzo[*c*]phenanthren (BcPheDE). Es ist jeweils ein Stereoisomer gezeigt.

Die im Ergebnisteil unter Kapitel 4.4.1 sowie im Anhang unter Kapitel 10.1.3 gezeigten Methodenoptimierungen führten zu folgenden Messbedingungen für die BcPheD-SG-Konjugate:

Clean-Up:

Die Proben wurden einer dem BPD-SG analogen Aufreinigung unterzogen (Kapitel 3.4), bevor sie der LC-MS-Analytik zugeführt wurden. Die Substanz 1-MP-SG diente ebenso als interner Standard für die Quantifizierung.

Geräte:**HPLC (Thermo Finnigan):** Spectra System P 4000 (Pumpe)

Spectra System AS 3000 (Autosampler)

Spectra System UV 6000 LP (UV-Detektor)

Software: Chromquest, Version 2.51

Massenspektrometer: TSQ 7000 (Thermo Finnigan)

Software: XCalibur

Säule: Reprosil-Pur C18-AQ, 150 mm x 2 mm, 5 µm (Maisch GmbH)**Vorsäule:** Reprosil-Pur C18-AQ, 10 mm x 2 mm, 5 µm (Maisch GmbH)**Tabelle 3: HPLC-Bedingungen BcPhe-SG**

Zeit [min]	MeOH + 0,1 % Ameisensäure [%]	H ₂ O + 0,1 % Ameisensäure [%]
0	35	65
20	35	65
28	100	0
38	100	0

Flow: 0,2 ml/min**Säulentemperatur:** 30 °C**Injektion:** 20 µl**MS-Bedingungen:**

ESI-positiv, MS/MS: SRM-Modus

Analyten: m/z 586 → 308 (-20 V)**Interner Standard:** m/z 522 → 215 (-25 V)**Sheath Gas:** 80 psi**Auxiliary Gas:** 40 arbitrary units**Heated Capillary Temperature:** 350 °C**Spray Voltage:** +6,0 kV**CID:** 3 mT

Die Kalibrierung erfolgte analog zum BPD-SG (Kapitel 3.4).

3.7 Bestimmung von DB[a,l]P-Metaboliten

In Abbildung 19 sind die für die Analytik eingesetzten Referenzverbindungen DB[a,l]P, *trans*-8,9-Dihydroxy-8,9-dihydrodibenzo[a,l]pyren (8,9-Diol-DB[a,l]P), *trans*-11,12-Dihydroxy-11,12-dihydrodibenzo[a,l]pyren (11,12-Diol-DB[a,l]P), 11,13,14/12-Tetrahydroxy-11,12,13,14-tetrahydrodibenzo[a,l]pyren (11,13,14/12-Tetrol-DB[a,l]P) inklusive des verwendeten internen Standards Perylen (PER) aufgezeigt. Beim DB[a,l]P wird ein Phenol gebildet, das tentativ als 7-Hydroxydibenzo[a,l]pyren (7-OH-DB[a,l]P) in der Literatur bestimmt wurde. Für das 7-OH-DB[a,l]P stand kein Referenzmaterial zur Verfügung; eine Identifizierung des Peaks erfolgte mittels Vergleich von Retentionszeiten und UV-Spektren anhand von Literaturangaben (Devanesan *et al.* 1990) sowie zusätzlicher massenspektrometrischer Charakterisierung.

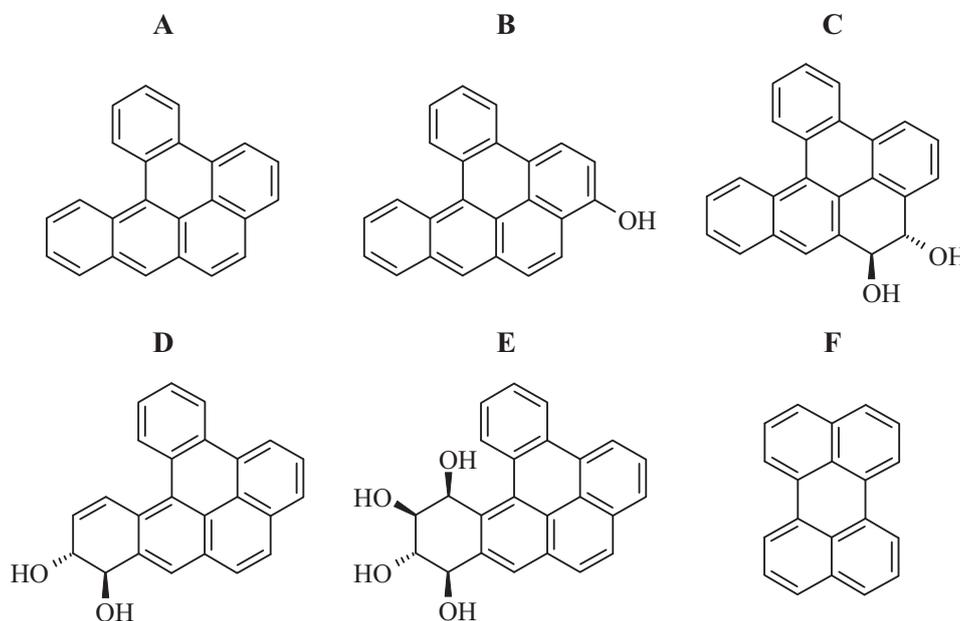


Abbildung 19: (A) DB[a,l]P, (B) 7-OH-DB[a,l]P, (C) 8,9-Diol-DB[a,l]P, (D) 11,12-Diol-DB[a,l]P, (E) 11,13,14/12-Tetrol-DB[a,l]P und (F) PER (ISTD)

Für die Bestimmung der DB[a,l]P-Metaboliten wurden folgende Messbedingungen etabliert:

Clean-Up:

Vor der HPLC-Analytik erfolgte eine Probenaufreinigung mittels Festphasenextraktion (SPE) an einem C-18-Material (Bakerbond), um störende Matrixbestandteile zu entfernen (Abb. 20). Vor der eigentlichen SPE-Aufarbeitung war zunächst eine Behandlung mit Arylsulfatase notwendig, um vorhandene konjugierte Metaboliten freizusetzen. Bei den Zellextraktproben musste vor diesem Spaltungsansatz außerdem das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt werden; der Rückstand wurde anschließend in etwa 5 ml Wasser wieder aufgenommen. Die wässrigen Medien konnten direkt für den Enzymansatz verwendet werden. Dieser Ansatz erfolgte für 16 h bei 38 °C im Schüttelbad nach der Zugabe von PER-Lösung als internem

Standard, Butylhydroxytoluol (BHT)-Lösung zum Schutz vor Oxidation der Metaboliten, Natriumacetatpuffer sowie dem Enzym Arylsulfatase. Im Anschluss an die enzymatische Spaltung wurde die Probe auf die zuvor mit Methanol und Wasser vorkonditionierte SPE-Säule (0,5 g, Bakerbond) gegeben. Nach Spülen mit 10 ml 5 % Methanol in Wasser wurden die Analyten mit 15 ml Methanol von der Säule eluiert und das Methanol wurde am Rotationsverdampfer fast vollständig entfernt. Der Rückstand wurde in einem Gemisch aus Methanol und Wasser (40:60, v/v) wieder aufgenommen.

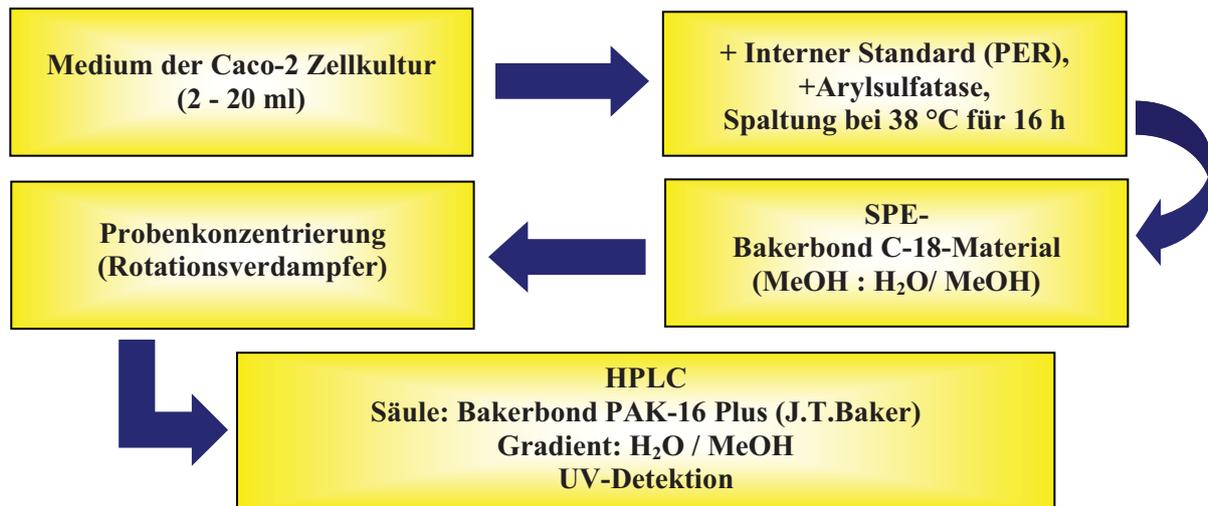


Abbildung 20: Probenvorbereitung (*Clean-Up*) für die DB[a,l]P-Metaboliten

Geräte:

HPLC (Thermo Finnigan): Spectra System P 4000 (Pumpe)

Spectra System AS 3000 (Autosampler)

Spectra System UV 6000 LP (UV-Detektor)

Säule: Bakerbond PAK-16 Plus, 250 mm x 3 mm, 5 µm (J.T.Baker, Deventer, Niederlande)

Vorsäule: 20 mm x 3 mm, 5 µm (J.T.Baker, Deventer, Niederlande)

Tabelle 4: HPLC-Bedingungen DB[a,l]P-Metaboliten

Zeit [min]	MeOH [%]	H ₂ O [%]
0	60	40
2	60	40
25	100	0
45	100	0

Flow: 0,4 ml/min

Säulentemperatur: 30 °C

Injektion: 20 µl

UV-Detektion: 254 nm

Die quantitative Bestimmung der DB[*a,l*]P-Metaboliten aus Medium und Zellextrakt erfolgte mit PER als internem Standard und mittels Response-Faktoren, die zuvor anhand der Referenzsubstanzen ermittelt wurden.

3.8 Bestimmung von B[*a*]P-Metaboliten

Abbildung 21 zeigt die Strukturformeln der verwendeten Referenzsubstanzen B[*a*]P, 1-Hydroxybenzo[*a*]pyren (1-OH-B[*a*]P), 3-Hydroxybenzo[*a*]pyren (3-OH-B[*a*]P), 7-Hydroxybenzo[*a*]pyren (7-OH-B[*a*]P), 9-Hydroxybenzo[*a*]pyren (9-OH-B[*a*]P), *trans*-4,5-Dihydroxy-4,5-dihydrobenzo[*a*]pyren (4,5-Diol-B[*a*]P), *trans*-7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[*a*]pyren (7,8-Diol-B[*a*]P), *trans*-9,10-Dihydroxy-9,10-dihydrobenzo[*a*]pyren (9,10-Diol-B[*a*]P) und 7,10/8,9-Tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyren (7,10/8,9-Tetrol-B[*a*]P).

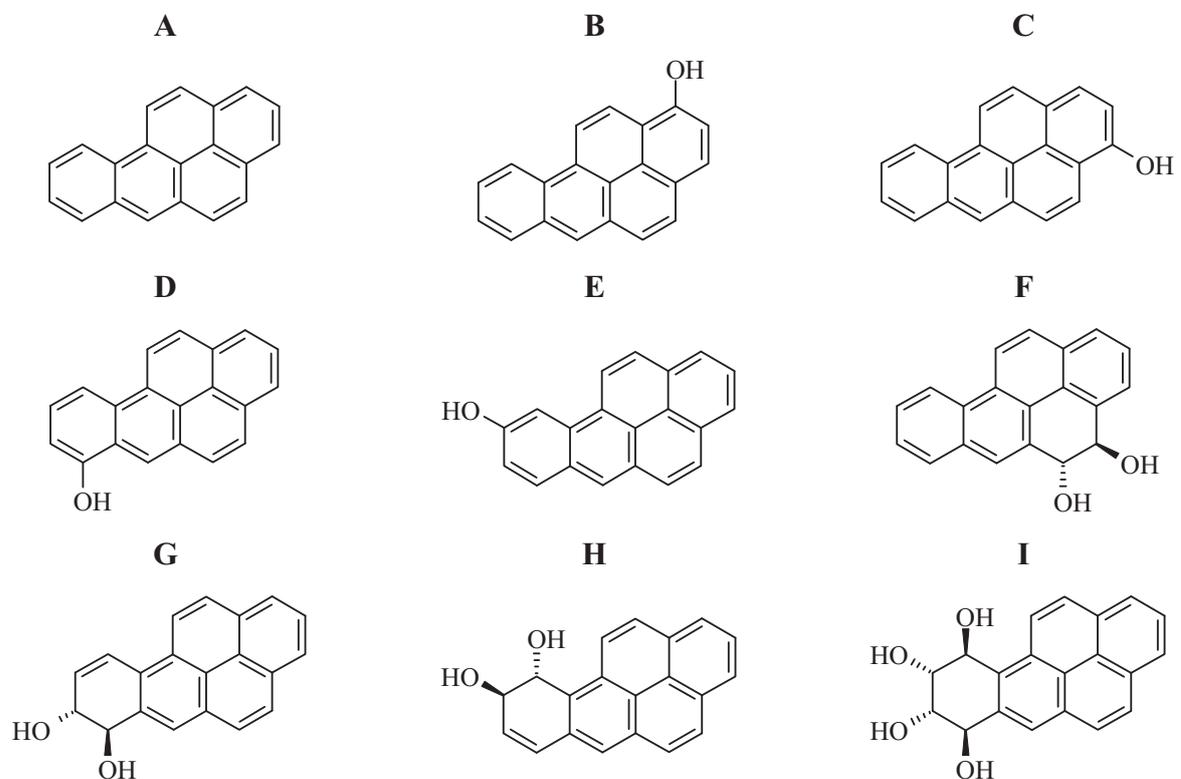


Abbildung 21: (A) B[*a*]P, (B) 1-OH-B[*a*]P, (C) 3-OH-B[*a*]P, (D) 7-OH-B[*a*]P, (E) 9-OH-B[*a*]P, (F) 4,5-Diol-B[*a*]P, (G) 7,8-Diol-B[*a*]P, (H) 9,10-Diol-B[*a*]P und (I) 7,10/8,9-Tetrol-B[*a*]P

Die Bestimmung der B[*a*]P-Metaboliten erfolgte unter den entwickelten Messbedingungen:

Clean-Up:

Die Medium- und Zellextraktproben wurden analog zu den DB[*a,l*]P-Proben (Kapitel 3.7) aufgearbeitet. Allerdings kam für die enzymatische Spaltung ein Gemisch aus β -Glucuronidase/Arylsulfatase zum Einsatz, da frühere Studien die Bildung von sowohl B[*a*]P-sulfaten als auch B[*a*]P-glucuroniden in Caco-2-Zellen gezeigt hatten (Ebert *et al.* 2005a)

Geräte:**HPLC (Thermo Finnigan):** Spectra System P 4000 (Pumpe)

Spectra System AS 3000 (Autosampler)

Spectra System UV 6000 LP (UV-Detektor)

Spectra Systems FL 3000 (Fluoreszenz-Detektor)

Säule: Bakerbond PAK-16 Plus, 250 mm x 3 mm, 5 μ m (J.T.Baker, Deventer, Niederlande)**Vorsäule:** 20 mm x 3 mm, 5 μ m (J.T.Baker, Deventer, Niederlande)**Tabelle 5: HPLC- und Fluoreszenz-Bedingungen B[a]P-Metaboliten**

Zeit [min]	MeOH [%]	H ₂ O [%]	Zeit [min]	λ_{EX} [nm]	λ_{EM} [nm]
0	50	50	0	344	430
2	50	50	15,0	272	430
30	85	15	22,5	366	430
45	85	15	30,0	302	430
55	100	0	45,5	306	430
75	100	0	53,0	408	466
			58,0	364	430

Flow: 0,4 ml/min**Säulentemperatur:** 30 °C**Injektion:** 20 μ l**FL-Detektion:** Anregungswellenlänge (λ_{EX}) und Emissionswellenlänge (λ_{EM}) siehe Tabelle 5**UV-Detektion:** 254 nm

PER diente als interner Standard zur quantitativen Bestimmung der B[a]P-Metaboliten aus Medium und Zellextrakt und die Bestimmung erfolgte mithilfe von zuvor generierten Response-Faktoren.

3.9 Bestimmung von B[c]Phe-Metaboliten

Die als Referenzsubstanzen eingesetzten B[c]Phe-Metaboliten 1-Hydroxybenzo[c]phenanthren (1-OH-B[c]Phe), 2-Hydroxybenzo[c]phenanthren (2-OH-B[c]Phe), 3-Hydroxybenzo[c]phenanthren (3-OH-B[c]Phe), 4-Hydroxybenzo[c]phenanthren (4-OH-B[c]Phe), *trans*-3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzo[c]phenanthren (3,4-Diol-B[c]Phe), *trans*-5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrobenzo[c]phenanthren (5,6-Diol-B[c]Phe), 1,4/2,3-Tetrahydroxy-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[c]phenanthren (1,4/2,3-Tetrol-B[c]Phe) sind neben dem Mutterkohlenwasserstoff B[c]Phe in Abbildung 22 dargestellt.

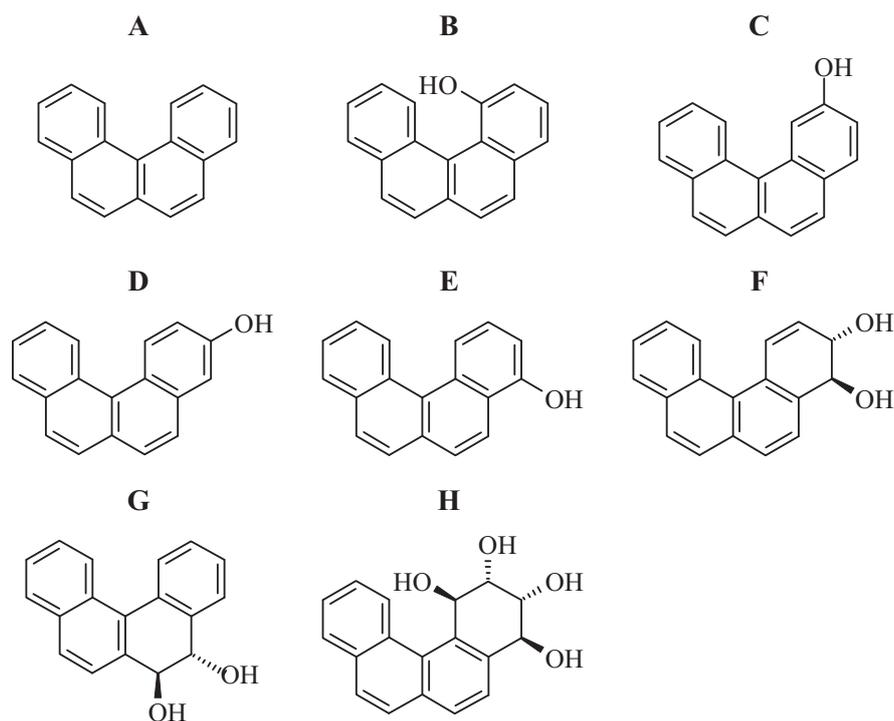


Abbildung 22: (A) B[c]Phe, (B) 1-OH-B[c]Phe, (C) 2-OH-B[c]Phe, (D) 3-OH-B[c]Phe, (E) 4-OH-B[c]Phe, (F) 3,4-Diol-B[c]Phe, (G) 5,6-Diol-B[c]Phe, (H) 1,4/2,3-Tetrol-B[c]Phe

Nach Optimierung der Messbedingungen ergaben sich folgende Parameter für die Bestimmung der B[c]Phe-Metaboliten:

Clean-Up:

Medium- und Zellextraktproben wurden einer den DB[a,l]P-Proben analogen Aufarbeitung unterzogen (Kapitel 3.7). Dabei wurde die enzymatische Spaltung jedoch mit einem Gemisch aus β -Glucuronidase/Arylsulfatase durchgeführt.

Geräte:

HPLC (Thermo Finnigan): Spectra System P 4000 (Pumpe)

Spectra System AS 3000 (Autosampler)

Spectra System UV 6000 LP (UV-Detektor)

Säule: Bakerbond PAK-16 Plus, 250 mm x 3 mm, 5 µm (J.T.Baker, Deventer, Niederlande)

Vorsäule: 20 mm x 3 mm, 5 µm (J.T.Baker, Deventer, Niederlande)

Tabelle 6: HPLC-Bedingungen B[c]Phe-Metaboliten

Zeit [min]	MeOH [%]	H ₂ O [%]
0	40	60
2	40	60
27	65	35
35	65	35
65	100	0
80	100	0

Flow: 0,3 ml/min

Säulentemperatur: 30 °C

Injektion: 20 µl

UV-Detektion: 254 nm und 270 nm

Als interner Standard zur Quantifizierung der B[c]Phe-Metaboliten kam erneut PER zum Einsatz und die Bestimmung erfolgte mithilfe von zuvor ermittelten Response-Faktoren.

3.10 Bestimmung von Mercaptursäuren

In Abbildung 23 sind die Strukturformeln der verwendeten Analyten *S*-PMA, *S*-BMA, *S*-Naphthylmercaptursäure (*S*-NMA) sowie des internen Standards *S*-Phenylmercaptursäure- d_5 (*S*-PMA- d_5) aufgeführt.

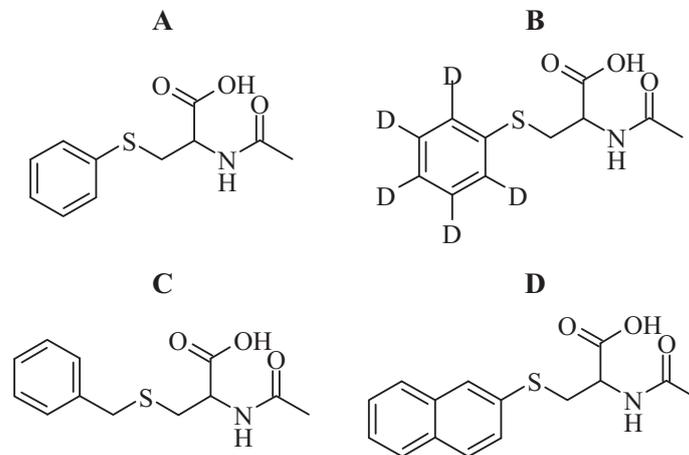
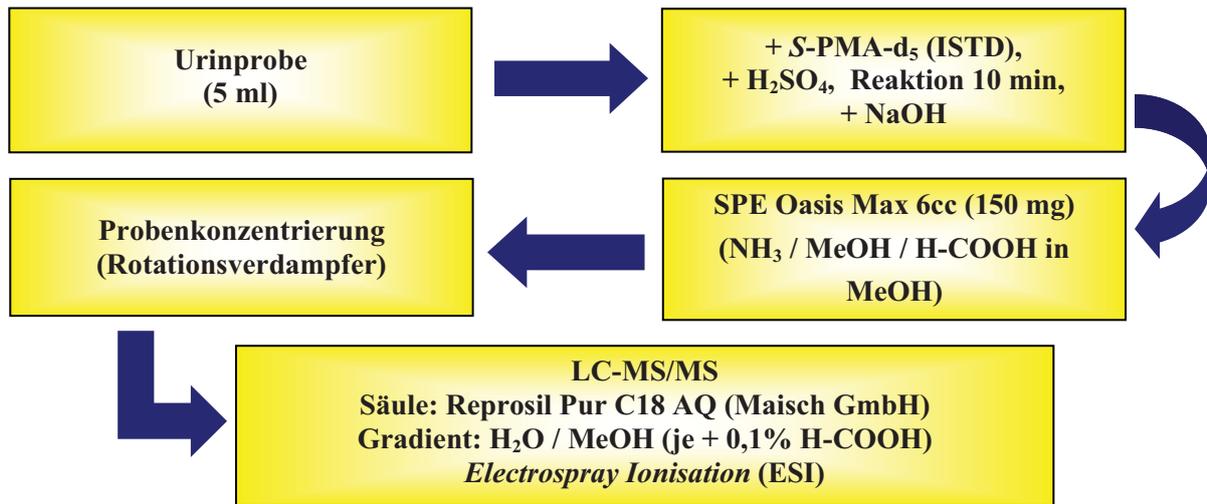


Abbildung 23: (A) *S*-PMA, (B) *S*-PMA- d_5 , (C) *S*-BMA, (D) *S*-NMA

Die im Ergebnisteil unter Kapitel 4.5 und im Anhang unter Kapitel 10.1.7 dargestellten Methodenoptimierungen resultierten in den folgenden Messparametern:

Clean-Up:

Vor der HPLC-Analytik erfolgte eine Probenaufreinigung mittels SPE, um störende Matrixbestandteile zu entfernen (Abb. 24). Außer der *S*-PMA tritt im Urin zusätzlich die prä-*S*-PMA auf. Um diesen Mercaptursäure-Anteil mitbestimmen zu können, war eine Behandlung der Urinproben mit starker Säure erforderlich, welche die Umsetzung von prä-*S*-PMA in *S*-PMA bewirkte. Folglich konnte in den jeweiligen Proben die Gesamtkonzentration an *S*-PMA bestimmt werden. Vor der SPE-Aufreinigung erfolgte die Zugabe des internen Standards *S*-PMA- d_5 zur Probe und dieser Ansatz wurde mit 1 ml Schwefelsäure (9 M) versetzt. Nach 10-minütiger Reaktionszeit erfolgte die Zugabe von 1,5 ml Natriumhydroxid (50 %ig) und die Probenlösung wurde auf die zuvor mit Methanol und Wasser vorkonditionierte SPE-Säule (Oasis Max 6cc (150 mg) (Waters)) aufgegeben. Nach Spülen mit 4 ml 5 % Ammoniak in Wasser sowie mit 4 ml Methanol wurden die Analyten mit 10 ml 2 % Ameisensäure in Methanol von der Säule eluiert und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer fast vollständig entfernt. Die Aufnahme des Rückstands erfolgte in einem Gemisch aus Methanol und Wasser (40:60, v/v).

Abbildung 24: Probenvorbereitung (*Clean-Up*) für die Mercaptursäureanalytik**Geräte:**

HPLC (Thermo Finnigan): Spectra System P 4000 (Pumpe)
Spectra System AS 3000 (Autosampler)
Spectra System UV 6000 LP (UV-Detektor)
Software: Chromquest, Version 2.51

Massenspektrometer: TSQ 7000 (Thermo Finnigan)
Software: XCalibur

Säule: Reprosil-Pur C18-AQ, 150 mm x 2 mm, 5 µm (Maisch GmbH)

Vorsäule: Reprosil-Pur C18-AQ, 10 mm x 2 mm, 5 µm (Maisch GmbH)

Tabelle 7: HPLC-Bedingungen Mercaptursäuren.

Zeit [min]	MeOH + 0,1 % Ameisensäure [%]	H ₂ O + 0,1 % Ameisensäure [%]
0	50	50
9	50	50
12	100	0
22	100	0

Flow: 0,2 ml/min

Säulentemperatur: 30 °C

Injektion: 20 µl

MS-Bedingungen:

ESI-negativ, MS/MS: SRM-Modus

S-PMA-d₅ (ISTD): m/z 243 → 114 (22 V)

S-PMA: m/z 238 → 109 (22 V)

S-BMA: m/z 252 → 123 (15 V)

S-NMA: m/z 288 → 159 (18 V)

Sheath Gas: 80 psi

Auxiliary Gas: 40 arbitrary units

Capillary Temperature: 350 °C

Spray Voltage: -6,0 kV

CID: 3 mT

Die Quantifizierung der Analyten erfolgte über den internen Standard *S*-PMA-*d*₅. Vor jeder Serie von quantitativen Bestimmungen wurde eine 3-Punkt-Kalibrierung vorgenommen. Dafür wurden drei Kalibrierlösungen, deren Konzentrationen von Analyten und internem Standard unterhalb und oberhalb der in der Probe enthaltenen Konzentrationen lagen, mehrfach injiziert. Die Bestimmung erfolgte durch den Vergleich der elektronisch registrierten Flächenintensitäten von Analyt zu internem Standard in Bezug zu der aufgenommenen Kalibrierfunktion.

3.11 Statistik

Die Ergebnisse der Analysen von PAK- und PAK-Metaboliten-Zellinkubationen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) von jeweils drei biologischen Replikaten angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's T-Test. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $< 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil umfasst in den Kapiteln 4.1 bis 4.4 die Analytik des Glutathions und der aus BPDE, DBPDE und BcPheDE gebildeten GSH-Konjugate sowie weiterer Phase-I- und Phase-II-Metaboliten der Mutterkohlenwasserstoffe B[a]P, DB[a,l]P und B[c]Phe am Zellmodell Caco-2. Im Kapitel 4.5 werden Resultate der Analytik von Mercaptursäuren dargestellt, die im Urin als Biomarker einer Exposition gegenüber den VOC Benzol und Toluol herangezogen werden können.

4.1 Glutathion-Analytik mittels LC-MS/MS

Um Glutathionkonjugate bestimmter Lebensmittelkontaminanten nachweisen und quantifizieren zu können, müssen die jeweiligen charakteristischen Molekül-Ionen sowie Fragmente im Massenspektrum bekannt sein. Dafür wurde zunächst ein Massenspektrum von reinem Glutathion aufgenommen, aus dem sich die Glutathion-spezifischen Masse-zu-Ladungs (m/z)-Verhältnisse ableiten lassen. Glutathion zeigt im Massenspektrum bei negativer ESI-Ionisierung das Molekül-Ion m/z 306 sowie spezifische Fragmente, anhand derer ein Nachweis in den zu untersuchenden Proben erfolgen kann (Abb. 25).

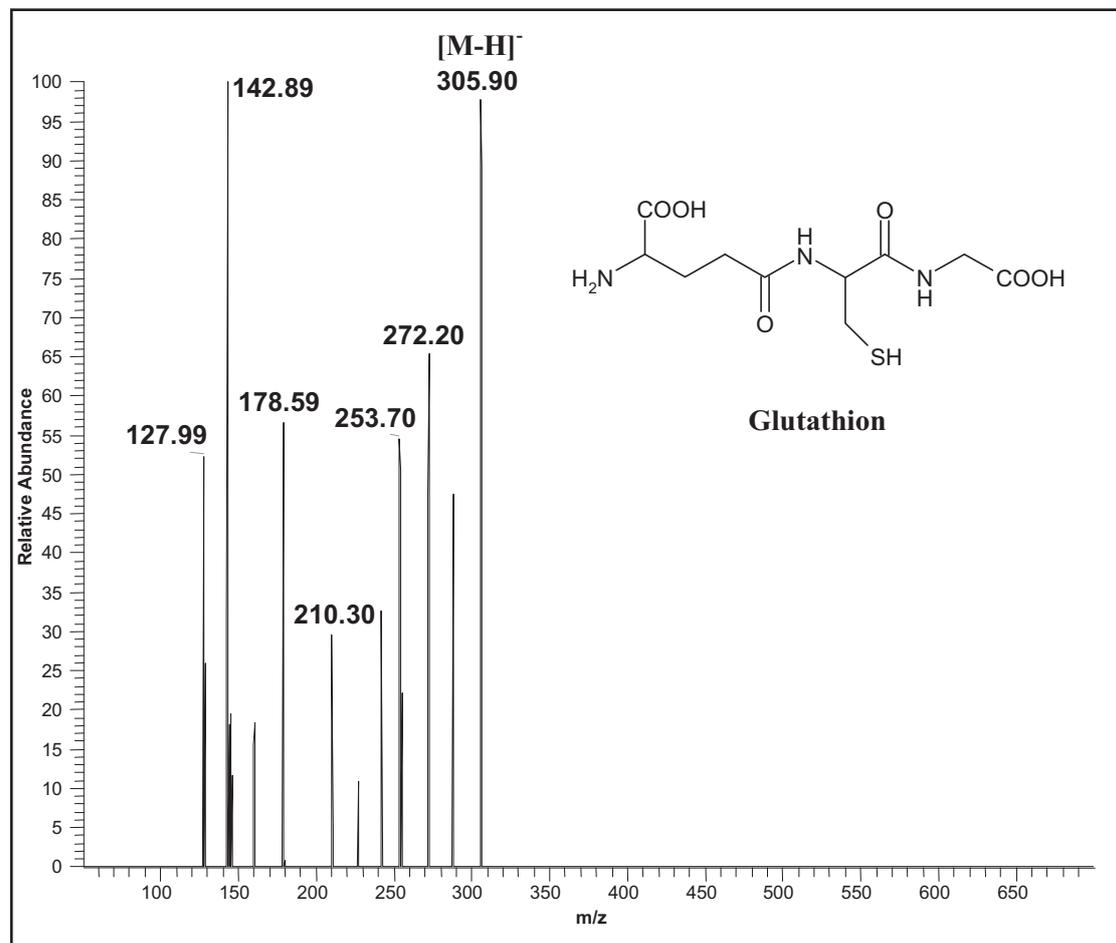


Abbildung 25: Charakteristische m/z der Fragmente des Glutathions bei negativer ESI-Ionisierung

In Abbildung 26 sind die entsprechenden Strukturformeln zu den im Massenspektrum (Abb. 25) erhaltenen m/z -Verhältnissen aufgeführt.

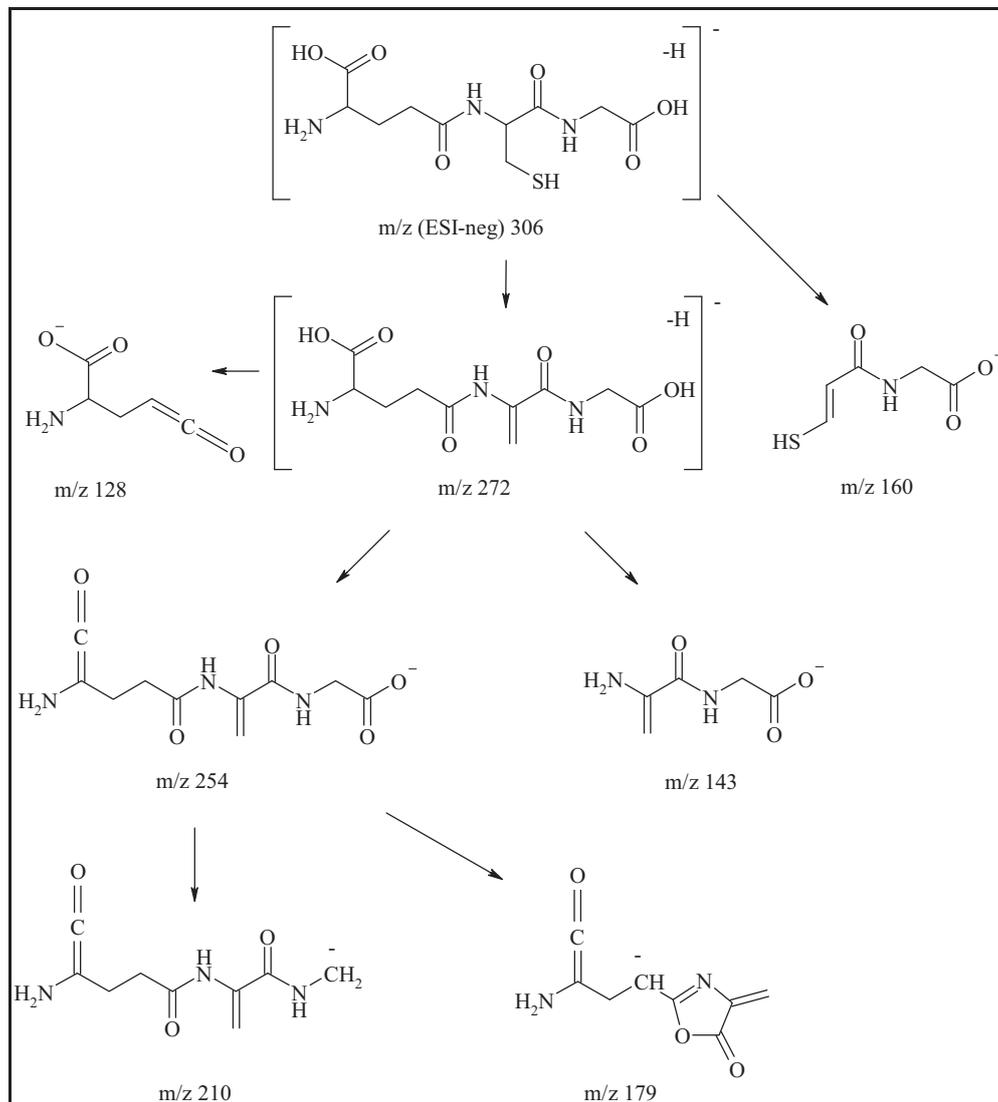


Abbildung 26: Fragmentierungsschema von Glutathion im negativen ESI-Ionisierungsmodus, verändert nach Dieckhaus *et al.* (2005)

Im negativen Ionisierungsmodus zeigt Glutathion das Molekül-Ion $[M - H]^-$ bei m/z 306. Der Einsatz der Kollisions-induzierten Dissoziation (CID) führt dann zur Bildung der Fragmente m/z 272, 254, 210, 179, 160, 143 und 128. Das Ion m/z 272 entsteht durch Abspaltung von H_2S aus dem Glutathion-Molekül. Eine weitere Fragmentierung liefert die Ionen m/z 143 und 128, die durch die Spaltung der Glu-Cys-Amidbindung entstehen. Außerdem wird durch Wasserabspaltung von m/z 272 das Ion m/z 254 gebildet. Aus m/z 254 wiederum resultieren durch erneute Fragmentierung die Ionen m/z 210 (Abspaltung von CO_2) sowie 179 (Abspaltung des Glycin-Restes und Umlagerung zu einem cyclischen Anion) (Dieckhaus *et al.* 2005).

4.2 Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P)

4.2.1 BPD-SG-Bestimmung mittels LC-MS/MS

Im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus entsteht aus B[*a*]P über die in Abbildung 27 aufgeführten Reaktionsschritte das BPD-SG. Zunächst erfolgt eine CYP-vermittelte Oxidation zum instabilen 7,8-Epoxy-B[*a*]P, welches durch die mikrosomale Epoxidhydrolase (mEH) zum (\pm)-*trans*-7,8-Dihydroxy-7,8-dihydro-B[*a*]P (7,8-Diol-B[*a*]P) umgesetzt wird. Das 7,8-Diol-B[*a*]P reagiert im Anschluss durch erneute CYP-vermittelte Oxidation zu den Enantiomeren (-)-(7*S*,8*R*,9*R*,10*S*)-BPDE und (+)-(7*R*,8*S*,9*S*,10*R*)-BPDE ((-)- und (+)-*anti*-BPDE). Dabei stellt die Bildung des (+)-*anti*-BPDE aus 7,8-Diol-B[*a*]P den bevorzugten Metabolismusweg dar. Neben den *anti*-Dihydrodiolepoxiden (mit *trans*-ständigem Oxiranring bezogen auf die benzyliche Hydroxylgruppe) können außerdem die hier nicht aufgeführten isomeren *syn*-BPDE (mit *cis*-ständigem Oxiranring bezogen auf die benzyliche Hydroxylgruppe) gebildet werden. Durch eine Konjugationsreaktion mit GSH und unter GST-Katalyse können die Dihydrodiolepoxide zu ihren korrespondierenden BPD-SG-Konjugaten verstoffwechselt werden. Hierbei entstehen die Diastereomere (+)-(7*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-BPD-SG und (-)-(7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-BPD-SG.

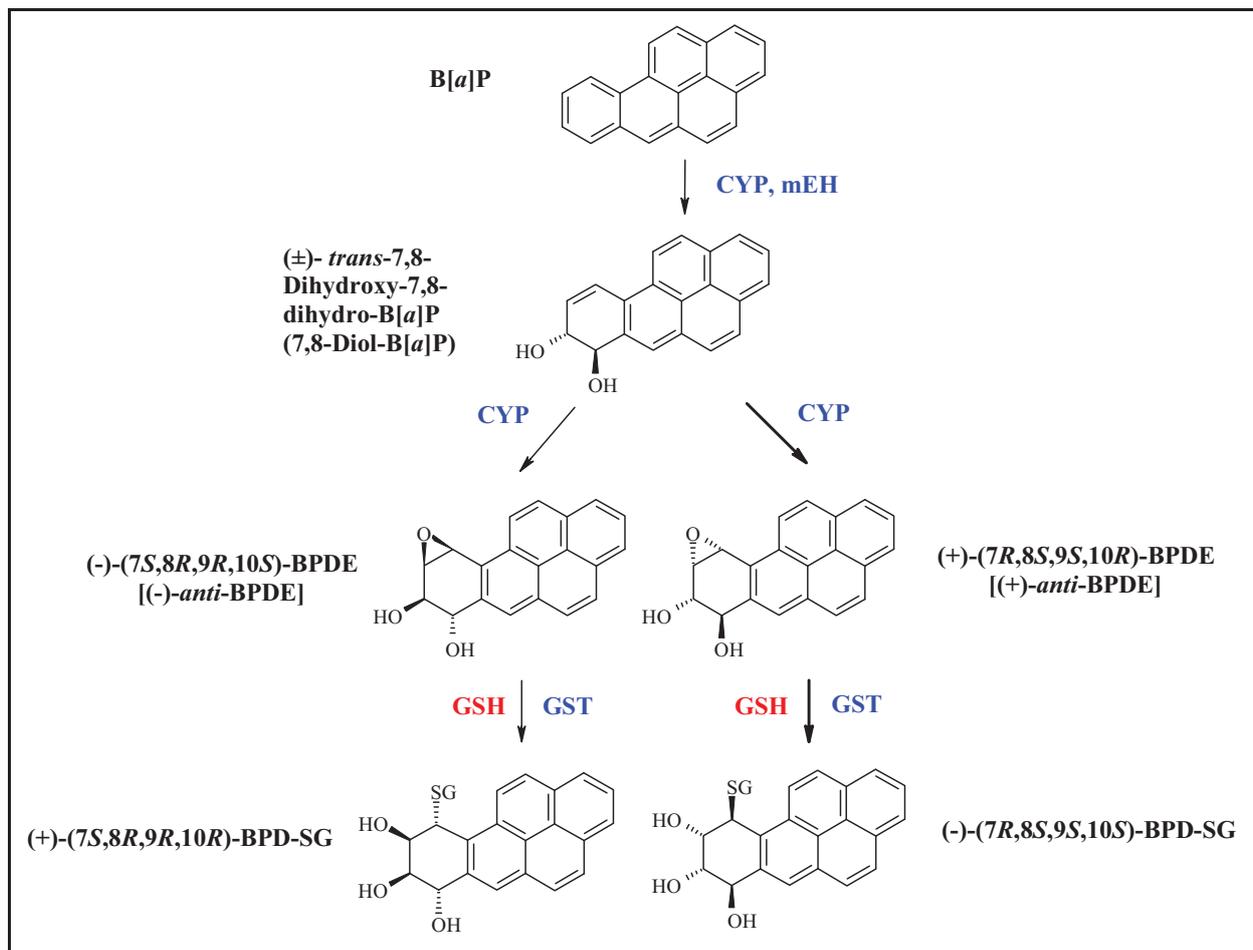


Abbildung 27: Bildung von Glutathionkonjugaten des *anti*-BPDE ausgehend vom B[*a*]P

4.2.1.1 Qualitativer Nachweis von BPD-SG

Die Aufnahme eines Massenspektrums vom GSH-Konjugat des BPDE (BPD-SG) bei negativer ESI-Ionisierung (Abb. 28) ergab neben dem Molekül-Ion m/z 608 $[M-H]^-$ auch die charakteristischen Glutathionfragmente (m/z 272, 254, 210, 179, 143, 128) sowie ein Fragment bestehend aus dem BPDE-Rest und dem Schwefelatom des Glutathions (m/z 335).

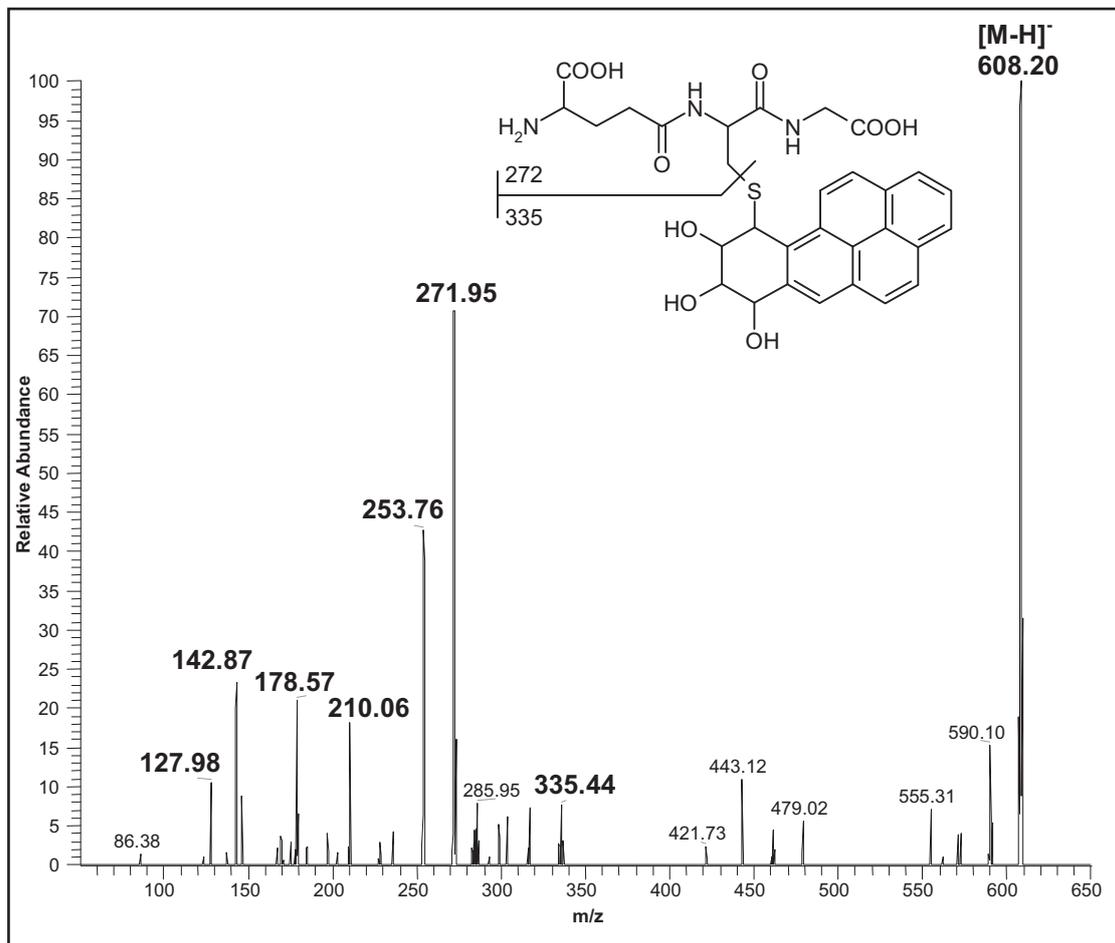


Abbildung 28: MS-Spektrum des BPD-SG (ESI-negativ, DAU-Modus)

Anhand des konstanten Auftretens dieser Fragmente kann in unbekanntem Proben ein qualitativer Nachweis auf Glutathion-Konjugate durchgeführt werden. Neben der massenspektrometrischen Identifizierung der Analyten spielen die vorgeschalteten chromatographischen Bedingungen für den Erfolg der Analytik eine wichtige Rolle. Das chromatographische Verhalten eines Analyten ist abhängig davon, ob eine funktionelle Gruppe protoniert oder deprotoniert ist. Durch die Änderung des pH-Wertes wird folglich auch die Retention dieser Substanz auf einer *Reversed-Phase*-Säule beeinflusst. Allgemein lässt sich feststellen, dass eine Verbindung mit Säurefunktionalität bei einem pH-Wert unterhalb ihres pK_S -Wertes besser retiniert wird und eine bessere Peakform aufweist als bei einem pH-Wert oberhalb ihres pK_S -Wertes. Bei der chromatographischen Untersuchung der BPD-SG-Konjugate zeigte sich, dass das Elutionsverhalten bei Zusatz von 0,1 % Ameisensäure zum Eluenten eine höhere Peakschärfe, eine bessere Trennung der Isomeren sowie eine

empfindlichere Anzeige im Massenspektrometer bewirkte. Die Verwendung eines Eluentengemisches bestehend aus reinem Methanol/Wasser führte hingegen bei schlechter Trennung der beiden Isomeren zu breiteren Peaks und unempfindlicheren Signalen bei der MS-Bestimmung.

4.2.1.2 Quantitative Bestimmung von BPD-SG

Die einfachste quantitative LC-MS-Bestimmungsmethode für die BPD-SG-Analyten ist die SIM-Methode, bei der die Molekül-Ionen erfasst werden. Abbildung 29 zeigt die Chromatogramm-Ausschnitte einer BPD-SG-Kalibrierlösung sowie einer BPD-SG-Mediumprobe im SIM-Aufnahmemodus. Im Falle der Kalibrierlösung waren die einzelnen Peaks gut auswertbar (Abb. 29 (A)), da keine Störsignale auftraten. Wenn jedoch eine native Probe nach dieser Methode bestimmt werden soll, können andere in der Probe enthaltene Substanzen die Quantifizierung negativ beeinflussen. Dadurch wird die Integration der Analyten-Peaks erschwert und eine verlässliche Auswertung ist vor allem bei geringen Analytenkonzentrationen nicht möglich, was im Falle der BPD-SG-Mediumprobe deutlich wird (Abb. 29 (B)).

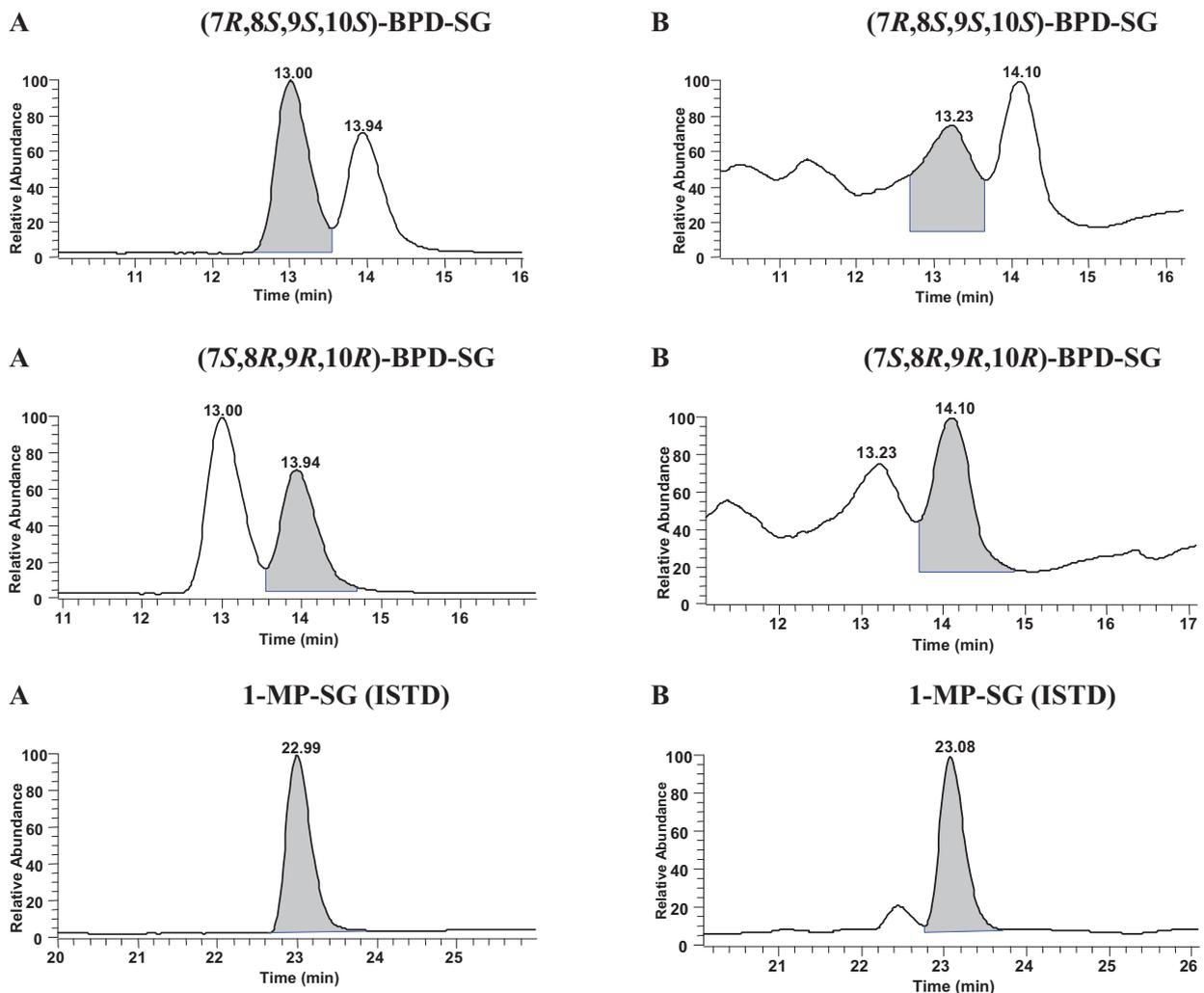


Abbildung 29: Chromatogramm-Ausschnitte (A) einer BPD-SG-Kalibrierlösung und (B) einer BPD-SG-Mediumprobe im SIM-Modus

Bei geringen Probenvolumina, wie zum Beispiel bei Verwendung des Transwell™-Systems, wiesen die Chromatogramme im SIM-Modus lediglich noch ein „Untergrundrauschen“ auf. Die Chromatogramme 1 und 2 der Abbildung 30 zeigen jeweils BPD-SG-Proben (Inkubation von Caco-2-Zellen mit 10 µM 7,8-Diol-B[a]P für 24 h, 8 Wells gepoolt). Das Chromatogramm 3 stellt eine Medium-Blank-Kontrolle dar und beim Chromatogramm 4 handelt es sich um eine BPD-SG-Kalibrierlösung.

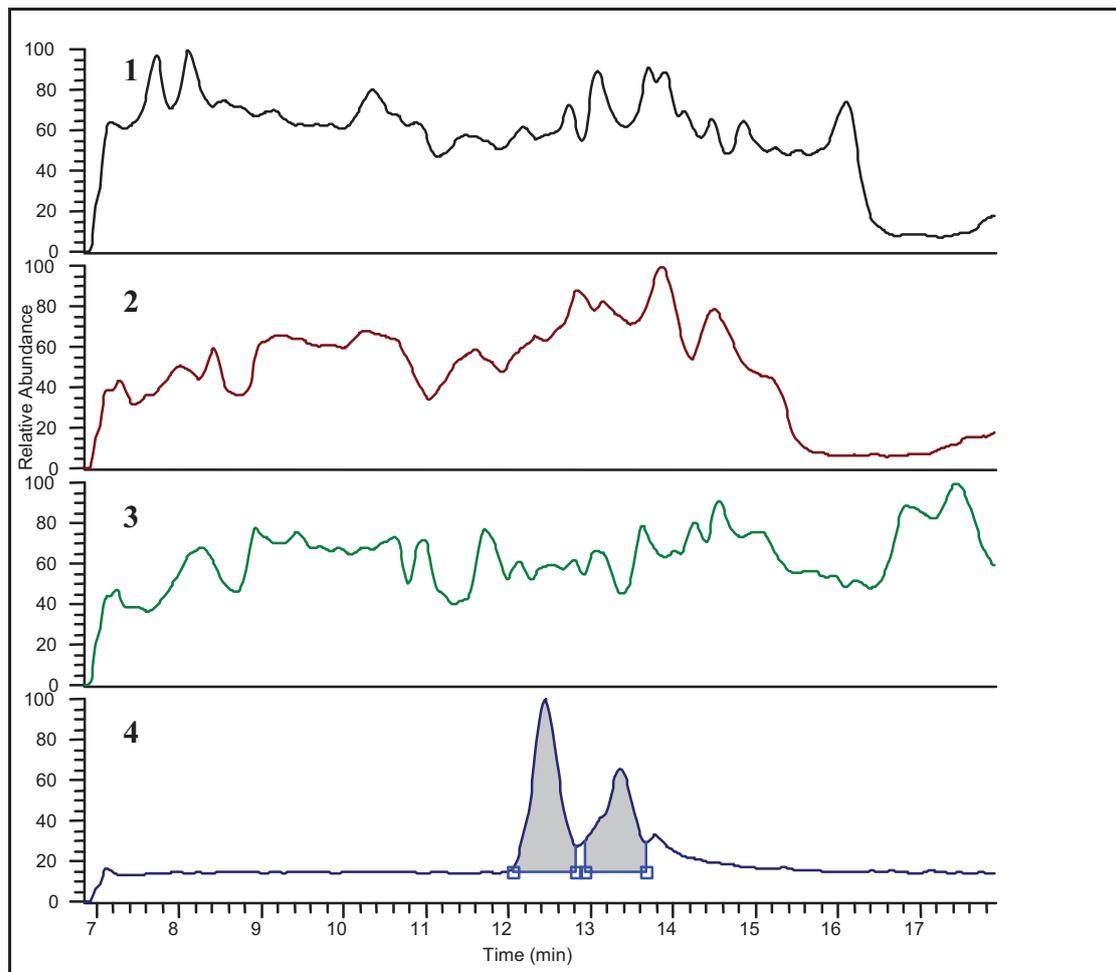


Abbildung 30: LC-MS SIM-Chromatogramme, (1) und (2) Chromatogramme BPD-SG-Proben (Inkubation von Caco-2-Zellen mit 10 µM 7,8-Diol-B[a]P für 24 h, 8 Wells gepoolt), (3) Chromatogramm Medium-Blank-Kontrolle, (4) Chromatogramm BPD-SG-Kalibrierlösung

Die Entwicklung eines SPE-Verfahrens für die GSH-Konjugate ergab die effektivste Anreicherung der Analyten sowie Abtrennung von Matrixbestandteilen bei Einsatz eines C-18-Materials (Bakerbond, Kapitel 3.4). Unter SIM-Bedingungen konnten jedoch – selbst durch Aufkonzentrierung der Analyten während des *Clean-Up* – keine BPD-SG-Konjugate in den untersuchten Proben nachgewiesen werden. Daher wurde zur Quantifizierung der GSH-Konjugate eine Methodenoptimierung herangezogen, welche zur Etablierung einer SRM-Methode führte. Diese stellt eine selektivere und sensitivere Methode als die SIM-Methode dar und erlaubt auch im Falle von geringen BPD-SG-Konzentrationen eine genaue Integration der Peaks. Für die Bestimmung im SRM-Modus wurde ein geeignetes Fragment des Analyten

ausgewählt und es wurden die massenspektrometrischen Parameter für dieses Fragment-Ion optimiert. Durch Variation der Parameter sollte eine deutliche Anzeige im Massenspektrometer erzielt und damit eine möglichst empfindliche Messmethode gefunden werden. Das in Abbildung 31 dargestellte Massenspektrum zeigt das Molekül-Ion und die Glutathion-spezifischen Fragmente des BPD-SG in einer Mediumprobe.

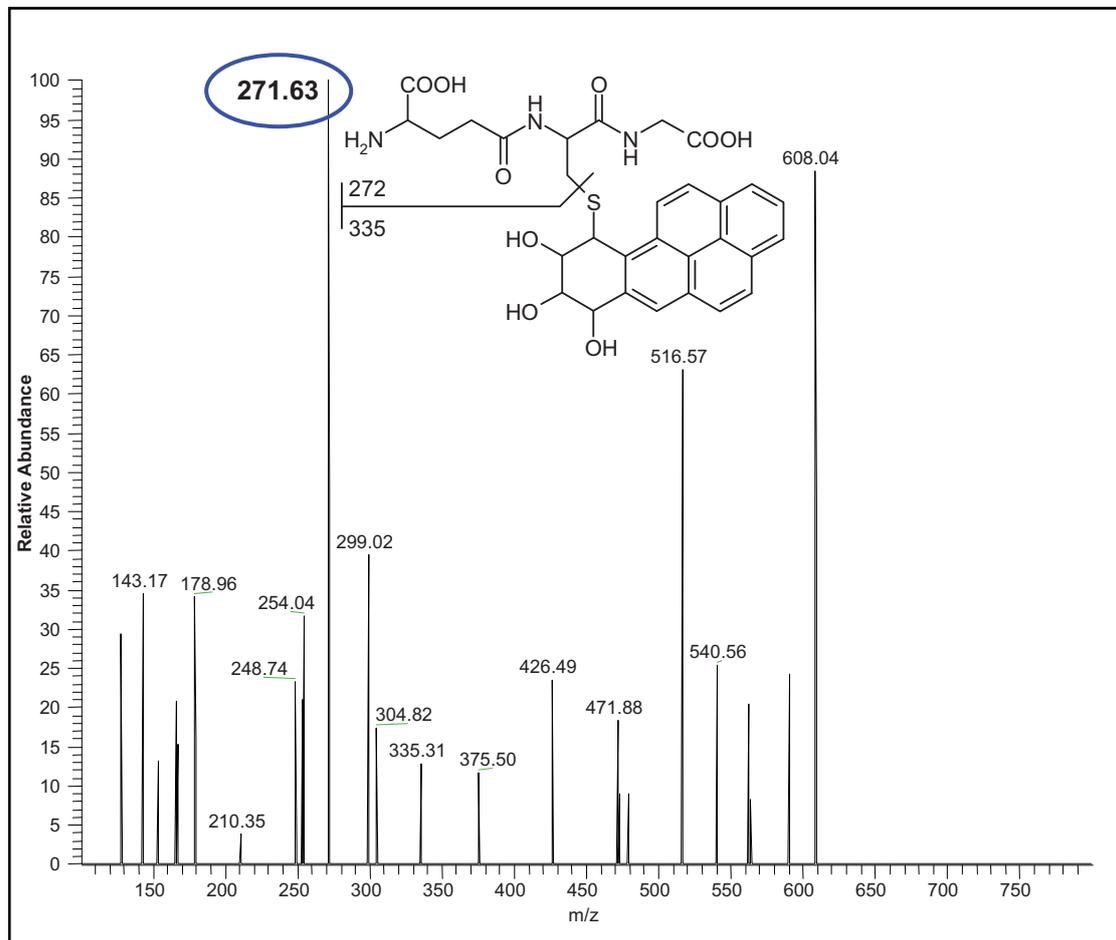


Abbildung 31: MS-Spektrum des BPD-SG aus dem LC-MS/MS-Lauf (ESI-negativ, DAU-Modus) einer Mediumprobe

Für die quantitative Analyse wurde das Fragment m/z 272 ausgewählt, da es bei der Fragmentierung von BPD-SG im Massenspektrometer als eines der Hauptfragmente gebildet wird (Abb. 32).

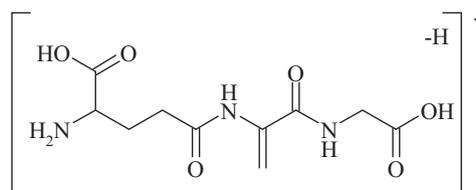


Abbildung 32: GSH-Fragment m/z 272 (ESI-negativ)

Dieses Fragment entsteht aus dem Glutathionteil des Moleküls durch Spaltung zwischen dem Schwefelatom und dem Glutathionrest unter gleichzeitiger Abgabe zweier Wasserstoffatome

bei der Einwirkung des Kollisionsgases Argon im Massenspektrometer. Die Wahl des Ions m/z 335 wäre eigentlich spezifischer gewesen, da es sich hierbei um ein Fragment aus BPDE und dem Schwefelatom des Glutathions handelt, welches ebenfalls aus dem BPD-SG-Konjugat gebildet wird. Die angezeigte Intensität dieses Fragments war jedoch sehr gering und folglich hätte sich eine unzureichende Sensitivität für die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ergeben. Dies hätte wiederum den Nachteil gehabt, dass geringe Probenkonzentrationen an BPD-SG-Konjugaten im Massenspektrometer nicht hätten detektiert werden können.

Für den internen Standard 1-MP-SG wurde in analoger Weise ein geeignetes Fragment für die Quantifizierung ausgewählt. In Abbildung 33 ist das Massenspektrum des 1-MP-SG dargestellt, welches bei negativer ESI-Ionisierung neben dem Molekül-Ion m/z 520 $[M-H]^-$ auch die Glutathion-spezifischen Fragmente aufweist.

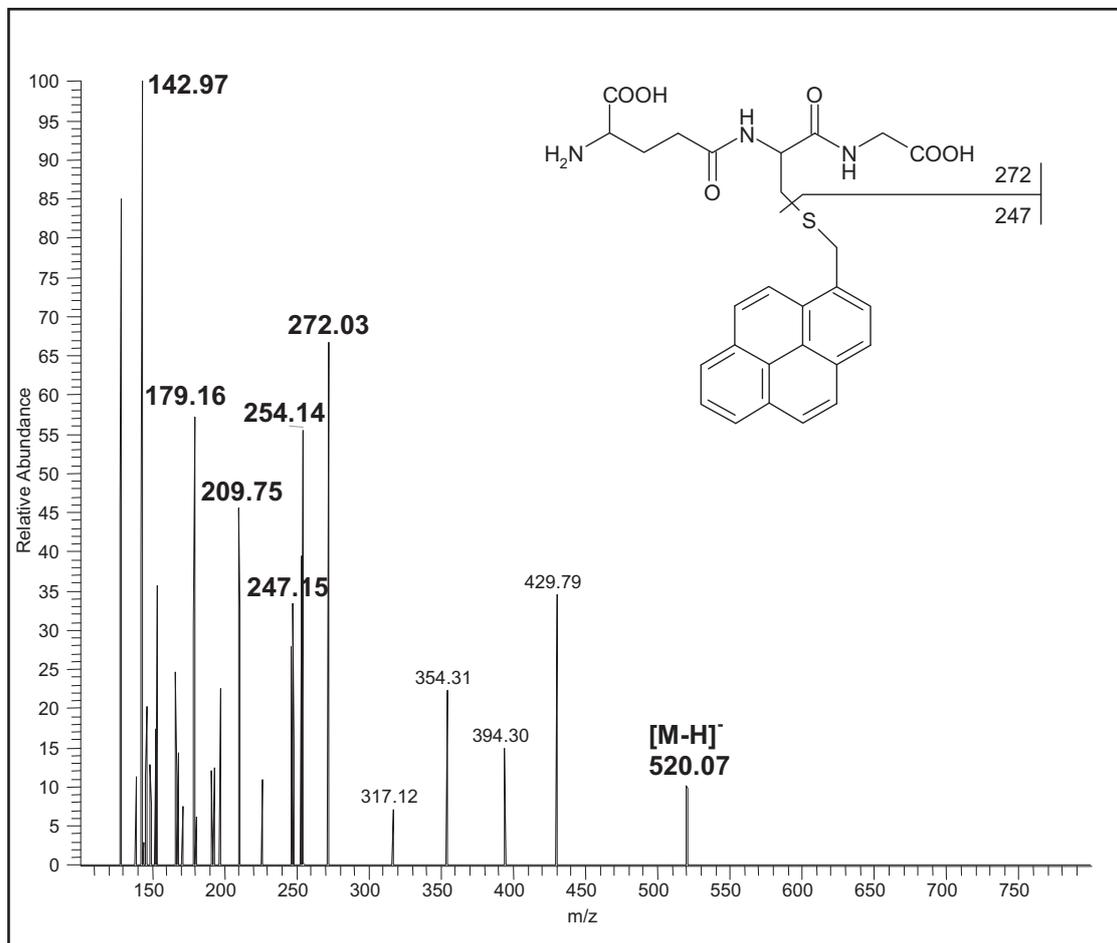


Abbildung 33: MS-Spektrum des 1-MP-SG aus dem LC-MS/MS-Lauf (DAU-Modus) einer vor dem Clean-Up mit internem Standard versetzten Mediumprobe

Für das 1-MP-SG wurde ebenfalls das Fragment m/z 272 für die quantitative Bestimmung ausgewählt, da es auch bei diesem GSH-Konjugat eines der Hauptfragmente darstellte.

Die in Abbildung 34 gezeigten Chromatogramme wurden aus den BPD-SG-Proben erhalten, bei denen im SIM-Modus keine GSH-Konjugate detektiert werden konnten (Abb. 30,

Chromatogramme 1 und 2). Im SRM-Modus hingegen ließen sich die BPD-SG-Konjugate dieser Proben eindeutig nachweisen.

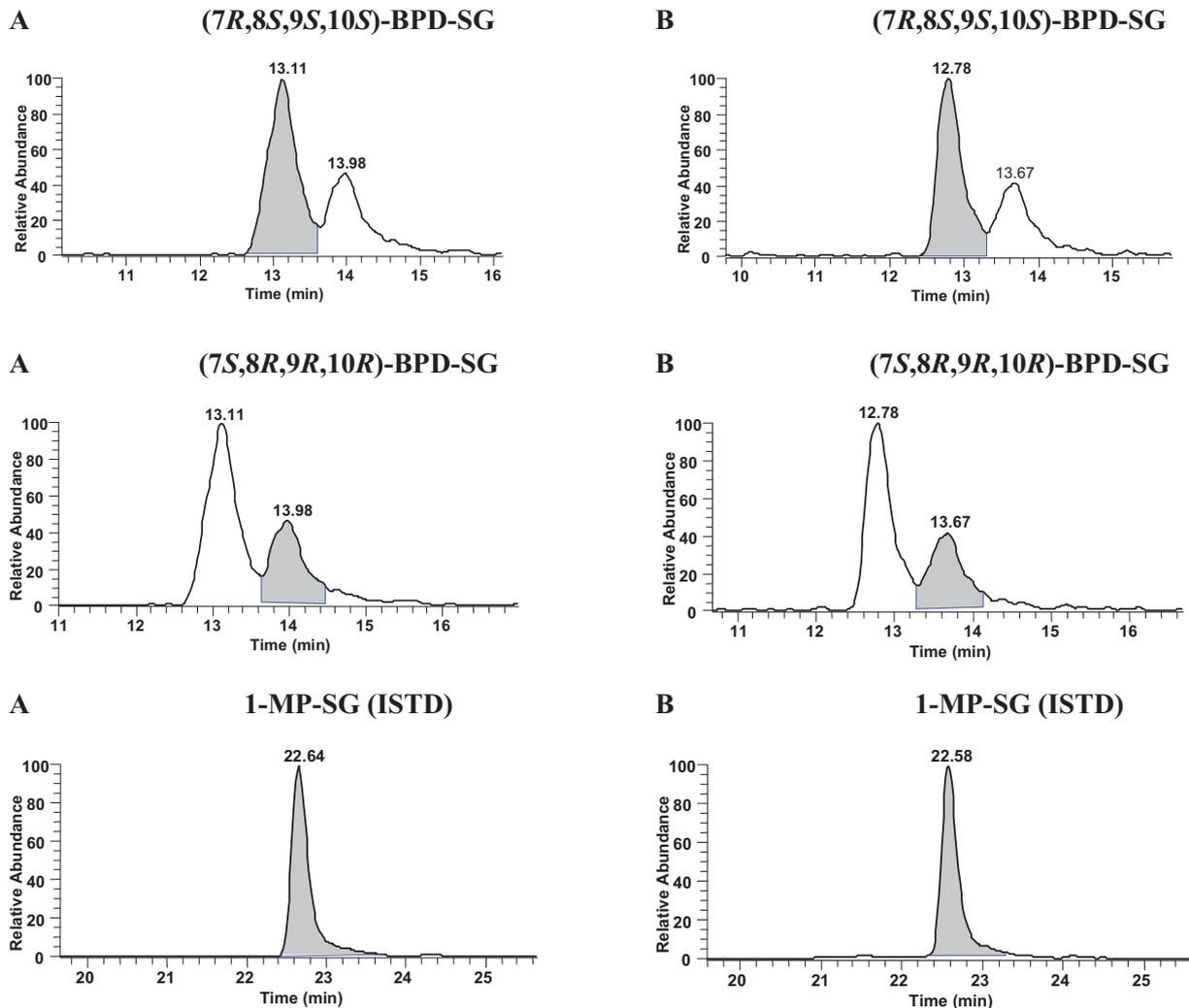


Abbildung 34: Chromatogramm-Ausschnitte von BPD-SG-Mediumproben (Inkubation mit 10 μ M 7,8-Diol-B[a]P für 24 h, 8 Wells gepoolt) im SRM-Modus, (A) Probe aus Chromatogramm 1 von Abbildung 30, (B) Probe aus Chromatogramm 2 von Abbildung 30

Eine Optimierung der Kollisionsenergie (*Collision cell offset voltage*, Coff) für die Analyten ergab bei 22 V für m/z 272 bezogen auf die absolute Signalintensität den höchsten Wert (Kapitel 10.1.1.1). Daher wurde für die Bestimmung der BPD-SG-Konjugate die Einstellung m/z 608 \rightarrow 272 (22 V) für die SRM-Methode gewählt. Für den internen Standard erwies sich eine Kollisionsenergie von 25 V als am besten geeignet, so dass die Bedingungen m/z 520 \rightarrow 272 (25 V) zur Quantifizierung eingesetzt wurden.

Abbildung 35 zeigt das Chromatogramm einer BPD-SG-Kalibrierlösung, welches unter den optimierten Messbedingungen (Kapitel 3.4) aufgenommen wurde. Die Zuordnung der Peaks der BPD-SG-Diastereomeren erfolgte anhand von Literaturbefunden nach Funk (1992).

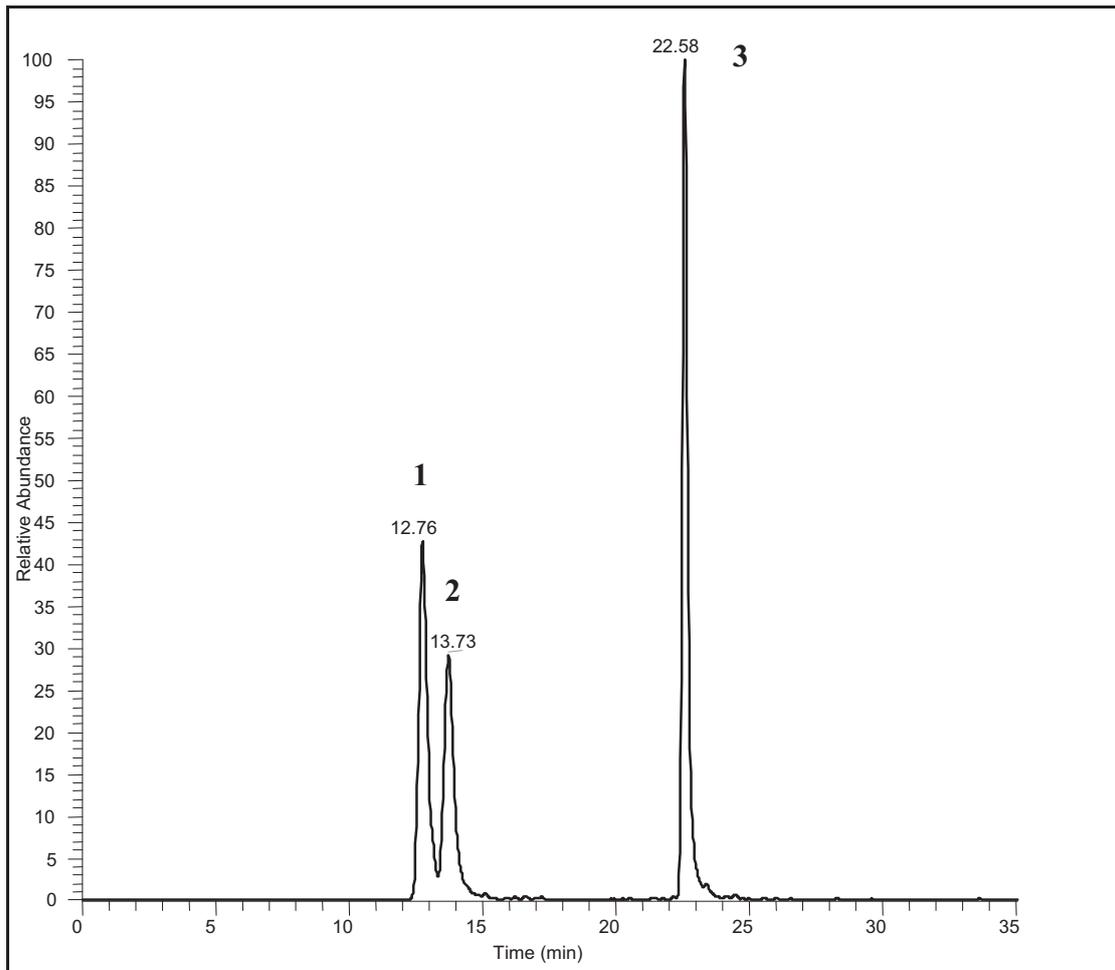


Abbildung 35: Beispielchromatogramm einer BPD-SG-Kalibrierlösung im SRM-Modus (gesamtes Zeitfenster), Peakzuordnung: (1) (7R,8S,9S,10S)-BPD-SG, (2) (7S,8R,9R,10R)-BPD-SG, (3) 1-MP-SG (Interner Standard, ISTD)

Die Abbildungen 36 (Kalibrierlösung) und 37 (Medium- und Zellextraktprobe) geben einen Überblick über die einzelnen Chromatogramm-Zeitfenster, die für die Quantifizierung der beiden Analyten erforderlich sind.

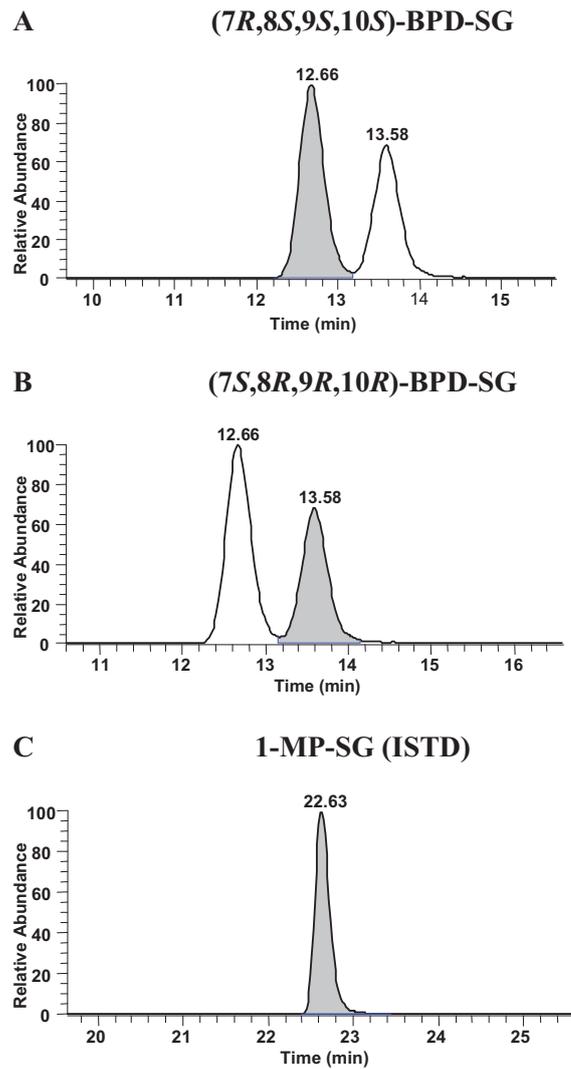


Abbildung 36: Beispielchromatogramm einer BPD-SG-Kalibrierlösung (Ausschnitte für die Quantifizierung). (A) (7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-BPD-SG, (B) (7*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-BPD-SG und (C) 1-MP-SG (ISTD)

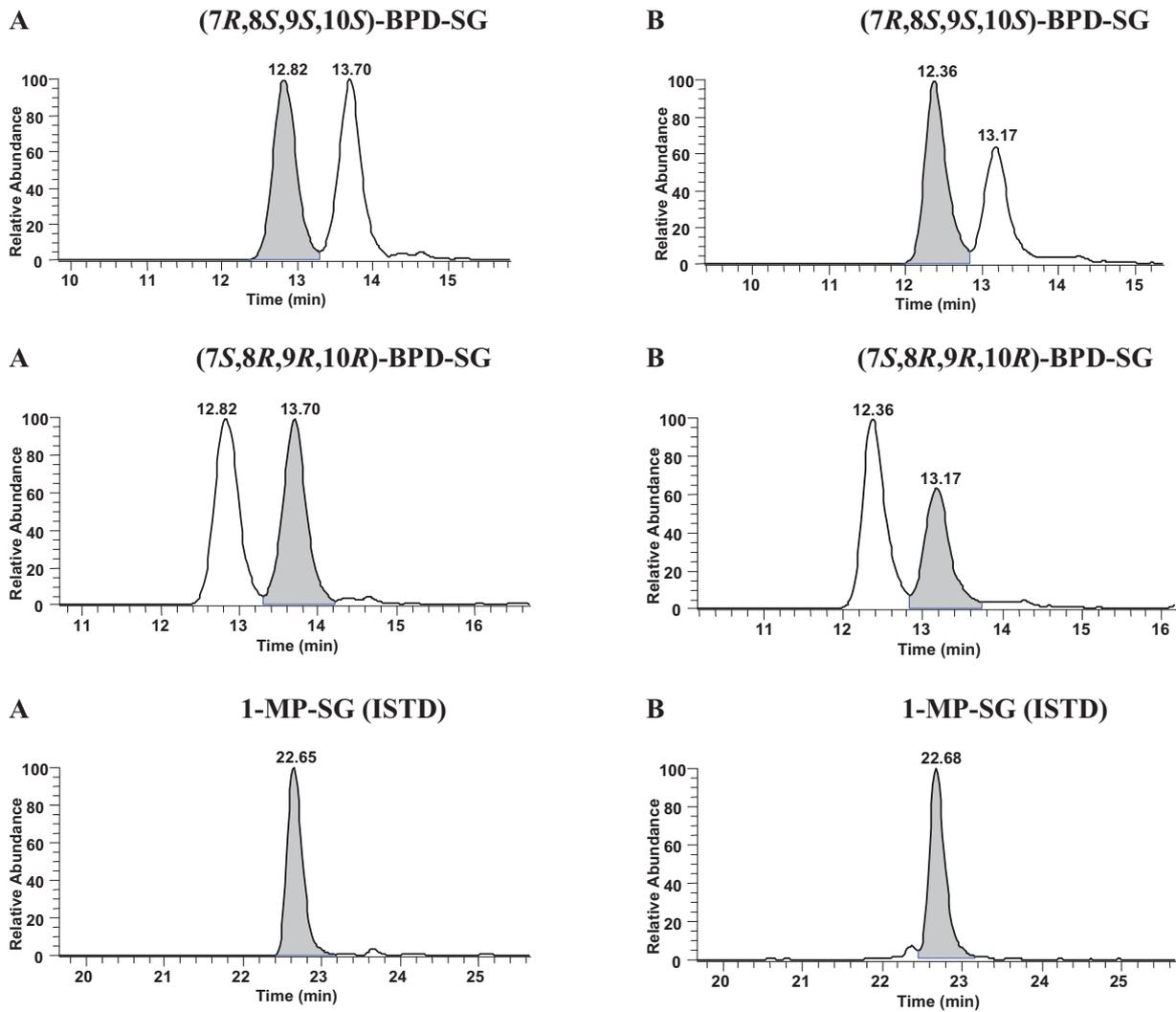


Abbildung 37: Beispielchromatogramme (A) einer Medienprobe aus dem Transwell™-System (Inkubation mit 10 μM 7,8-Diol-B[a]P für 24 h, 2 ml Medium) und (B) einer Zellextraktprobe (Inkubation mit 10 μM 7,8-Diol-B[a]P für 12 h, 4 ml Extrakt)

4.2.1.3 Bildung der BPD-SG-Konjugate und Transport ins Medium

Die Analytik von Zellextrakten und Medienüberständen erfolgte an zuvor mit 7,8-Diol-B[a]P inkubierten Caco-2-Zellen mittels LC-MS/MS nach entwickeltem *Clean-Up*. Hierbei waren BPD-SG-Konjugate im Zellextrakt detektierbar, wodurch die intrazelluläre Bildung dieser detoxifizierten Konjugate aus dem Vorläufermolekül 7,8-Diol-B[a]P über die Zwischenstufe des BPDE gezeigt werden konnte. Da in den untersuchten Medienproben ebenfalls BPD-SG-Konjugate nachgewiesen werden konnten, war folglich der Transport dieser Metaboliten aus der Zelle in das umgebende Medium bewiesen.

Die Abbildungen 38 und 39 umfassen die Analytik von Zellextrakten und Medienüberständen von Caco-2-Zellen, die mit 7,8-Diol-B[a]P (10 μM) jeweils 6 h, 12 h, 24 h oder 48 h behandelt worden waren. Außerdem erfolgten zusätzlich Vorinkubationen mit Oltipraz (50 μM für 48 h), dessen Strukturformel in Abbildung 10 zu finden ist und mit dem BCRP-Inhibitor Ko143 (5 μM für 1 h), welcher in Abbildung 11 dargestellt ist. Gezeigt sind in

beiden Abbildungen die MW \pm SD von jeweils 3 biologischen Replikaten. Zur besseren Vergleichbarkeit von Medien- und Zellextraktproben sind die GSH-Konzentrationen in ng/Probe angegeben.

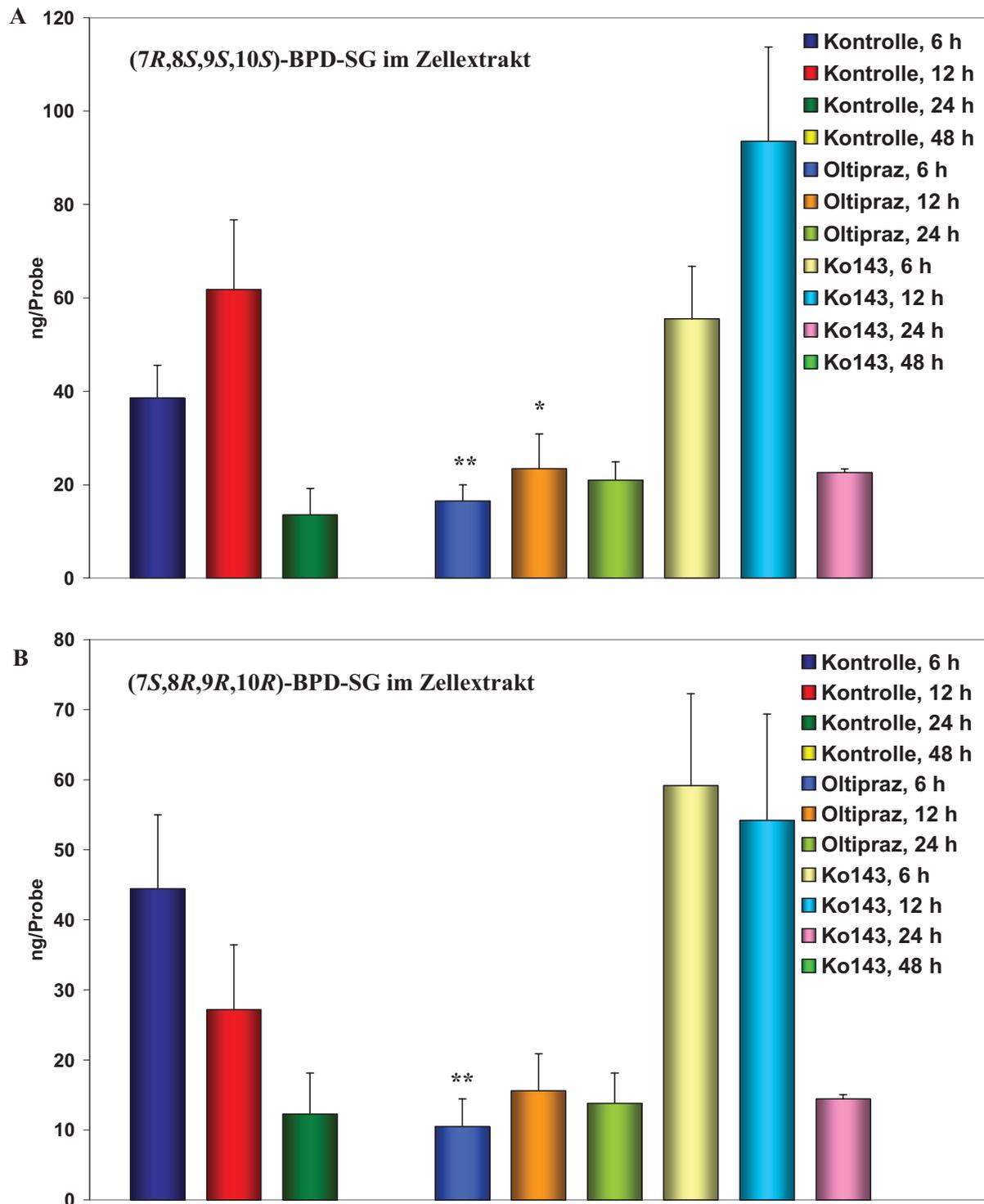


Abbildung 38: (A) $(7R,8S,9S,10S)$ -BPD-SG- und (B) $(7S,8R,9R,10R)$ -BPD-SG-Konjugate im Zellextrakt (intrazellulär) in ng/Probe. Die Proben wurden erhalten aus Inkubationen mit 7,8-Diol-B[a]P ($10 \mu\text{M}$) für 6 h, 12 h, 24 h oder 48 h. Vorinkubationen erfolgten mit Oltipraz ($50 \mu\text{M}$, 48 h), Ko143 ($5 \mu\text{M}$, 1 h) oder 0,1 % DMSO (Kontrolle). Gezeigt sind die MW \pm SD von jeweils 3 biologischen Replikaten. * $< p 0,05$; ** $< p 0,01$ (Student's T-Test gegen die jeweilige Kontrolle)

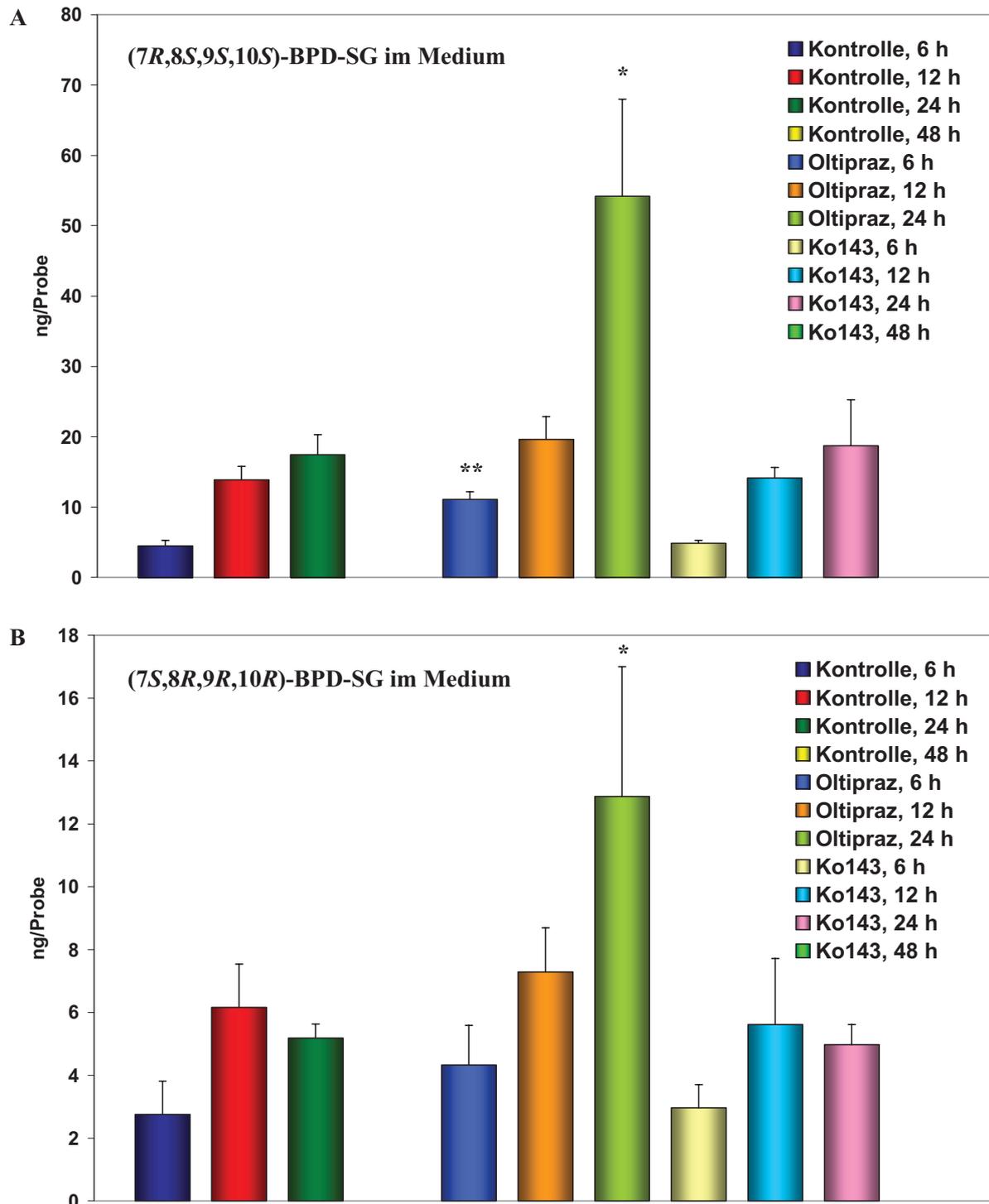


Abbildung 39: (A) $(7R,8S,9S,10S)$ -BPD-SG- und (B) $(7S,8R,9R,10R)$ -BPD-SG-Konjugate im Medium (extrazellulär) in ng/Probe. Die Proben wurden generiert aus Inkubationen mit 7,8-Diol-B[a]P ($10\ \mu\text{M}$) für 6 h, 12 h, 24 h oder 48 h. Vorinkubationen erfolgten mit Oltipraz ($50\ \mu\text{M}$, 48 h), Ko143 ($5\ \mu\text{M}$, 1 h) oder 0,1 % DMSO (Kontrolle). Gezeigt sind die MW \pm SD von jeweils 3 biologischen Replikaten. * < p 0,05; ** < p 0,01 (Student's T-Test gegen die jeweilige Kontrolle)

Es wurde die Zeitabhängigkeit der ins Medium transportierten und im Zellinneren enthaltenen GSH-Konjugate $(7S,8R,9R,10R)$ -BPD-SG und $(7R,8S,9S,10S)$ -BPD-SG bestimmt, die mit

GSH und unter GST-Katalyse aus dem intrazellulär durch CYP-vermittelte Oxidation entstandenen BPDE gebildet wurden. Die Untersuchungen ergaben einen zeitabhängigen Anstieg der Konzentrationen beider GSH-Konjugate im Medium, wobei die höchsten Gehalte jeweils zwischen 12 h und 24 h ermittelt wurden und nach einer Inkubationsdauer von 48 h keine GSH-Konjugate mehr nachweisbar waren (Abb. 39). Im analysierten Zellextrakt hingegen lag das Konjugatmaximum zwischen 6 h und 12 h (Abb. 38). Diese Beobachtung ist in der zunächst ansteigenden Bildung der GSH-Konjugate über die Zwischenstufe von BPDE und der anschließend vermehrten Exkretion in das umgebende Medium begründet.

Während intrazellulär überwiegend ähnliche Konzentrationen beider BPD-SG-Diastereomere bestimmt wurden, zeigte der Transport der Konjugate eine Stereoselektivität zugunsten des (7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-BPD-SG, welches extrazellulär in bis zu 4-fach höherer Menge verglichen mit dem (7*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-BPD-SG nachweisbar war.

Bei Vorbehandlung der Caco-2-Zellen mit Oltipraz erhöhte sich der Efflux ins Medium, wobei ein annähernd linearer Anstieg der GSH-Konjugate im Medium sichtbar war. Oltipraz bewirkte, dass der Transport ins Medium für beide BPD-SG-Konjugate bei einer Inkubationsdauer von 24 h im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht war. Die Bestimmung der GSH-Konjugat-Gehalte im Zellextrakt ergab folgende Beobachtung: Ohne vorherige Behandlung mit Oltipraz war spätestens ab 24 h Inkubationszeit eine deutliche Konjugatabnahme im Zellextrakt nachweisbar. Nach einer zuvor durchgeführten Oltipraz-Behandlung zeigten die Zellextrakte zu allen Zeitpunkten relativ konstante Konzentrationen beider GSH-Konjugate auf. Diese Gehalte waren jedoch niedriger als die in den Ansätzen ohne Vorbehandlung mit Oltipraz erhaltenen Konjugatmengen.

Die Vorinkubation der Zellen mit dem BCRP-Inhibitor Ko143 sollte zeigen, ob der BCRP-Transporter in die Transportvorgänge der BPD-SG-Konjugate involviert war. Hierbei ergab sich jedoch keine Auswirkung auf den BPD-SG-Konjugat-Transport aus der Zelle ins Medium. Die entsprechenden Gehalte an BPD-SG-Konjugaten in den zugehörigen Medienproben waren bei den Zellansätzen, die mit und ohne Ko143 behandelt worden waren, nahezu identisch.

4.2.1.4 Induktion des Transportes der BPD-SG-Konjugate im TranswellTM-System

In den in Kapitel 4.2.1.3 dargestellten Befunden konnte bereits ein induktiver Effekt durch Oltipraz beobachtet werden. Daher sollte das Induktionsphänomen von Oltipraz und weiterer Induktoren genauer untersucht werden. Für dieses Experiment wurde der gerichtete Transport im TranswellTM-System verwendet, um Unterschiede zwischen apikalen und basolateralen Kompartimenten bestimmen zu können. Abbildung 40 zeigt die analytischen Ergebnisse von Medienproben aus dem TranswellTM-System von Caco-2-Zellen, die mit Oltipraz (50 µM), Butyrat (5 mM) oder Quercetin (50 µM) für 48 h vorinkubiert worden waren. Die Strukturformeln der potentiellen Induktoren sind in Abbildung 10 gezeigt. Als Kontrolle diente ein Ansatz einer 0,1 %igen DMSO-Vorinkubation. Im Anschluss erfolgte eine

Behandlung mit 7,8-Diol-B[a]P (10 μ M) für 24 h, wobei das Inkubationsagens jeweils in die obere und die untere Kammer des TranswellTM-Systems gegeben wurde. Dargestellt sind die MW \pm SD von jeweils 3 biologischen Replikaten.

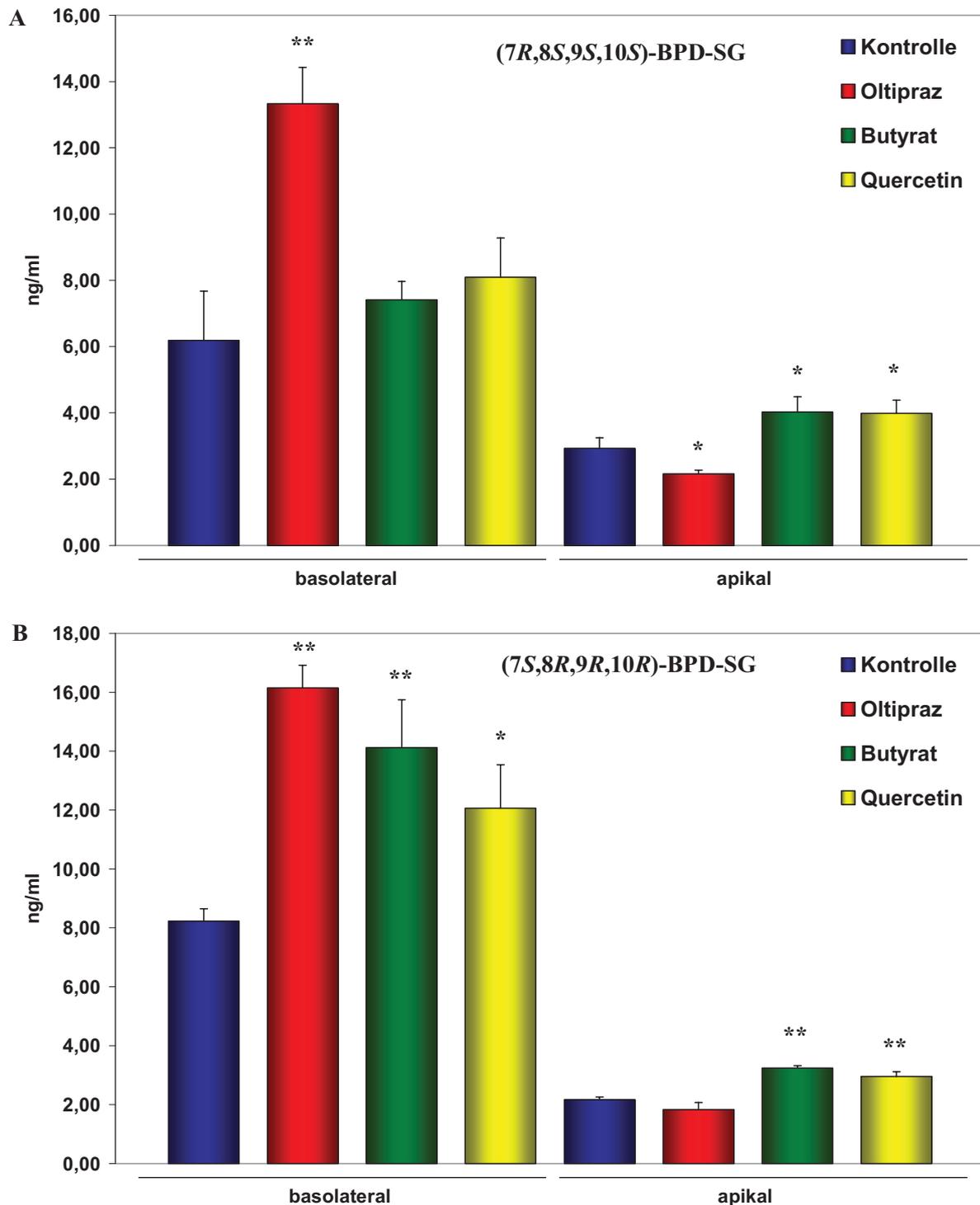


Abbildung 40: (A) (7R,8S,9S,10S)-BPD-SG- und (B) (7S,8R,9R,10R)-BPD-SG-Konjugate in ng/ml von Medien-Proben aus dem TranswellTM-System nach Vorinkubation mit Oltipraz (50 μ M), Butyrat (5 mM), Quercetin (50 μ M) oder 0,1 % DMSO (Kontrolle) für 48 h und anschließender Behandlung mit 7,8-Diol-B[a]P (10 μ M) für 24 h. Gezeigt sind die MW \pm SD von jeweils 3 biologischen Replikaten. * < p 0,05; ** < p 0,01 (Student's T-Test gegen die jeweilige Kontrolle)

Bei den Transport-Untersuchungen im TranswellTM-System zeigt sich in Abbildung 40, dass die gebildeten GSH-Konjugate sowohl in basolateraler als auch in apikaler Richtung transportiert wurden. Jedoch waren basolateral jeweils mehr GSH-Konjugate zu messen als apikal, so dass der Nettoflux in basolateraler Richtung verlief. Die Zellen transportieren die Konjugate also überwiegend in Richtung Blutkreislauf und nur in geringerem Maße in Richtung Darmlumen. Das (7*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-BPD-SG wurde selektiver in basolateraler Richtung befördert, während das (7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-BPD-SG, welches aus dem kanzerogenen (+)-*anti*-BPDE gebildet wird, anteilig etwas stärker als das (7*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-BPD-SG auch in apikaler Richtung ausgeschleust wurde.

Der Zusatz des Chemotherapeutikums Oltipraz führte zu einer signifikanten Steigerung der Konjugatmenge im Medium gegenüber der Kontrolle. Während die basolaterale (7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-BPD-SG-Konzentration circa doppelt so hoch war wie der Ansatz ohne Oltipraz, zeigte die apikale (7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-BPD-SG-Konzentration im Vergleich zum Ansatz ohne Oltipraz jedoch eine leichte Abnahme der Konjugatmenge. Das (7*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-BPD-SG zeigte in basolateraler Transportrichtung ein dem (7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-BPD-SG sehr ähnliches Bild nach Oltipraz-Behandlung, während in apikaler Richtung nahezu identische Konzentrationen bei Oltipraz-Vorinkubation und Kontrolle feststellbar waren.

Vorinkubationen mit Butyrat und Quercetin bewirkten einen erhöhten BPD-SG-Transport, sowohl des (7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)- als auch des (7*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-BPD-SG-Konjugates. Bei Zugabe von Butyrat war insbesondere beim (7*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-BPD-SG ein signifikanter Anstieg der Konjugat-Konzentration in basolateraler Richtung im Vergleich zum Kontrollansatz zu erkennen. In apikaler Richtung ließen sich für beide BPD-SG-Konjugate nach Butyrat-Behandlung signifikant gesteigerte Konzentrationen im Medium bestimmen. Ähnlich verhielt es sich auch nach Vorinkubation mit Quercetin. Hier waren ebenfalls basolateral signifikant erhöhte (7*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-BPD-SG-Konzentrationen sowie apikal signifikant erhöhte (7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)- und (7*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-BPD-SG-Konjugatmengen detektierbar.

4.2.1.5 Inhibition des Transportes der BPD-SG-Konjugate im TranswellTM-System

Um die am Transport der BPD-SG-Konjugate beteiligten Transporter ermitteln zu können, wurden zu einzelnen Zellansätzen Inhibitoren für ausgewählte Transporter zugegeben. Hierbei diente der Inhibitor MK571 (50 µM) für die MRP-Transporter sowie der Inhibitor Ko143 (5 µM) für den Transporter BCRP. Die Strukturformeln beider Substanzen sind in Abbildung 11 dargestellt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurden die Zellen mit 7,8-Diol-B[a]P (10 µM) für 48 h ko-inkubiert. Kontrollansätze wurden nach 0,1 %-DMSO-Vorbehandlung ebenfalls mit 7,8-Diol-B[a]P inkubiert. Die Substanzen wurden jeweils in beide Kammern des TranswellTM-Systems appliziert. Gezeigt sind in Abbildung 41 die MW ± SD von jeweils 3 biologischen Replikaten.

Bezüglich der untersuchten Inhibitoren MK571 und Ko143 ließ sich feststellen, dass bei Vorinkubation mit MK571 weder basolateral noch apikal BPD-SG-Konjugate nachweisbar

waren. Dies bedeutet folglich, dass die MRP-vermittelte Konjugat-Exkretion signifikant gehemmt wurde. Bei den entsprechenden Ansätzen mit Ko143 waren die erhaltenen Konjugat-Mengen basolateral und apikal nahezu unverändert im Vergleich zur Kontrolle. Diese Versuche führten zu der Annahme, dass nicht BCRP sondern MRPs für den aktiven Transport der BPD-SG-Konjugate verantwortlich sind (Abb. 41).

Diese Hypothese konnte durch weitere Inkubationen mit unterschiedlichen Konzentrationen an MK571 verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Eine spezifische Hemmung durch MK571 besteht nicht nur für MRP2, sondern auch für die basolateral exprimierten MRPs 1, 3, 4 und 5 (Weiss *et al.* 2007). Da jedoch sehr spezifische Hemmstoffe nicht verfügbar waren, war es mittels Inhibitionsexperimenten nicht möglich, das für den aktiven Transport verantwortliche MRP zu bestimmen.

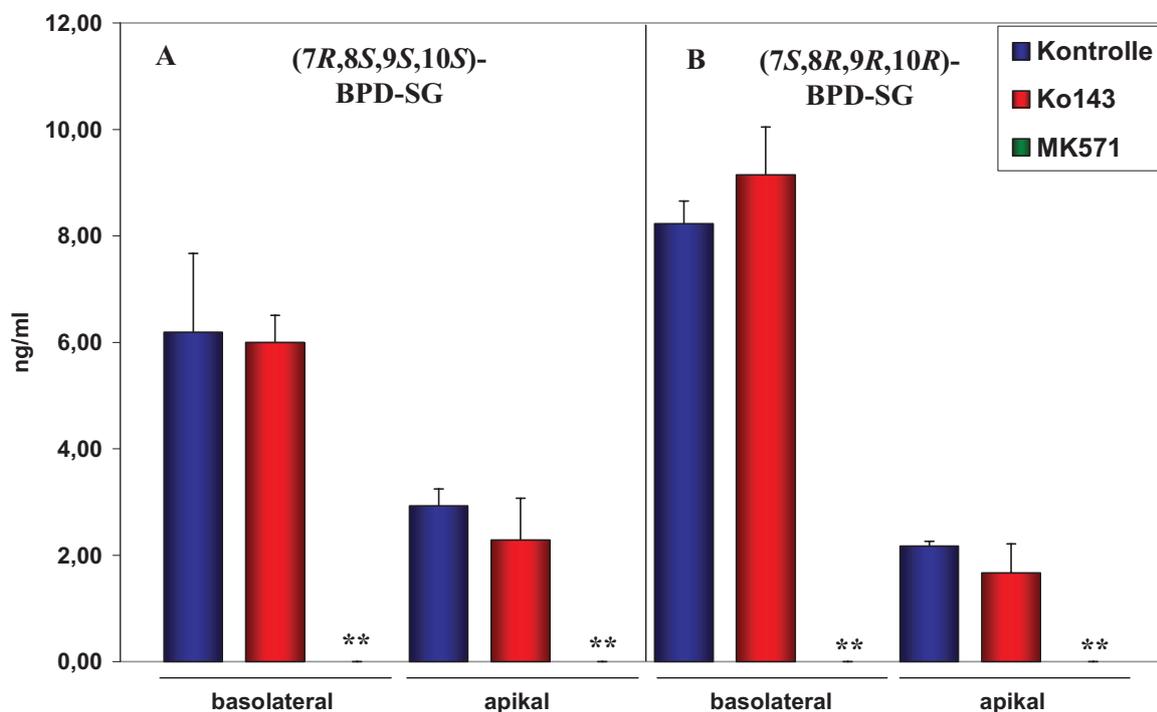


Abbildung 41: (A) (7R,8S,9S,10S)-BPD-SG- und (B) (7S,8R,9R,10R)-BPD-SG-Konjugate in ng/ml nach Vorinkubation der Proben mit Ko143 (5 μ M, 1 h), MK571 (50 μ M, 1 h) oder 0,1 % DMSO (Kontrolle) und anschließender Ko-Behandlung mit 7,8-Diol-B[a]P (10 μ M, 48 h) im TranswellTM-System. Gezeigt sind die MW \pm SD von jeweils 3 biologischen Replikaten.

** < p 0,01 (Student's T-Test gegen die jeweilige Kontrolle)

4.2.1.6 Inkubationen der Caco-2-Zellen mit BPDE im TranswellTM-System

Um die metabolische Reaktion vom 7,8-Diol-B[a]P über das BPDE zum BPD-SG-Konjugat zu umgehen, wurden die Caco-2-Zellen in diesem Ansatz direkt mit einem racemischen Gemisch aus (\pm)-anti-BPDE inkubiert. Dabei lässt sich eine Stereoselektivität der GSH-Konjugation des anti-BPDE und des anschließenden Transportes in dieser Zelllinie direkt ableiten. Die Inkubationen erfolgten ebenfalls beidseitig im TranswellTM-System mit 10 μ M

BPDE für 4 h, 8 h, 12 h sowie 24 h. Die Darstellung in Abbildung 42 umfasst die MW \pm SD von jeweils 3 biologischen Replikaten.

Die beiden (7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-BPD-SG- und (7*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-BPD-SG-Konjugate sind etwa in ähnlichen Verhältnissen in den basolateralen Kammern nachweisbar (Abb. 42). Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist die Tatsache, dass mit (+)-*anti*- und (-)-*anti*-BPDE in identischer Menge inkubiert wurde, während bei einer Inkubation mit 7,8-Diol-B[a]P bevorzugt das (+)-*anti*-BPDE gebildet wurde, welches wiederum die vermehrte Entstehung des (7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-BPD-SG begünstigte. In apikaler Richtung wurde hingegen ein selektiver Transport nachgewiesen, wobei höhere Mengen des (7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-BPD-SG im Vergleich zum (7*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-BPD-SG-Konjugat transportiert wurden. Generell konnten weniger BPD-SG-Konjugate in den apikalen Kammern als in den basolateralen Kammern detektiert werden.

Insgesamt führten die Inkubationen mit BPDE zu höheren BPD-SG-Konjugat-Konzentrationen als bei Behandlungen mit 7,8-Diol-B[a]P, wofür die direkte Reaktion vom BPDE mit Glutathion ohne erforderlichen Zwischenschritt verantwortlich ist. So zeigten die Ansätze mit 10 μ M BPDE mehr als 5-fach höhere BPD-SG-Gehalte im Vergleich zur Inkubation mit 10 μ M 7,8-Diol-B[a]P.

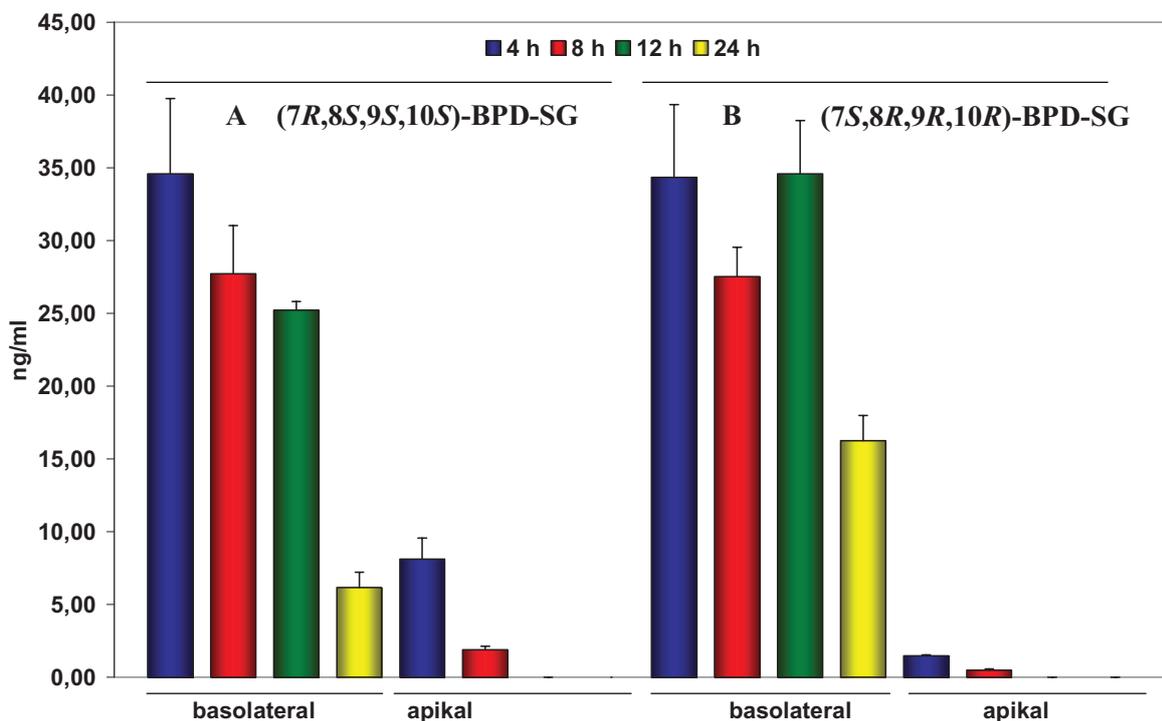


Abbildung 42: (A) (7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-BPD-SG- und (B) (7*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-BPD-SG-Konjugate in ng/ml nach Inkubation der Proben mit 10 μ M BPDE für 4 h, 8 h, 12 h oder 24 h im TranswellTM-System. Dargestellt sind die MW \pm SD von jeweils 3 biologischen Replikaten.

Die ermittelte Gesamtmenge von exportierten GSH-Konjugaten im Vergleich zur eingesetzten Menge 7,8-Diol-B[a]P zeigte, dass die Inkubation nur etwa 0,2 % an BPD-SG-

Konjugaten in den Medienproben hervorbrachte. Eine Behandlung der Caco-2-Zellen mit BPDE ergab eine BPD-SG-Konzentration von etwa 1,1 % im Medium verglichen mit der eingesetzten BPDE-Menge.

4.2.2 Bestimmung von B[a]P-Metaboliten mittels HPLC-FL

Die quantitative Bestimmung der B[a]P-Metaboliten aus Medium und Zellextrakt erfolgte mit Perylen (PER) als internem Standard und mittels Response-Faktoren, die zuvor anhand der Referenzsubstanzen ermittelt worden waren. Für die Auswertung wurden aufgrund der höheren Empfindlichkeit die Fluoreszenz-Chromatogramme (Abb. 43) verwendet.

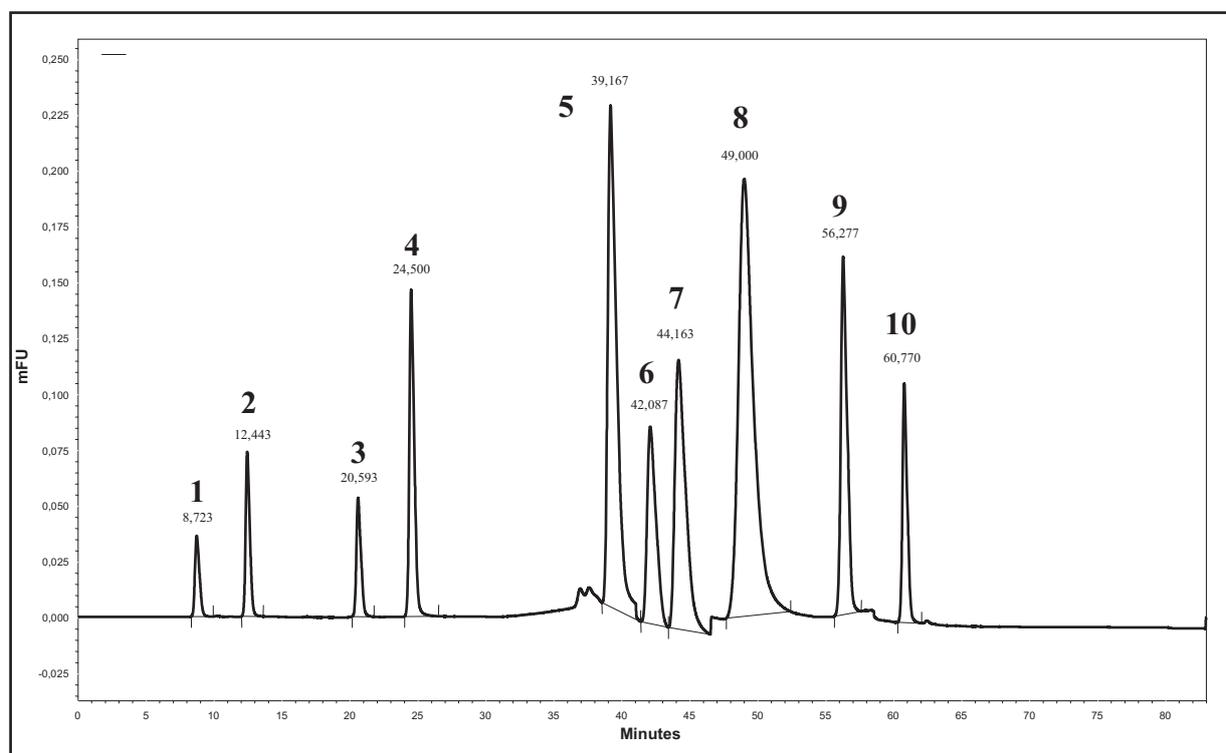


Abbildung 43: Referenz-HPLC-FL-Chromatogramm der B[a]P-Metaboliten (1: Tetrol-B[a]P, 2: 9,10-Diol-B[a]P, 3: 4,5-Diol-B[a]P, 4: 7,8-Diol-B[a]P, 5: 9-OH-B[a]P, 6: 7-OH-B[a]P, 7: 1-OH-B[a]P, 8: 3-OH-B[a]P, 9: PER, 10: B[a]P)

4.2.2.1 Bildung der B[a]P-Metaboliten und Transport ins Medium

Zur Analytik von B[a]P-Metaboliten wurden in Zellkulturflaschen ausdifferenzierte Caco-2-Zellen mit 10 μ M B[a]P 24 h, 48 h und 72 h inkubiert und Zellextrakte sowie Medien mittels HPLC-FL nach entwickeltem *Clean-Up* analysiert. Gezeigt sind in Abbildung 44 die MW von jeweils 3 biologischen Replikaten. Hierbei wurde die Zeitabhängigkeit der im Zellinneren enthaltenen und der ins Medium transportierten Phenole (1-, 3- und 9-OH-B[a]P) sowie Dihydrodiole (4,5-, 7,8- und 9,10-Diol-B[a]P) und des 7,8,9,10-Tetrol-B[a]P bestimmt. Diese Reaktionen verlaufen unter CYP1A1- und CYP1B1-katalysierter Oxidation und anschließender Hydrolyse durch die mEH zu den Dihydrodiolen beziehungsweise nicht-

enzymatischer Isomerisierung zu den Phenolen. Die Phenole können dann zu Glucuroniden oder Sulfaten konjugiert werden. Die Bildung des Tetrols resultiert aus einer erneuten CYP-vermittelten Oxidation des 7,8-Diol-B[a]P zum BPDE und folgender spontaner Hydrolyse. Zur besseren Vergleichbarkeit von Medium- und Zellextraktproben sind die Metabolitenkonzentrationen in ng/Probe angegeben.

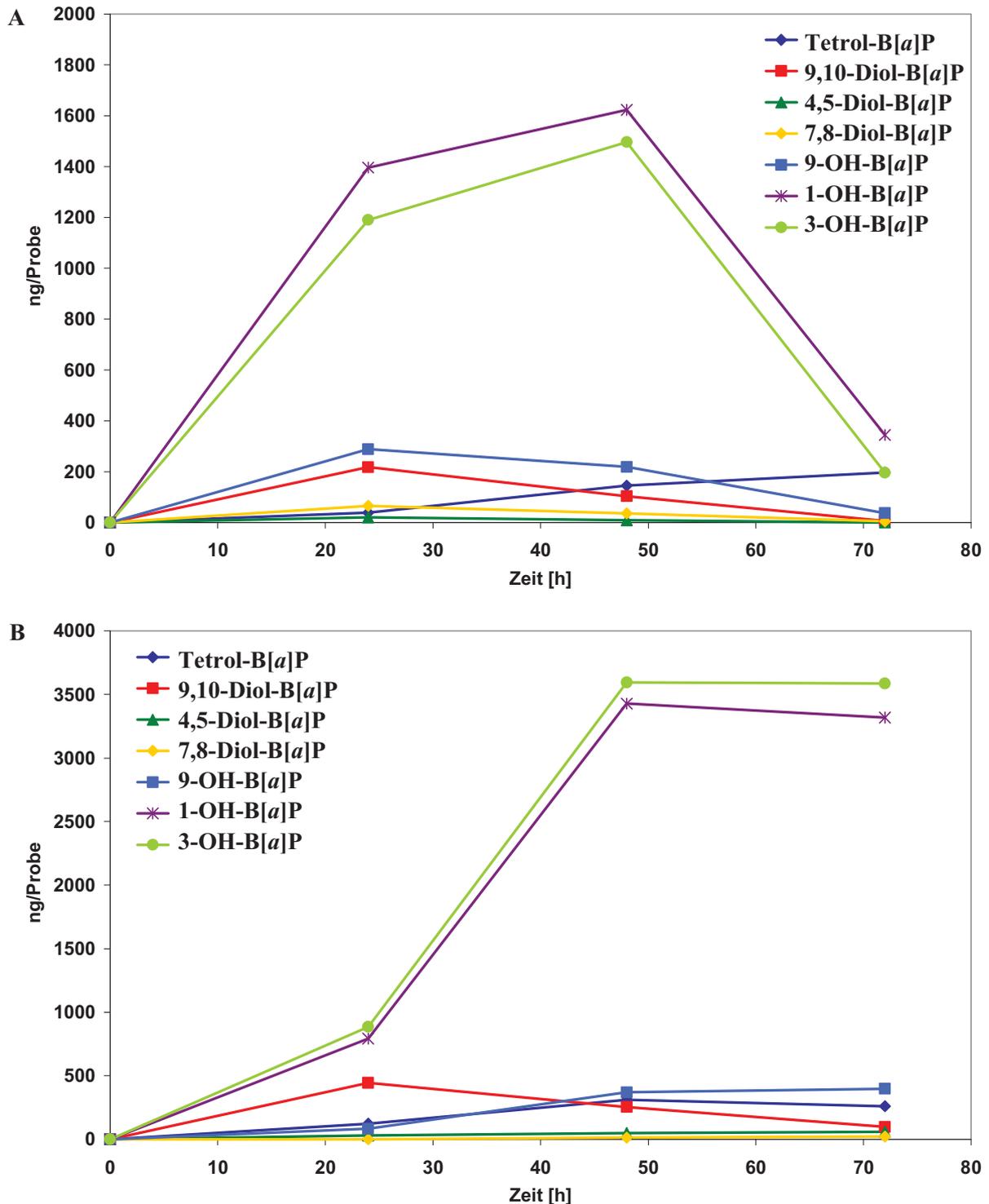


Abbildung 44: B[a]P-Metabolitenprofil (A) im Zellextrakt (intrazellulär) und (B) im Medium (extrazellulär) in ng/Probe nach Inkubation der Proben mit B[a]P (10 µM) für 24 h, 48 h oder 72 h. Gezeigt sind die MW von jeweils 3 biologischen Replikaten.

Die Analyse der inkubierten Caco-2-Zellen zeigte die Bildung und den Transport von 1-, 3- und 9-OH-B[a]P sowie von 4,5-, 7,8- und 9,10-Diol-B[a]P und vom 7,8,9,10-Tetrol-B[a]P. Das 7-OH-B[a]P konnte nicht nachgewiesen werden.

Der untersuchte Zellextrakt verfügte über Konzentrationsmaxima bei 24 h Inkubationszeit für die Dihydrodiol- 4,5-, 7,8- und 9,10-Diol-B[a]P und das 9-OH-B[a]P. Die Phenole 1- und 3-OH-B[a]P hingegen zeigten einen weiteren Konzentrationsanstieg bis zu 48 h Inkubationszeit, ebenso wie das 7,8,9,10-Tetrol-B[a]P, welches auch bis zur Inkubationsdauer von 72 h vermehrt gebildet wurde. Die Metaboliten mit der höchsten Bildungs- und Transportrate waren das 1- und 3-OH-B[a]P, die im Vergleich zu den anderen Metaboliten über 5-fach erhöhte Konzentrationen, sowohl im Zellextrakt als auch im Medium aufwiesen. Im Medium lag das Konzentrationsmaximum der Metaboliten bei einer späteren Inkubationszeit als im Zellextrakt, was die für den Transport notwendige Zeit erklärt. So zeigten 7,8,9,10-Tetrol-B[a]P und 1- und 3-OH-B[a]P bei 48 h ihr Maximum, während die 4,5- und 7,8-Diol-B[a]P- sowie 9-OH-B[a]P-Konzentrationen bis 72 h weiter leicht anstiegen. Lediglich das 9,10-Diol-B[a]P hatte bereits bei 24 h die höchste Konzentration im Medium erreicht und nahm anschließend kontinuierlich ab.

Beim Vergleich der Gesamtmenge an nachgewiesenen Metaboliten mit der Ausgangsmenge B[a]P zu Beginn der Inkubation konnten nach 24 h etwa 10 %, nach 48 h etwa 25 % und nach 72 h etwa 20 % Metabolisierungsprodukte ermittelt werden.

4.2.2.2 Induktion des Transportes der B[a]P-Metaboliten

Da im vorherigen Experiment gezeigt werden konnte, dass die Caco-2-Zellen Metaboliten des B[a]P bilden und auch transportieren, sollte in einem weiteren Versuch die Möglichkeit der Induktion von Bildung und Transport der nachgewiesenen Metaboliten 1-, 3- und 9-OH-B[a]P, 4,5-, 7,8- und 9,10-Diol-B[a]P und 7,8,9,10-Tetrol-B[a]P untersucht werden. Caco-2-Zellen wurden dazu für 48 h mit den Substanzen Oltipraz (50 μ M), Quercetin (50 μ M), Butyrat (5 mM) oder Benzo[k]fluoranthren (B[k]F) (5 μ M) vorbehandelt und anschließend mit 10 μ M B[a]P 24 h inkubiert. Zellextrakte und Medien wurden mittels HPLC-FL nach entsprechendem *Clean-Up* analysiert. Gezeigt sind in Abbildung 45 die $MW \pm SD$ von jeweils 3 biologischen Replikaten. Um die Metaboliten-Konzentrationen von Medium- und Zellextraktproben besser vergleichen zu können, sind die Gehalte in ng/Probe angegeben.

Die analysierten Zellextrakte zeigten bei Vorbehandlung mit Quercetin signifikant erhöhte Konzentrationen an 1- und 3-OH-B[a]P im Vergleich zur Kontrolle, während alle weiteren Inkubationsmittel ähnliche Metaboliten-Gehalte wie der Kontrollansatz ergaben (Abb. 45 (A)). Lediglich Vorinkubationen mit Butyrat führten zu einer signifikant verringerten Bildung von 7,8,9,10-Tetrol-B[a]P, 9,10-Diol-B[a]P und 1-OH-B[a]P. Im untersuchten Medium verursachte eine Vorbehandlung mit Oltipraz signifikant erhöhte 4,5-Diol-, 9-, 1- und 3-OH-B[a]P-Konzentrationen, während die B[k]F-Vorbehandlung einen leicht gesteigerten 3-OH-B[a]P-Gehalt ergab (Abb. 45 (B)). Quercetin- und Butyrat-Vor-

inkubationen hingegen führten zu gering verminderten 1- und 3-OH-B[a]P-Konzentrationen. Ansonsten wiesen alle Inkubationsansätze ähnliche Metaboliten-Konzentrationen auf. Dies lässt darauf schließen, dass die verwendeten Induktoren wenig Einfluss auf die CYP1A1- und CYP1B1-Enzyme haben und auch die involvierten Transportproteine kaum beeinflussen.

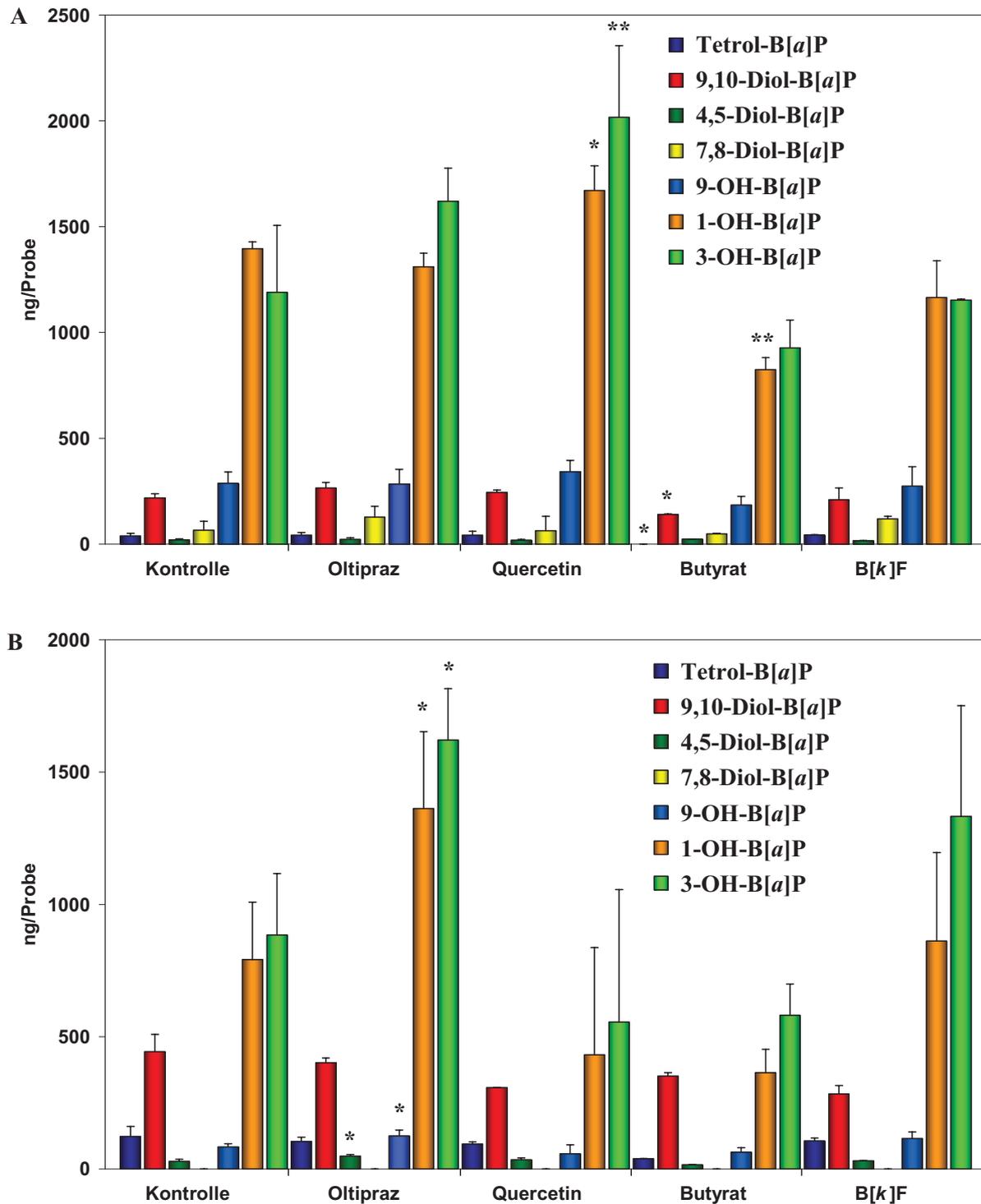


Abbildung 45: B[a]P-Metaboliten in ng/Probe (A) im Zellextrakt (intrazellulär) und (B) im Medium (extrazellulär) nach Vorinkubation für 48 h mit Oltipraz (50 μ M), Quercetin (50 μ M), Butyrat (5 mM), B[k]F (5 μ M) oder 0,1 % DMSO (Kontrolle) und anschließender Inkubation mit B[a]P (10 μ M) für 24 h. Dargestellt sind die MW \pm SD von jeweils 3 biologischen Replikaten. * < p 0,05; ** < p 0,01 (Student's T-Test gegen die jeweilige Kontrolle)

4.2.2.3 Qualitativer Nachweis von BPD-SG-Konjugaten

Um eine mögliche Bildung von GSH-Konjugaten nachzuweisen, wurden einzelne, zuvor mit B[a]P inkubierte Caco-2-Zellproben mittels LC-ESI-MS/MS (SRM- sowie DAU-Modus) analysiert. Hierbei waren keine BPD-SG-Konjugate detektierbar.

4.3 Dibenzo[*a,l*]pyren (DB[*a,l*]P)

4.3.1 DBPD-SG-Bestimmung mittels LC-MS/MS

4.3.1.1 Qualitativer Nachweis von DBPD-SG

Nach Aufnahme eines Massenspektrums vom GSH-Konjugat des DBPDE (DBPD-SG) bei negativer ESI-Ionisierung (Abb. 46) zeigten sich neben dem Molekül-Ion m/z 658 [M-H]⁻ auch die charakteristischen Glutathionfragmente (m/z 272, 254, 210, 179, 143, 128) sowie ein Fragment bestehend aus dem DBPDE-Rest und dem Schwefelatom des Glutathionmoleküls (m/z 385).

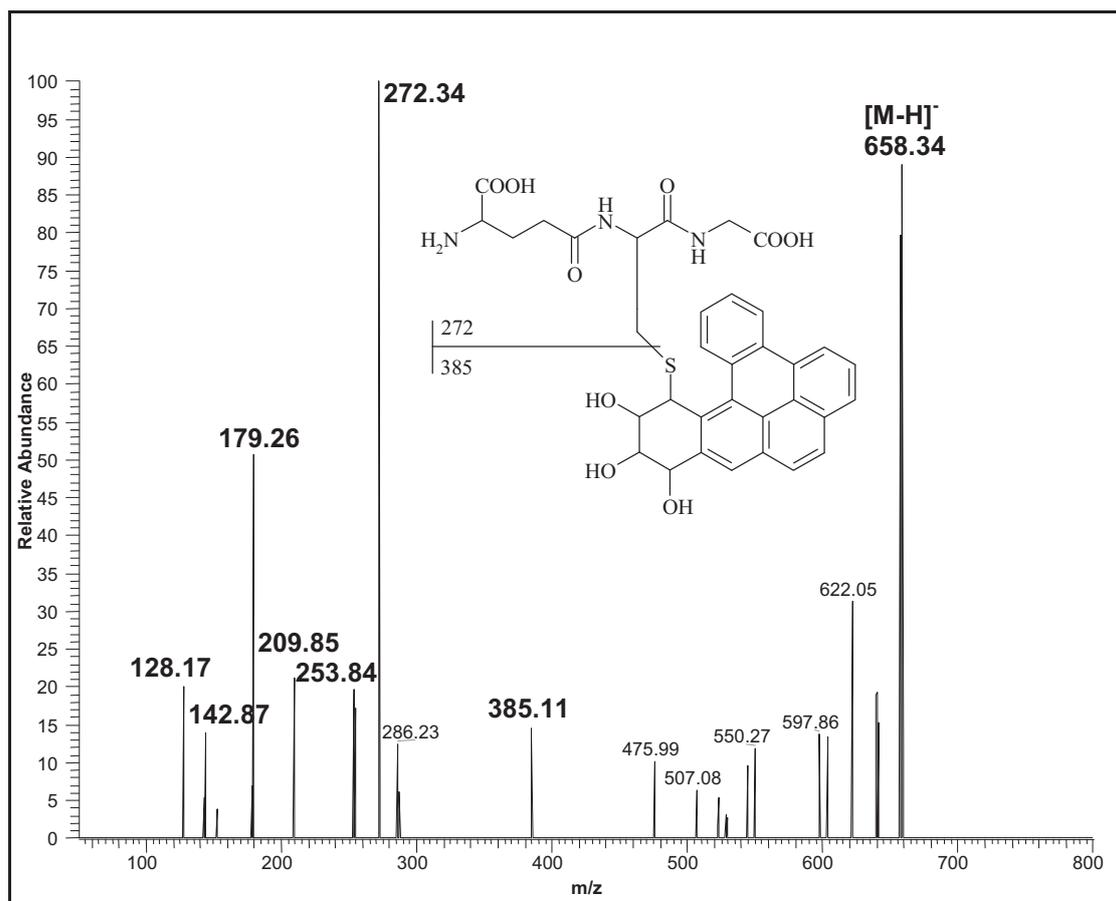


Abbildung 46: MS-Spektrum des DBPD-SG (ESI-negativ, DAU-Modus)

Mittels dieser konstant auftretenden GSH-Fragmente kann in unbekanntem Proben ein qualitativer Nachweis auf Glutathion-Konjugate durchgeführt werden.

4.3.1.2 Quantitative Bestimmung von DBPD-SG

Abbildung 47 zeigt das Chromatogramm einer DBPD-SG-Kalibrierlösung. Dieses wurde unter den optimierten Messparametern (Kapitel 3.5) aufgenommen. Die Zuordnung der DBPD-SG-Peaks wurde abgeleitet von dem selektiv aus (+)-*anti*-DBPDE synthetisierten (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG, welches zur Dotierung des DBPD-SG-Stereoisomer-Gemisches verwendet wurde.

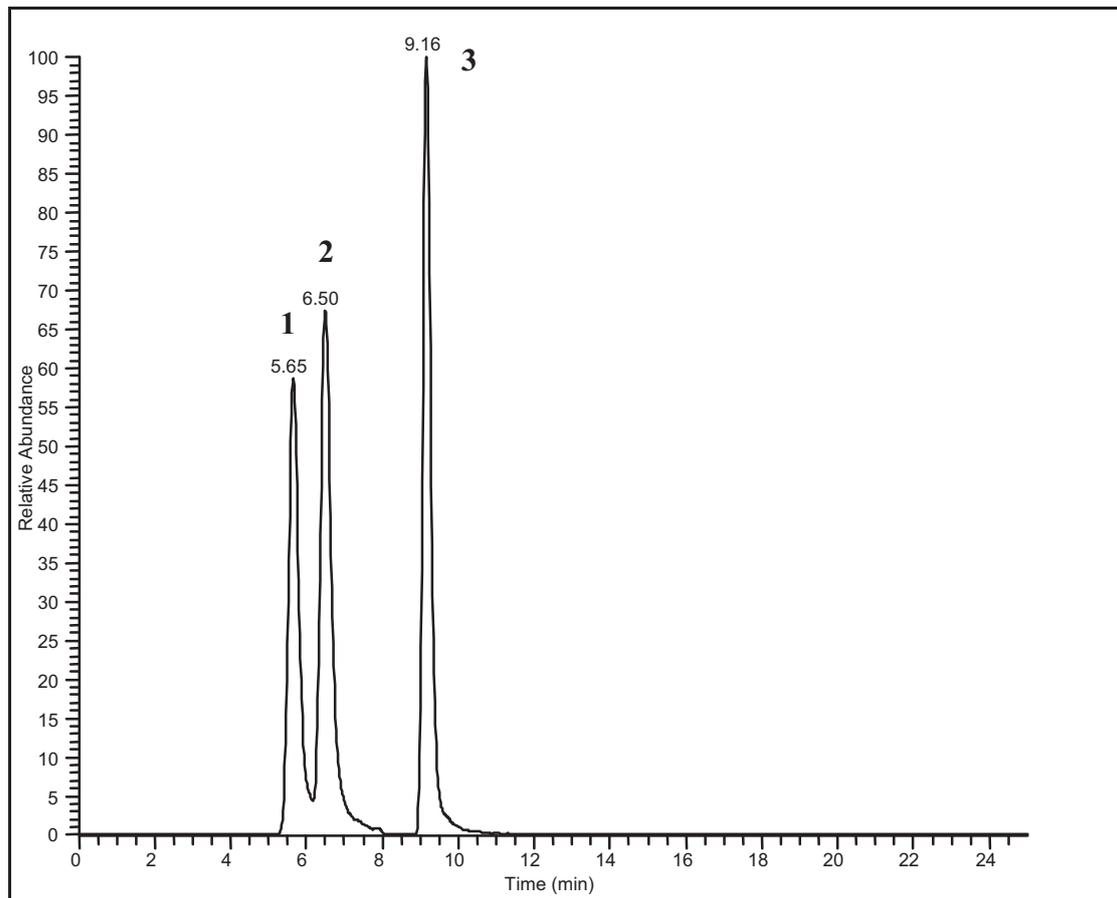


Abbildung 47: Beispielchromatogramm einer DBPD-SG-Kalibrierlösung im SRM-Modus (gesamtes Zeitfenster), Peakzuordnung: (1) (11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG, (2) (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG, (3) 1-MP-SG (Interner Standard)

Abbildung 48 (A) gibt einen Überblick über die einzelnen Chromatogramm-Zeitfenster der DBPD-SG-Kalibrierlösung, die für die Quantifizierung der beiden Analyten erforderlich sind. In Abbildung 48 (B) sind die entsprechenden Zeitfenster des Chromatogramms einer Mediumprobe aus dem TranswellTM-System (Inkubation mit 5 μ M DBPDE für 24 h, 2 ml Medium basolateral) dargestellt.

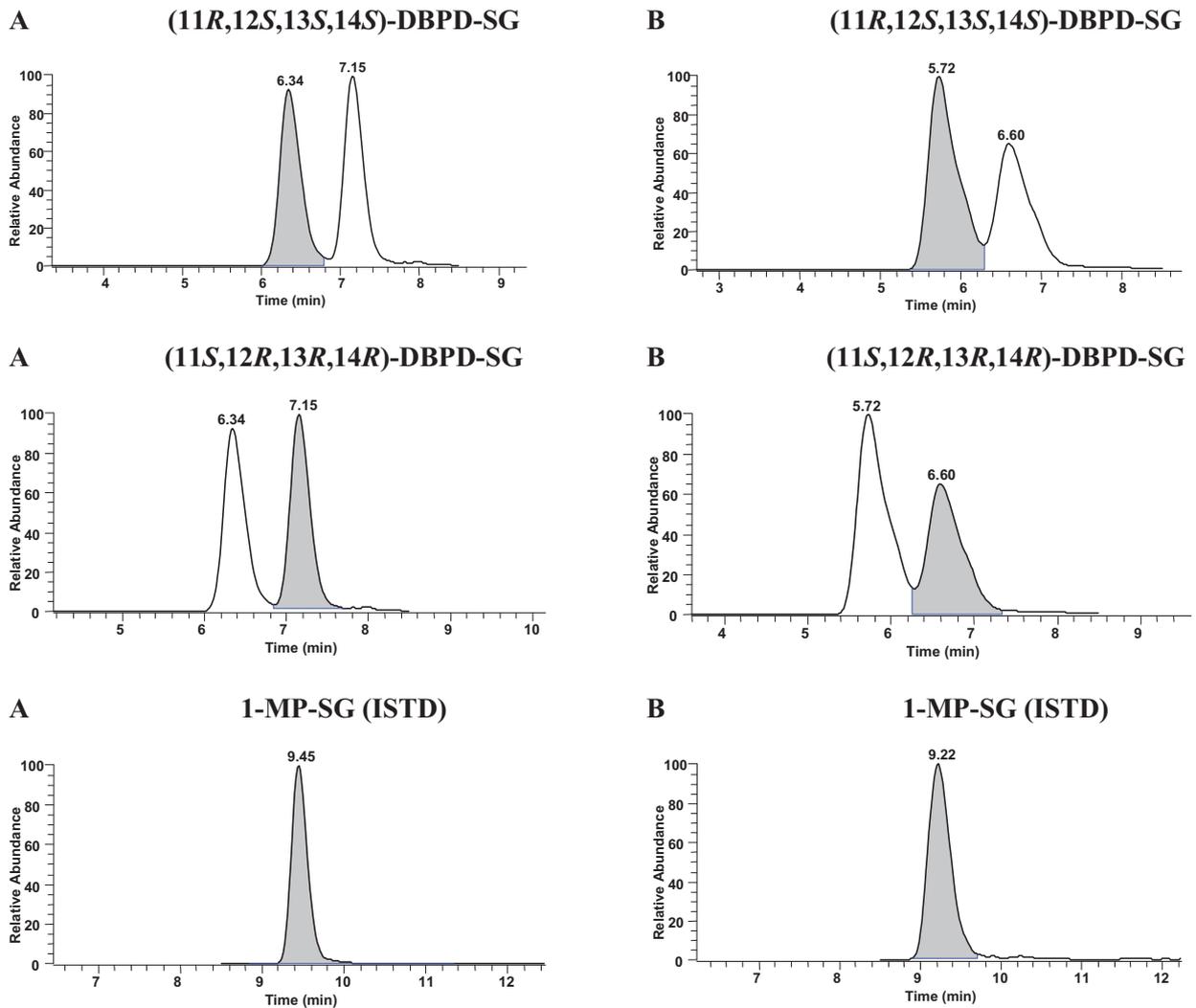


Abbildung 48: Beispielchromatogramme (A) einer DBPD-SG-Kalibrierlösung und (B) einer Mediumprobe aus dem Transwell™-System (Inkubation mit 5 μ M DBPDE für 24 h, 2 ml Medium basolateral), Ausschnitte für die Quantifizierung

4.3.1.3 DBPD-SG-Bildung aus *syn*-DBPDE

Abbildung 49 (A) zeigt die Chromatogramme einer DBPD-SG-Kalibrierlösung (1), einer mit 11,12-Diol-DB[*a,l*]P inkubierten Caco-2-Zellprobe (2) sowie einer mit DBPDE inkubierten Caco-2-Zellprobe (3). Das Chromatogramm 2 zeigt einen zusätzlichen Peak bei einer Retentionszeit von 7,65 min, der auf das Auftreten einer zusätzlichen DBPD-SG-Verbindung hindeutet. Neben den beiden DBPD-SG-Diastereomeren vom (\pm)-*anti*-DBPDE können metabolisch gleichzeitig die DBPD-SG-Diastereomere vom (\pm)-*syn*-DBPDE gebildet werden. Daher könnte es sich bei dem zusätzlich detektierten Peak um ein GSH-Konjugat vom *syn*-DBPDE handeln. Generell zeigen PAK-SG-Konjugate von *syn*-Dihydrodiolepiden im Vergleich zu ihren aus *anti*-Dihydrodiolepiden gebildeten Isomeren auf *Reversed-Phase* HPLC-Säulen ein verzögertes Elutionsverhalten (Funk 1992; Funk *et al.* 1995). Dieses Erkenntnis würde die postulierte Bildung des aus einem *syn*-DBPDE hervorgegangenen GSH-Konjugates im Chromatogramm 2 bestärken. Um dieses Postulat einer zusätzlichen DBPD-

SG-Verbindung abzusichern, erfolgte eine Messung dieser Probe im MS/MS-DAU-Modus. Das Auftreten der charakteristischen GSH-Fragmente im Massenspektrum (Abb. 49 (B)) bestätigte die oben aufgeführte Annahme. Eine endgültige Absicherung konnte jedoch aufgrund der fehlenden Referenzverbindung nicht erfolgen.

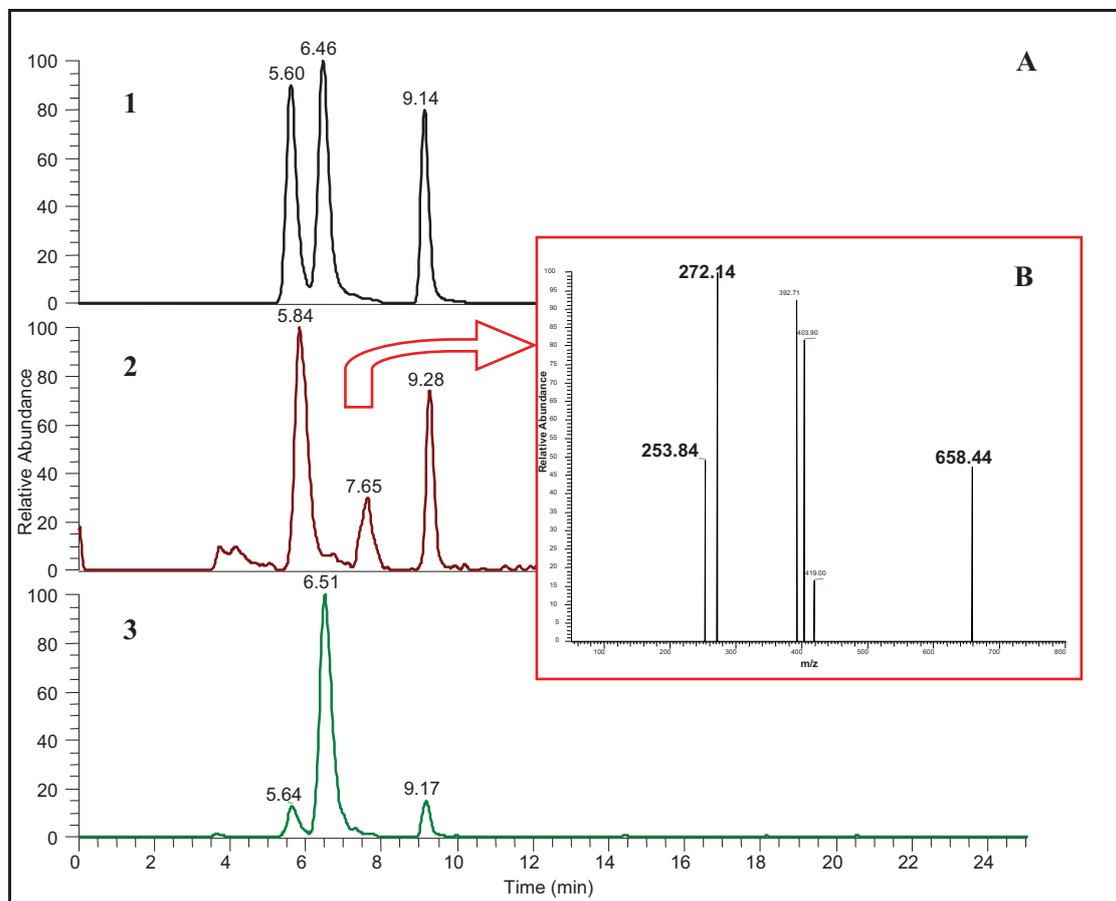


Abbildung 49: (A) Chromatogramme (1) einer DBPD-SG-Kalibrierlösung, (2) eines Mediums (Caco-2-Zellen inkubiert mit 11,12-Diol-DB[a,l]P) und (3) eines Mediums (Caco-2-Zellen inkubiert mit DBPDE) und (B) MS-Spektrum des Peaks bei 7,65 min mit den charakteristischen GSH-Fragmenten des postulierten GSH-Konjugates vom *syn*-DBPDE (DAU-Modus)

4.3.1.4 Bildung der DBPD-SG-Konjugate und Transport ins Medium

Die Analytik von Zellextrakten und Medienüberständen erfolgte an zuvor mit 11,12-Diol-DB[a,l]P oder DBPDE inkubierten Caco-2-Zellen mittels LC-MS/MS nach entwickeltem *Clean-Up*. Hierbei waren DBPD-SG-Konjugate im Zellextrakt detektierbar, wodurch die intrazelluläre Bildung dieser detoxifizierten Konjugate aus 11,12-Diol-DB[a,l]P und auch direkt aus DBPDE nachweisbar war. In den analysierten Medienproben konnten ebenso DBPD-SG-Konjugate nachgewiesen werden, so dass der Transport dieser Metaboliten aus der Zelle in das umgebende Medium belegt war.

Abbildung 50 umfasst die Analytik von Zellextrakten (A) und Mediumproben (B) von Caco-2-Zellen, die mit 11,12-Diol-DB[a,l]P (10 μ M) jeweils 24 h, 48 h oder 72 h oder mit DBPDE

(5 μM) jeweils 24 h oder 48 h behandelt worden waren. Dargestellt sind in Abbildung die $\text{MW} \pm \text{SD}$ von jeweils 3 biologischen Replikaten. Hierbei wurde die Zeitabhängigkeit der ins Medium transportierten und im Zellinneren enthaltenen GSH-Konjugate (11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG und (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG bestimmt, die aus DBPDE unter GST-Katalyse mit GSH gebildet wurden.

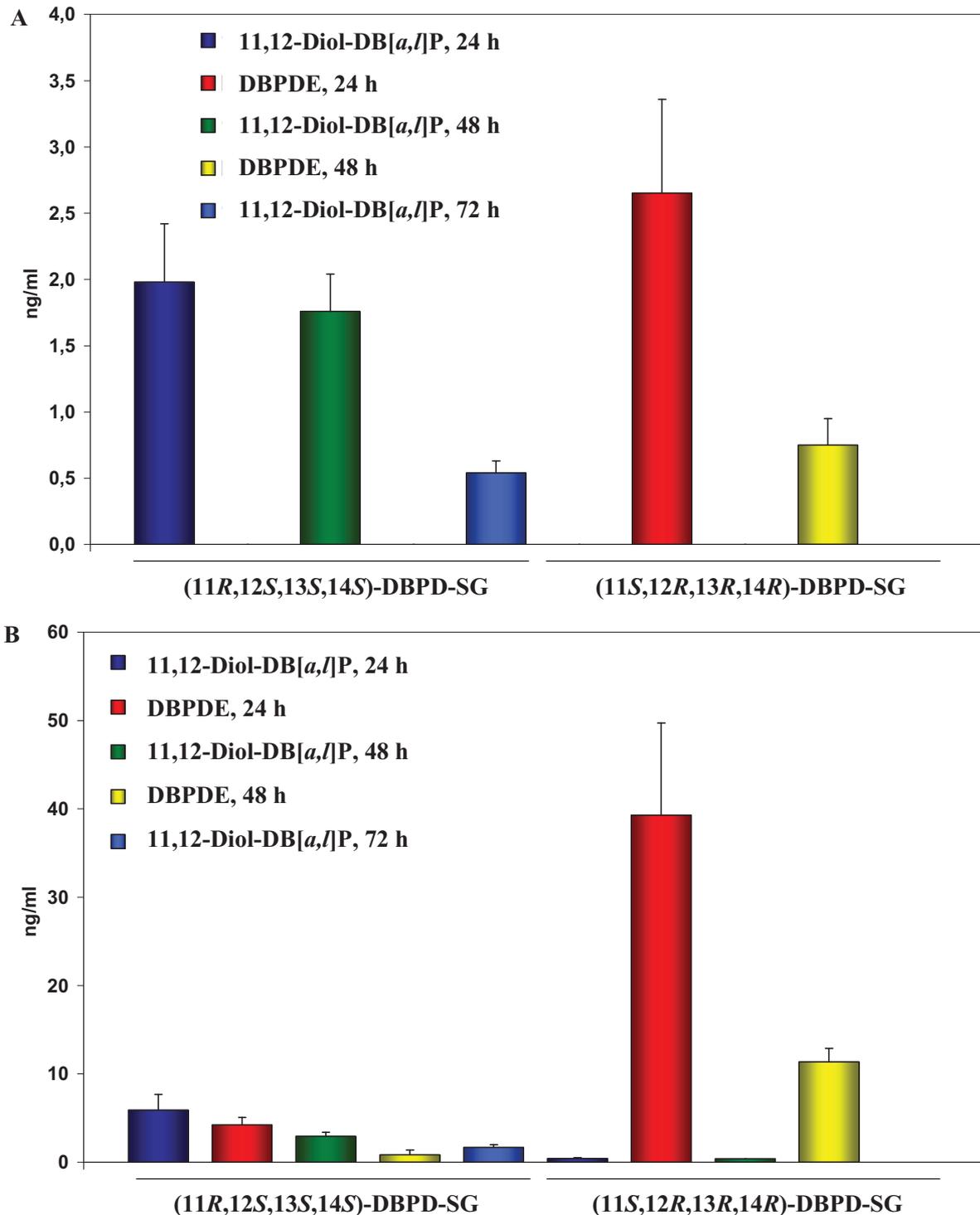


Abbildung 50: DBPD-SG-Konjugate in ng/ml (A) im Zellextrakt (intrazellulär) und (B) im Medium (extrazellulär) nach Inkubation mit 11,12-Diol-DB[a,l]P (10 μM für 24 h, 48 h oder 72 h) oder DBPDE (5 μM für 24 h oder 48 h). Dargestellt sind die $\text{MW} \pm \text{SD}$ von jeweils 3 biologischen Replikaten.

Wie Abbildung 50 verdeutlicht, gab es je nach Inkubationsagens (11,12-Diol-DB[*a,l*]P oder DBPDE) Unterschiede hinsichtlich der Bildung des jeweiligen DBPD-SG-Diastereomers. Bei Inkubation mit 11,12-Diol-DB[*a,l*]P war das (11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG das Hauptkonjugat, während sich bei Behandlung mit DBPDE das (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG als Hauptkonjugat erwies. Die Abnahme der Konjugat-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit war für beide Isomeren im Medium und im Zellextrakt deutlich bestimmbar. Im Zellextrakt war nach Inkubation mit 11,12-Diol-DB[*a,l*]P lediglich das (11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG detektierbar. Im Gegensatz hierzu führte eine DBPDE-Behandlung der Zellen ausschließlich zum Nachweis des (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG. Dass jedoch beide Konjugate – unabhängig vom Inkubationsagens – im Medium nachweisbar waren, lässt auf eine intrazelluläre Bildung beider Stereoisomeren schließen, deren beider Exkretion relativ schnell erfolgt.

So wurde nach einer Inkubationsdauer von 24 h mit 11,12-Diol-DB[*a,l*]P das (11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG in etwa 14-facher Menge ($5,91 \pm 1,75$ ng/ml) im Vergleich zum (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG ($0,42 \pm 0,09$ ng/ml) ins Medium transportiert. Ein weiteres auffälliges Resultat waren die Konzentrationsunterschiede zwischen dem (11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG und dem (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG im Medium nach Inkubation mit DBPDE. So zeigte sich nach 24 h für das (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG eine circa 10-fach höhere Exkretion ($39,3 \pm 10,40$ ng/ml) verglichen mit dem (11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG ($4,24 \pm 0,82$ ng/ml). Aufgrund der stereoselektiven intrazellulären Bildung wird wesentlich mehr (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG als (11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG ins Medium ausgeschleust.

Insgesamt stellte das (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG das prozentual am meisten gebildete und transportierte Isomer nach Inkubation mit DBPDE dar. Es wird endogen aus dem (+)-*anti*-DBPDE gebildet, welches das Enantiomer mit der geringeren Mutagenität im Vergleich zum (-)-*anti*-DBPDE repräsentiert.

Die Bildung von DBPD-SG und ihr Transport nach einer DBPDE-Inkubation ist ein verkürzter Metabolismusweg, da keine oxidative Umwandlung wie im Falle einer 11,12-Diol-DB[*a,l*]P-Behandlung notwendig ist. Folglich führten Inkubationen mit racemischem DBPDE nicht nur zu den höchsten DBPD-SG-Konzentrationen im Medium, sondern auch zu einer veränderten Stereoselektivität.

4.3.1.5 Transport der DBPD-SG-Konjugate im Transwell™-System

In einem weiteren Experiment wurden die Caco-2-Zellen im Transwell™-System mit 11,12-Diol-DB[*a,l*]P oder DBPDE inkubiert und die gebildeten Konjugate (11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG und (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG in apikalen und basolateralen Kammern bestimmt. Hierbei sollte der gerichtete DBPD-SG-Transport untersucht werden. Die Inkubationen erfolgten mit 11,12-Diol-DB[*a,l*]P (10 µM) oder mit DBPDE (5 µM) für 24 h, wobei das Inkubationsagens jeweils sowohl in die apikalen als auch in die basolateralen

Kammern gegeben wurde. Abbildung 51 zeigt die MW \pm SD von jeweils 3 biologischen Replikaten.

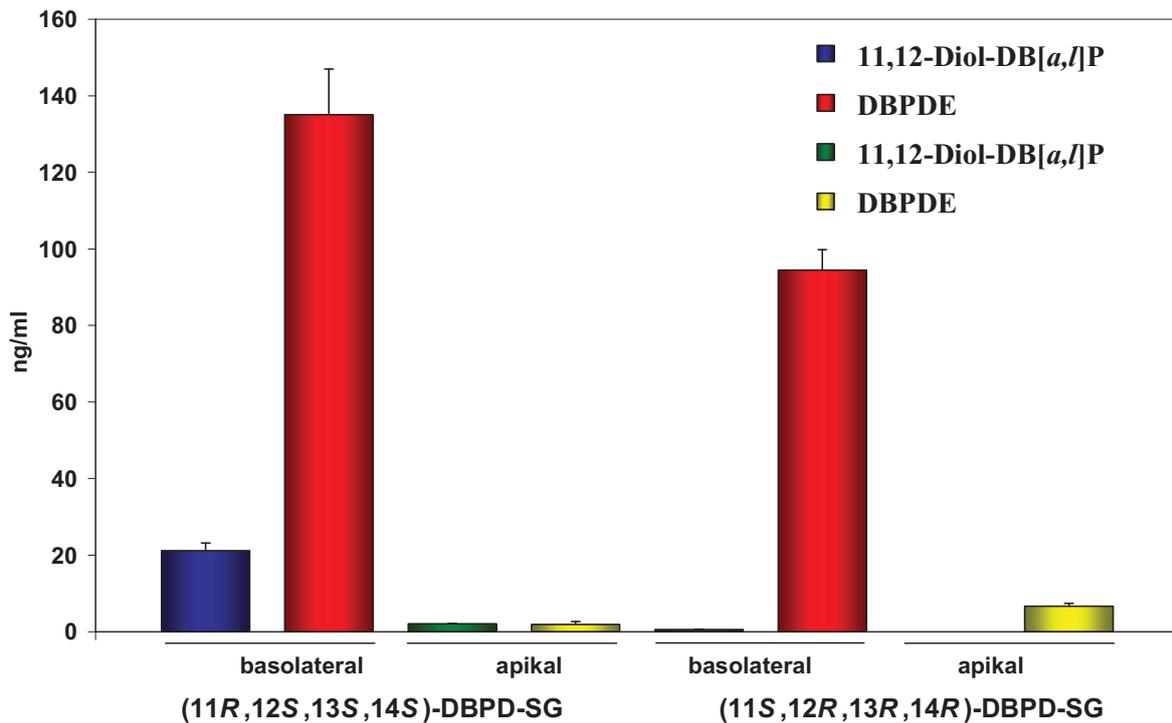


Abbildung 51: DBPD-SG-Konjugate in ng/ml nach Inkubation für 24 h mit 11,12-Diol-DB[a,l]P (10 μ M) oder DBPDE (5 μ M) im TranswellTM-System. Dargestellt sind die MW \pm SD von jeweils 3 biologischen Replikaten.

Die aus den erhaltenen Ergebnissen generierte Abbildung 51 zeigt einen stärker ausgeprägten Transport der Konjugate in basolateraler Richtung, was mit den Resultaten der BPD-SG-Konjugat-Analytik korrespondiert. Bezüglich der basolateralen Kompartimente führte eine DBPDE-Behandlung erneut zu höheren DBPD-SG-Konzentrationen als die 11,12-Diol-DB[a,l]P-Behandlung. Die Exkretion in apikaler Richtung stellte sich für beide DBPD-SG-Konjugate aufgrund der sehr niedrigen Konzentrationen als weniger relevant heraus. Das (11R,12S,13S,14S)-DBPD-SG ergab leicht höhere Konzentrationen ($135,05 \pm 11,94$ ng/ml) verglichen mit dem (11S,12R,13R,14R)-DBPD-SG mit $94,50 \pm 5,27$ ng/ml in den basolateralen Kammern.

Die ermittelte Gesamtmenge an transportierten GSH-Konjugaten im Vergleich zur eingesetzten Menge 11,12-Diol-DB[a,l]P ergab, dass die Inkubation der Caco-2-Zellen etwa 0,3 % an DBPD-SG-Konjugaten in den Medienproben hervorbrachte. Bei Inkubation mit DBPDE zeigte sich hingegen eine DBPD-SG-Konzentration von etwa 7,6 % im Medium verglichen mit der eingesetzten DBPDE-Menge.

4.3.2 Bestimmung von DB[a,l]P-Metaboliten mittels HPLC-UV

Ein HPLC-Chromatogramm der DB[a,l]P-Metaboliten-Referenzsubstanzen ist in Abbildung 52 dargestellt.

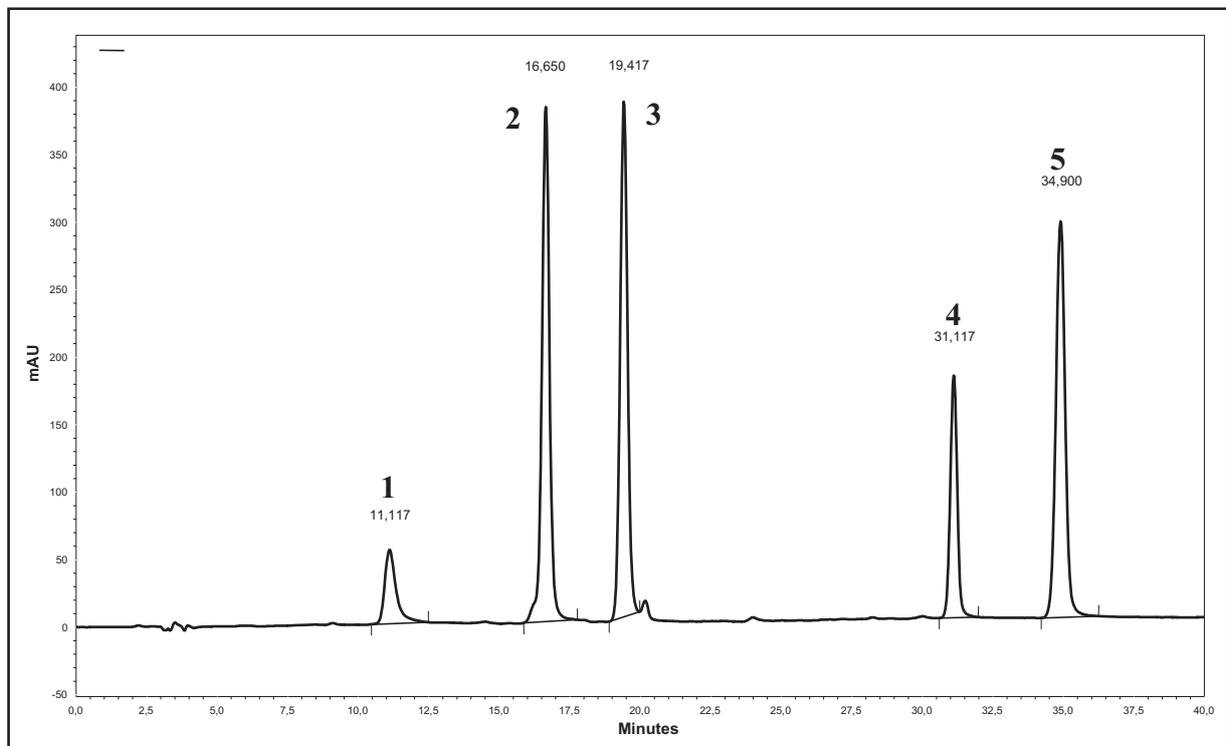


Abbildung 52: Referenz-HPLC-Chromatogramm der DB[a,l]P-Metaboliten (1: Tetrol-DB[a,l]P, 2: 8,9-Diol-DB[a,l]P, 3: 11,12-Diol-DB[a,l]P, 4: PER (IS), 5: DB[a,l]P)

Zusätzlich zu den Retentionszeiten konnten bei der Identifizierung der Peaks in den Probenchromatogrammen die UV-Spektren der DB[a,l]P-Metaboliten verwendet werden (Kapitel 10.1.4.1, Abb. 86).

Für das 7-OH-DB[a,l]P stand keine Referenzsubstanz zur Verfügung. Um dennoch eine zusätzliche Absicherung über die Identität des Peaks zu erhalten, wurden HPLC-Fractionen des zu analysierenden Peaks entnommen, vereinigt und mittels LC-MS/MS analysiert. Hierbei zeigte das bei negativer ESI-Ionisierung generierte Massenspektrum ein m/z von 317, welches mit dem $[M-H]^-$ von 7-OH-DB[a,l]P korreliert (Abb. 53).

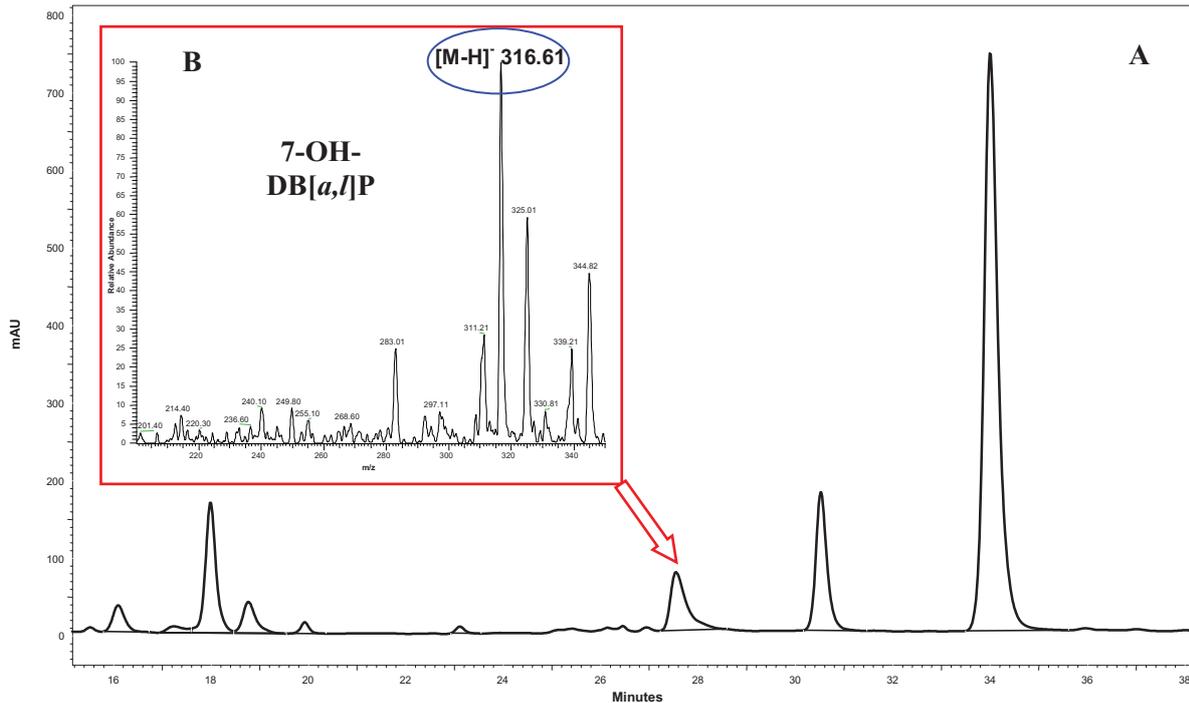


Abbildung 53: (A) HPLC-Chromatogramm einer Mediumprobe (Caco-2-Zellen inkubiert mit 10 µM DB[a,l]P für 48 h) mit markiertem 7-OH-DB[a,l]P-Peak und (B) MS-Spektrum des 7-OH-DB[a,l]P-Peaks nach Injektion vereinigerter HPLC-Fractionen in die LC-MS/MS (Scan-Modus)

4.3.2.1 Konjugationsformen der vorliegenden Metaboliten

Um die Art der Konjugate der nachweisbaren Metaboliten ermitteln zu können, wurden verschiedene Enzyme zur Spaltung der Konjugate verwendet. Hierzu erfolgten Versuchsansätze von inkubierten Caco-2-Zellen (10 µM DB[a,l]P für 48 h) mit dem kombinierten Enzymgemisch β -Glucuronidase/Arylsulfatase und den einzelnen Enzymen β -Glucuronidase und Arylsulfatase sowie ohne Zusatz eines Enzyms.

Dieses Experiment zeigte, dass im Medium das 8,9-Diol-DB[a,l]P in allen Ansätzen in etwa gleich hoher Konzentration enthalten war. Das 11,12-Diol-DB[a,l]P hingegen war im Medium bei Verwendung des kombinierten Enzyms gar nicht und in den Ansätzen mit den einzelnen Enzymen in leicht verringerter Konzentration nachweisbar im Vergleich zum Ansatz ohne enzymatische Spaltung. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die Zugabe der kombinierten Enzymlösung eine Instabilität des 11,12-Diol-DB[a,l]P verursachte, welches daraufhin nicht mehr nachweisbar war. Insgesamt zeigten diese Ergebnisse im Medium, dass das 8,9-Diol-DB[a,l]P sowie das 11,12-Diol-DB[a,l]P in unkonjugierter Form vorlagen. Beim 7-OH-DB[a,l]P ergaben sich deutliche Unterschiede in den einzelnen Ansätzen, wobei die Ansätze mit Arylsulfatase und mit der Kombination β -Glucuronidase/Arylsulfatase die höchsten Konzentrationen an 7-OH-DB[a,l]P zeigten. Daraus kann geschlossen werden, dass das 7-OH-DB[a,l]P hauptsächlich als Sulfat gebunden vorlag und nur ein geringerer Anteil zusätzlich in freier Form vorhanden war.

Im Zellextrakt war das 8,9-Diol-DB[a,l]P ebenfalls bei allen Ansätzen in ähnlicher Konzentration enthalten, was die Annahme seines nicht konjugierten Vorliegens bestätigte. Ebenso zeigte das 11,12-Diol-DB[a,l]P in sämtlichen Ansätzen ähnliche Konzentrationen. Folglich konnte auch für das 11,12-Diol-DB[a,l]P von einer unkonjugierten Form des Metaboliten ausgegangen werden. Das 7-OH-DB[a,l]P lag hauptsächlich als Sulfatester gebunden vor, was die enzymatische Spaltung mit Arylsulfatase zeigte. Bei Spaltung mit β -Glucuronidase sowie im Ansatz ohne Enzymzugabe war ebenfalls das 7-OH-DB[a,l]P bestimmbar, jedoch in geringerer Konzentration im Vergleich zur Arylsulfatase-Spaltung. Bei einer Spaltung mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase stimmte die Konzentration an 7-OH-DB[a,l]P in etwa mit der Summe aus Arylsulfatase- und β -Glucuronidase-Spaltung überein. Diese Ergebnisse zeigen, dass das 7-OH-DB[a,l]P sowohl in freier Form als auch als Sulfatester vorliegt, so dass hauptsächlich der Sulfatester aus der Zelle ins Medium transportiert wird.

4.3.2.2 Bildung der DB[a,l]P-Metaboliten

Ausdifferenzierte Caco-2-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 10 μ M und 20 μ M DB[a,l]P für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert und die Zellextrakte mittels HPLC-UV nach entsprechendem *Clean-Up* analysiert. Abbildung 54 umfasst die MW von jeweils 3 biologischen Replikaten der analysierten Metaboliten 8,9-Diol-DB[a,l]P, 11,12-Diol-DB[a,l]P und 7-OH-DB[a,l]P.

Nach Inkubation der Caco-2-Zellen mit dem stark kanzerogenen DB[a,l]P wurde die Zeitabhängigkeit der Metabolitenkonzentrationen bestimmt. CYP1A1- und CYP1B1-vermittelte Oxidationen und anschließende Hydrolyse durch die mEH generieren die Dihydrodirole, während eine nichtenzymatische Isomerisierung zu den Phenolen führt. Diese können im Anschluss zu Glucuroniden oder Sulfaten konjugiert werden. So konnte im Kapitel 4.3.2.1 die Bildung eines Sulfatkonjugates des 7-OH-DB[a,l]P postuliert werden. Die Bildung des Tetrols resultiert aus einer erneuten CYP-vermittelten Oxidation des 11,12-Diol-DB[a,l]P zum DBPDE und folgender spontaner Hydrolyse.

Abbildung 54 zeigt die Bildung der Metaboliten 8,9-Diol-DB[a,l]P, 11,12-Diol-DB[a,l]P und 7-OH-DB[a,l]P. Das 11,12-Diol-DB[a,l]P hatte die höchsten Konzentrationen aller Metaboliten mit einem Maximum bei 48 h für Inkubationen mit 10 μ M DB[a,l]P und noch steigenden Konzentrationen zwischen 48 h und 72 h bei Verwendung von 20 μ M DB[a,l]P. Hinsichtlich des 7-OH-DB[a,l]P waren ähnliche Kurven wie für 11,12-Diol-DB[a,l]P bestimmbar, abgesehen von den insgesamt geringeren Konzentrationen. Analoge Resultate ergab das 8,9-Diol-DB[a,l]P, jedoch mit noch weiter reduzierten Konzentrationen als beim 11,12-Diol-DB[a,l]P und 7-OH-DB[a,l]P. Der Metabolit 11,12,13,14-Tetrol-DB[a,l]P konnte nicht nachgewiesen werden.

Wird die Gesamtmenge der detektierten Metaboliten auf die zugesetzte Menge DB[a,l]P zu Beginn der Inkubation bezogen, so konnten nach 24 h etwa 8 %, nach 48 h etwa 14 % und nach 72 h etwa 13 % Metabolisierungsprodukte intrazellulär nachgewiesen werden.

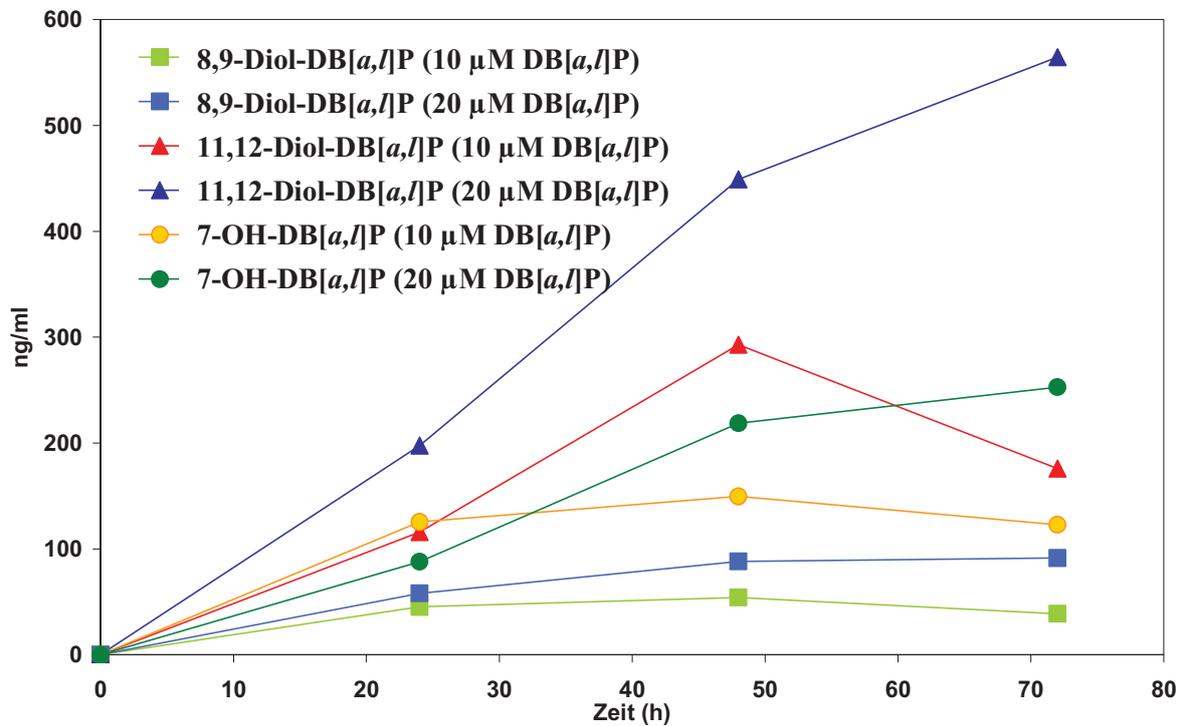


Abbildung 54: Bildung der DB[a,l]P-Metaboliten 8,9-Diol-DB[a,l]P, 11,12-Diol-DB[a,l]P und 7-OH-DB[a,l]P in ng/ml im Zellextrakt nach Inkubation der Caco-2-Zellen mit DB[a,l]P (10 µM oder 20 µM) für 24 h, 48 h oder 72 h. Gezeigt sind die MW von jeweils 3 biologischen Replikaten.

4.3.2.3 Induktion des Transportes der DB[a,l]P-Metaboliten im TranswellTM-System

In einem weiteren Experiment wurden Caco-2-Zellen im TranswellTM-System für 48 h mit den Substanzen Oltipraz (50 µM), Quercetin (50 µM), Butyrat (5 mM) oder B[κ]F (5 µM) vorinkubiert und anschließend mit 10 µM DB[a,l]P für 18 h behandelt. Als Kontrolle dienten mit 0,1 % DMSO vorbehandelte Zellen. Medienproben aus apikalen und basolateralen Kammern wurden mittels HPLC-UV nach optimiertem *Clean-Up* analysiert. Abbildung 55 zeigt die MW ± SD von jeweils 3 biologischen Replikaten.

Der Einfluss der Induktoren auf das metabolische Muster von DB[a,l]P ist in Abbildung 55 veranschaulicht, wobei sämtliche verwendeten Substanzen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Beeinflussung der Metabolitenkonzentrationen zeigten. So verursachte Oltipraz einen signifikanten Anstieg von 8,9- und 11,12-Diol-DB[a,l]P und von 7-OH-DB[a,l]P in den apikalen Kompartimenten. In den basolateralen Kammern konnten außerdem 8,9- und 11,12-Diol-DB[a,l]P im Gegensatz zum Kontrollversuch signifikant nachgewiesen werden.

Quercetin und Butyrat zeigten ähnliche Auswirkungen auf die Bildung und den Transport der Metaboliten: 7-OH-DB[a,l]P war in den apikalen Kammern stärker vertreten als im entsprechenden Kontrollversuch, während 8,9- und 11,12-Diol-DB[a,l]P ähnliche Konzentrationen wie die Kontrolle aufwiesen. Des Weiteren induzierten Quercetin und

Butyrat zusätzlich signifikant das Auftreten von 11,12-Diol-DB[*a,l*]P in den basolateralen Kammern, während im Kontrollversuch basolateral keine Metaboliten nachweisbar waren. B[*k*]F erwies sich als effektivster Induktor: In den apikalen Kompartimenten waren 8,9- und 11,12-Diol-DB[*a,l*]P in etwa 3-fach höheren Konzentrationen enthalten als bei der Kontrolle. Das 7-OH-DB[*a,l*]P zeigte apikal sogar mehr als 10-fach erhöhte Werte verglichen mit dem Kontrollansatz. Zusätzlich war auch bei der B[*k*]F-Behandlung das 11,12-Diol-DB[*a,l*]P in den basolateralen Kammern signifikant bestimmbar.

Zusammenfassend ergab dieses Experiment, dass der hauptsächliche Metabolisierungsweg im apikal gerichteten Transport bestand und dass das 7-OH-DB[*a,l*]P, welches als einziger Metabolit in Form eines Sulfatesters konjugiert vorlag, ausschließlich in die apikalen Kompartimente transportiert wurde.

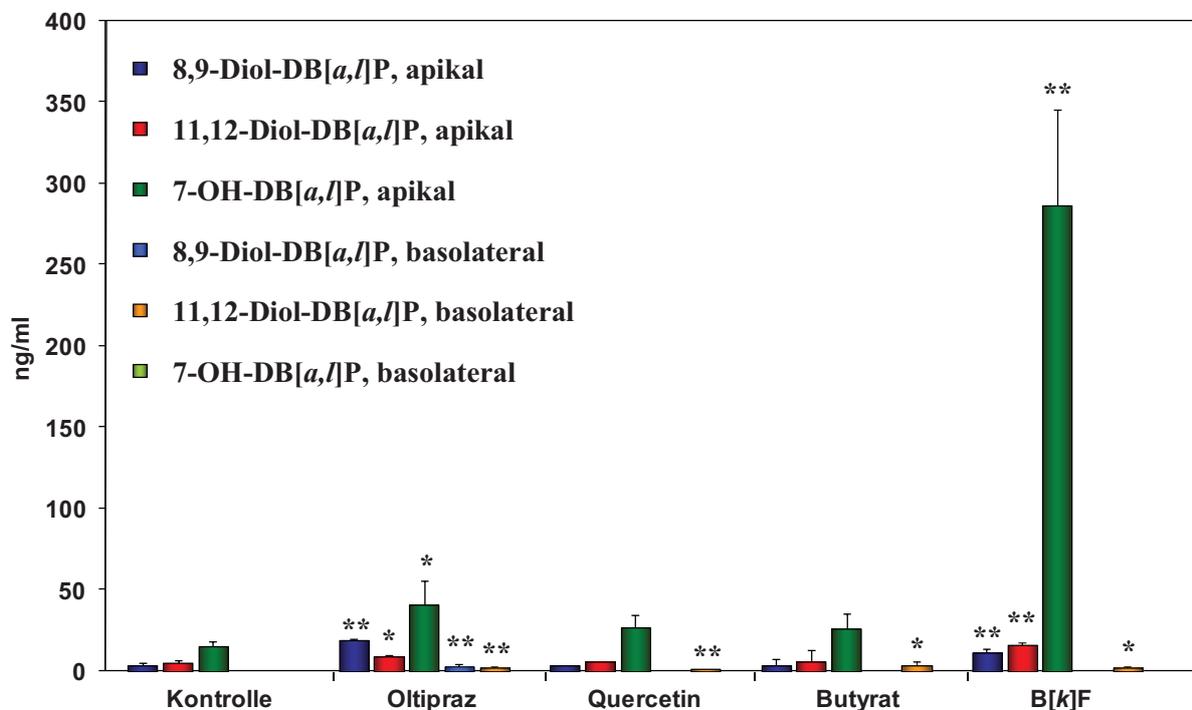


Abbildung 55: DB[*a,l*]P-Metaboliten in ng/ml nach Induktion der Caco-2-Zellen für 48 h mit Oltipraz (50 μ M), Quercetin (50 μ M), Butyrat (5 mM), B[*k*]F (5 μ M) oder 0,1 % DMSO (Kontrolle) und anschließender Inkubation mit DB[*a,l*]P (10 μ M) für 18 h im TranswellTM-System. Dargestellt sind die MW \pm SD von jeweils 3 biologischen Replikaten. * < p 0,05; ** < p 0,01 (Student's T-Test gegen die jeweilige Kontrolle)

4.3.2.4 Inhibition des Transportes der DB[*a,l*]P-Metaboliten im TranswellTM-System

Als inhibierende Substanzen dienen der BCRP-spezifische Inhibitor Ko143 (5 μ M) sowie der MRP-Inhibitor MK571 (50 μ M). Mit diesen Stoffen wurden die Caco-2-Zellen für 1 h vorbehandelt und anschließend zusammen mit 10 μ M DB[*a,l*]P für 48 h ko-inkubiert. Die Kontrollansätze wurden zuvor mit 0,1 % DMSO vorinkubiert. Die Analyse von Medienüberständen der apikalen und basolateralen Kompartimente erfolgte mittels HPLC-UV

nach entsprechendem *Clean-Up*. Abbildung 56 zeigt die $MW \pm SD$ von jeweils 3 biologischen Replikaten.

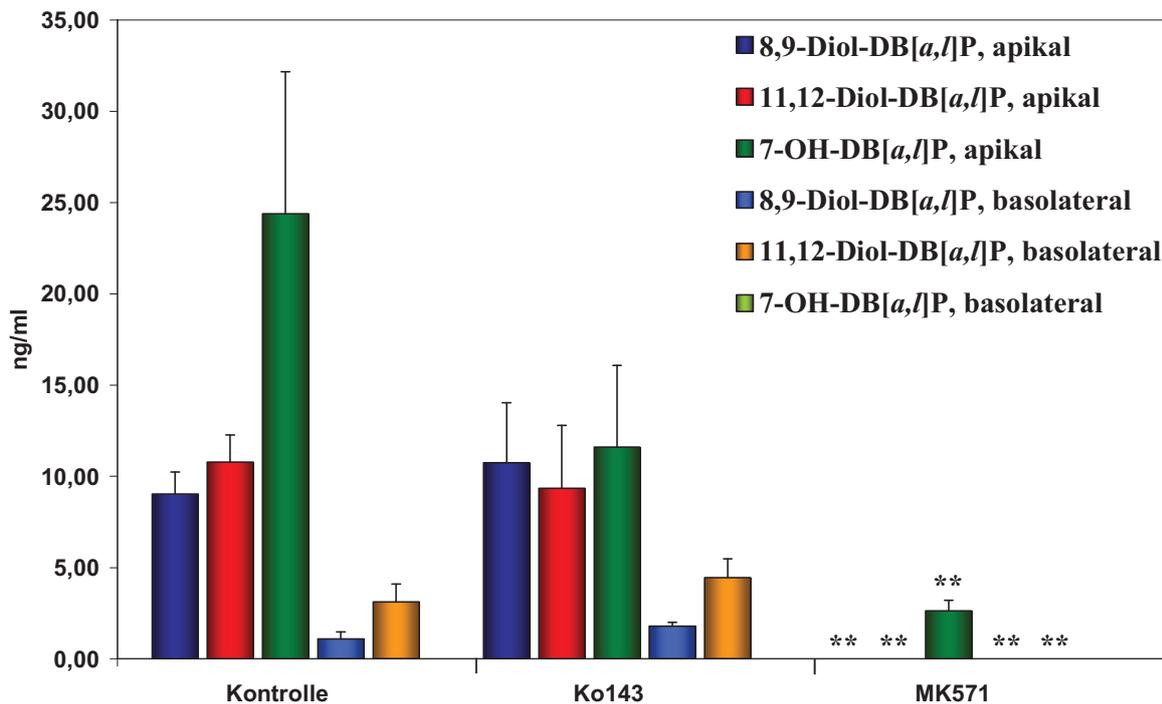


Abbildung 56: DB[a,l]P-Metaboliten in ng/ml nach Vorinkubation der Caco-2-Zellen für 1 h mit Ko143 (5 µM), MK571 (50 µM) oder 0,1 % DMSO (Kontrolle) und anschließender Behandlung mit DB[a,l]P (10 µM) für 48 h im Transwell™-System. Gezeigt sind die $MW \pm SD$ von jeweils 3 biologischen Replikaten. * < p 0,05; ** < p 0,01 (Student's T-Test gegen die jeweilige Kontrolle)

Mit diesem Experiment sollte überprüft werden, ob die Metaboliten 8,9-Diol- und 11,12-Diol-DB[a,l]P sowie 7-OH-DB[a,l]P beziehungsweise DB[a,l]P-7-sulfat jeweils Substrate des BCRP-Transporters sein könnten. Abbildung 56 verdeutlicht, dass der BCRP-spezifische Inhibitor Ko143 Auswirkungen auf den Transport des DB[a,l]P-7-sulfates hat, da die Metabolitenkonzentration verglichen mit der Kontrollinkubation erniedrigt war. Keinen Effekt hatte Ko143 jedoch bezüglich des Transportes von 8,9-Diol- und 11,12-Diol-DB[a,l]P ins Medium. Mit MK571 vorbehandelte Inkubationsansätze wiesen hingegen eine signifikante Reduzierung oder sogar die komplette Inhibierung des Transportes in die apikalen und basolateralen Kompartimente aller analysierten Metaboliten auf. Nur der Peak des 7-OH-DB[a,l]P konnte nach MK571-Behandlung noch nachgewiesen werden.

4.3.2.5 Qualitativer Nachweis von DBPD-SG-Konjugaten

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Analyten wurden einzelne Caco-2-Zellproben auf die Bildung von GSH-Konjugaten untersucht. Abbildung 57 (A) zeigt das Chromatogramm (ESI-negativ, SRM-Modus) einer zuvor mit DB[a,l]P inkubierten Probe. Diese weist bei einer Retentionszeit von 7,44 min einen DBPD-SG-spezifischen Peak auf. Zusätzlich erfolgte eine

Analyse im DAU-Modus, um durch die Bestimmung der GSH-spezifischen Fragmente eine weitere Absicherung auf das Vorhandensein eines GSH-Konjugates zu erhalten (Abb. 57 (B)). Hierbei ließen sich die Fragmente m/z 272, 254, 210, 179 und 128 und folglich die Bildung eines DBPD-SG-Konjugates nachweisen. Da diese Substanz später als die DBPD-SG-Konjugate vom (\pm)-*anti*-DBPDE eluierte (Kapitel 4.3.1.2), ist die Annahme gerechtfertigt, dass es sich bei dieser Verbindung um ein DBPD-SG-Konjugat des *syn*-DBPDE handeln könnte. Zur genauen Zuordnung sind jedoch die DBPD-SG-Referenzverbindungen vom *syn*-DBPDE erforderlich.

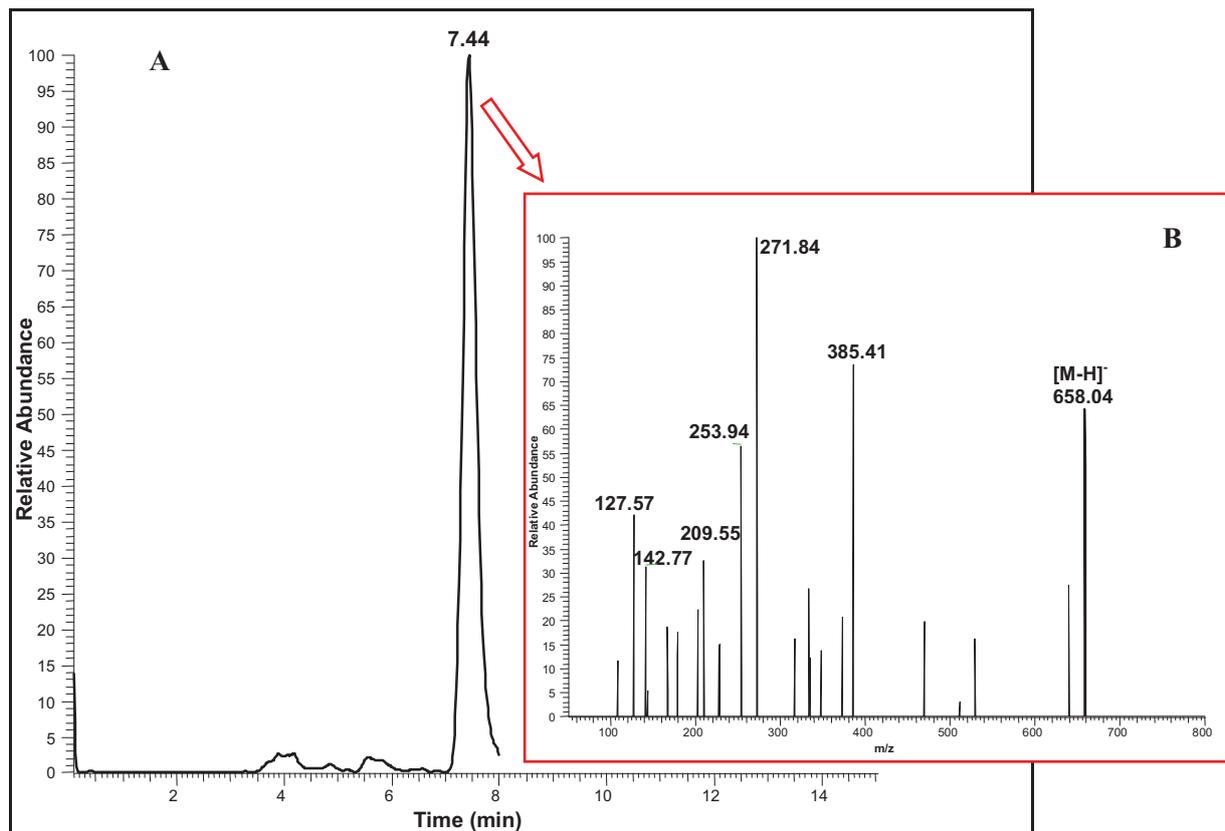


Abbildung 57: (A) Chromatogramm einer Mediumprobe (Caco-2-Zellen inkubiert mit 10 μ M DB[a,l]P für 48 h, ESI-negativ, SRM-Modus) und (B) MS-Spektrum des Peaks bei 7,44 min (ESI-negativ, DAU-Modus)

4.4 Benzo[c]phenanthren (B[c]Phe)

4.4.1 BcPheD-SG-Bestimmung mittels LC-MS/MS

4.4.1.1 Qualitativer Nachweis von BcPheD-SG

Das Massenspektrum des GSH-Konjugates vom BcPheDE (BcPheD-SG) zeigte bei negativer ESI-Ionisierung (Abb. 58) neben dem Molekül-Ion m/z 584 $[M-H]^-$ ebenfalls die charakteristischen Glutathionfragmente m/z 272, 254, 210, 179, 143, 128. Darüber hinaus

konnte ein Fragment detektiert werden, welches aus dem BcPheDE-Rest und dem Schwefelatom des Glutathions entsteht (m/z 311).

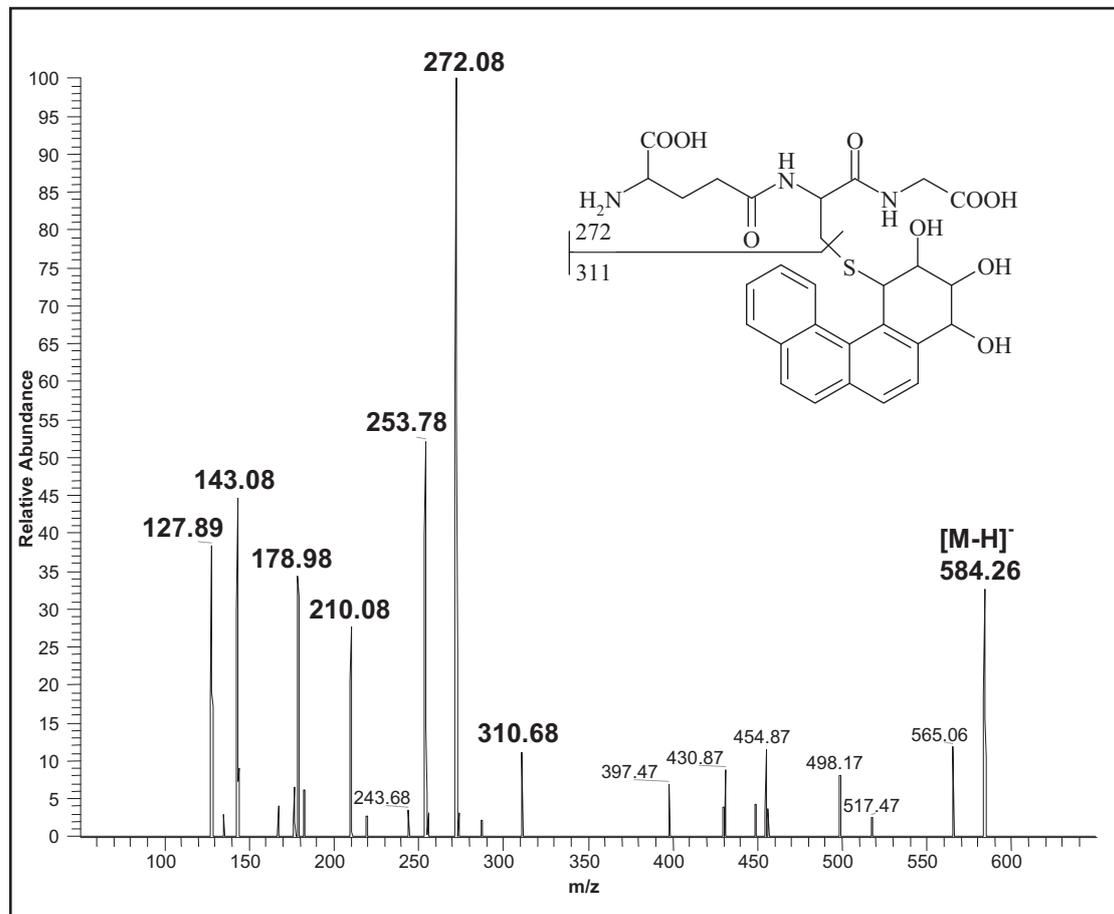


Abbildung 58: MS-Spektrum des BcPheD-SG (ESI-negativ, DAU-Modus)

BcPheD-SG wies jedoch bei positiver Ionisierung eine etwa 20-fach höhere Empfindlichkeit auf als bei negativer Ionisierung. Daher wurde bei der quantitativen Bestimmung von BcPheD-SG-Konjugaten, anders als beim BPD-SG und DBPD-SG, die positive ESI-Ionisierung gewählt. Unter diesen Bedingungen ergab sich das in Abbildung 61 aufgeführte Massenspektrum für das BcPheD-SG, während Abbildung 59 das Massenspektrum für reines Glutathion bei positiver ESI-Ionisierung zeigt. Bei der GSH-Konjugat-Analyse mittels LC-MS/MS im positiven Ionisierungsmodus ist die Art der Bindung des Glutathions an den Fremdstoff von großer Bedeutung. So weisen aliphatische, benzyliche und aromatische Thioether jeweils andere Fragmentmuster auf und auch Thioester-basierte GSH-Konjugate zeigen wiederum ein anderes Fragmentierungsschema (Baillie und Davis 1993). Bei negativer Ionisierung treten unabhängig vom GSH-Konjugat stets identische Fragmente nach Kollision der Konjugate mit Argon auf. Der Einsatz der positiven Ionisierung führt je nach Konjugat zu unterschiedlichen Fragmenten. Im positiven Ionisierungsmodus kann folglich kein für alle GSH-Konjugate anwendbares Screening anhand eines charakteristischen GSH-Fragments erfolgen, so wie dies bei negativer Ionisierung zum Beispiel mit Hilfe des Fragments m/z 272 möglich ist.

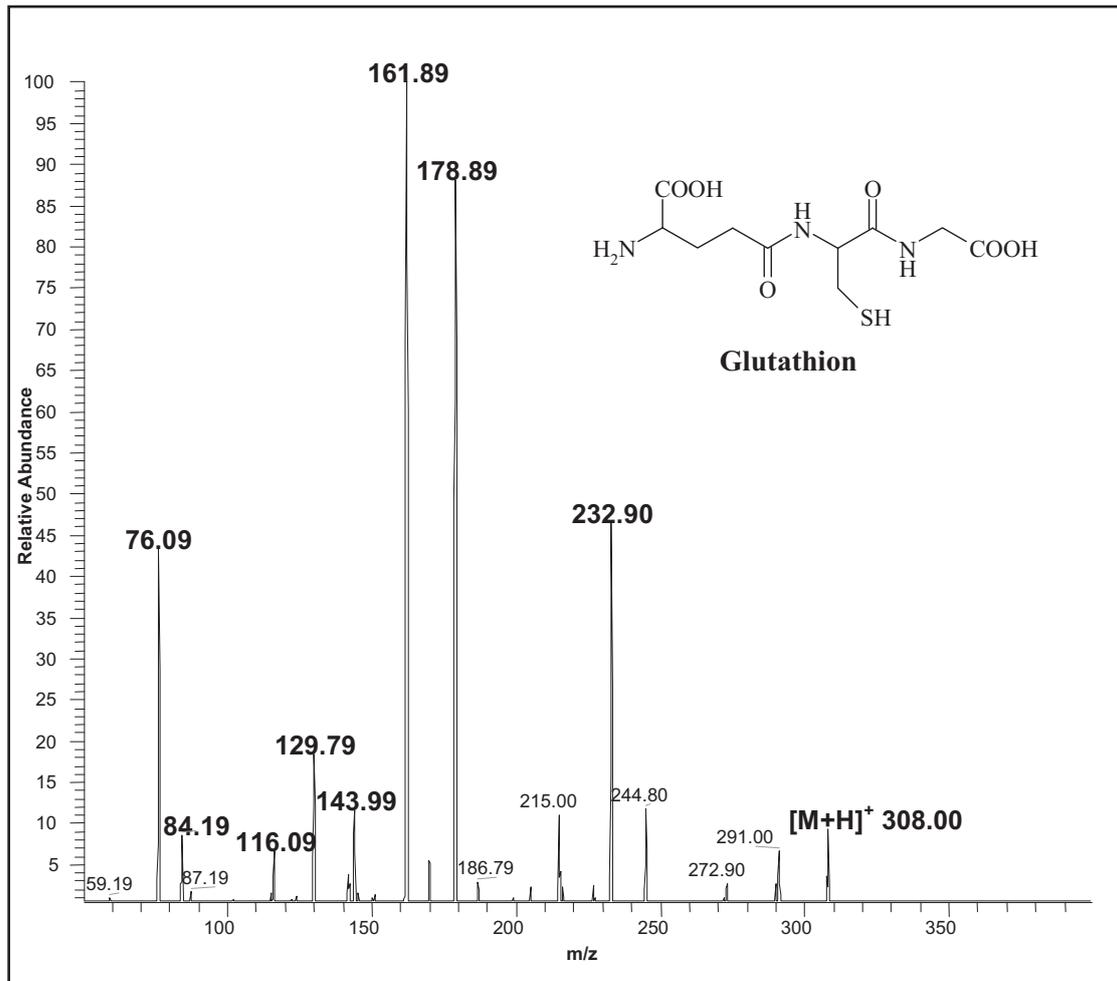


Abbildung 59: MS-Spektrum des L-Glutathions (ESI-positiv, DAU-Modus)

Die im Massenspektrum der Abbildung 59 dargestellten m/z 233, 179, 162, 130, 84 und 76 wurden bei Dieckhaus *et al.* (2005) und Baillie und Davis (1993) für reines Glutathion als kennzeichnende Fragmente im positiven ESI-Ionisierungsmodus aufgeführt. Das m/z 308 repräsentiert das Molekül-Ion vom Glutathion, welches durch Fragmentierung auch aus GSH-Konjugaten in Form des GSH₂⁺-*Daughter*-Ions gebildet werden kann. Bei Perez *et al.* (2007) wurden die bei positiver ESI-Messung GSH-Konjugat-charakteristischen Fragmente m/z 76 für Glycin sowie m/z 130 für Glutaminsäure beschrieben. Aufgrund von Differenzen beim Fragmentierungsverhalten von strukturell unterschiedlichen GSH-Konjugaten kann jedoch keines der aufgeführten Fragmente für eine allgemein anwendbare Nachweis-Methode eingesetzt werden. Das Auftreten von Fragmenten muss je nach Spezifität des GSH-Konjugates analysiert werden. In Abbildung 60 sind die Strukturformeln der GSH-Konjugat-relevanten Fragmente dargestellt, die im positiven ESI-Modus gebildet werden können.

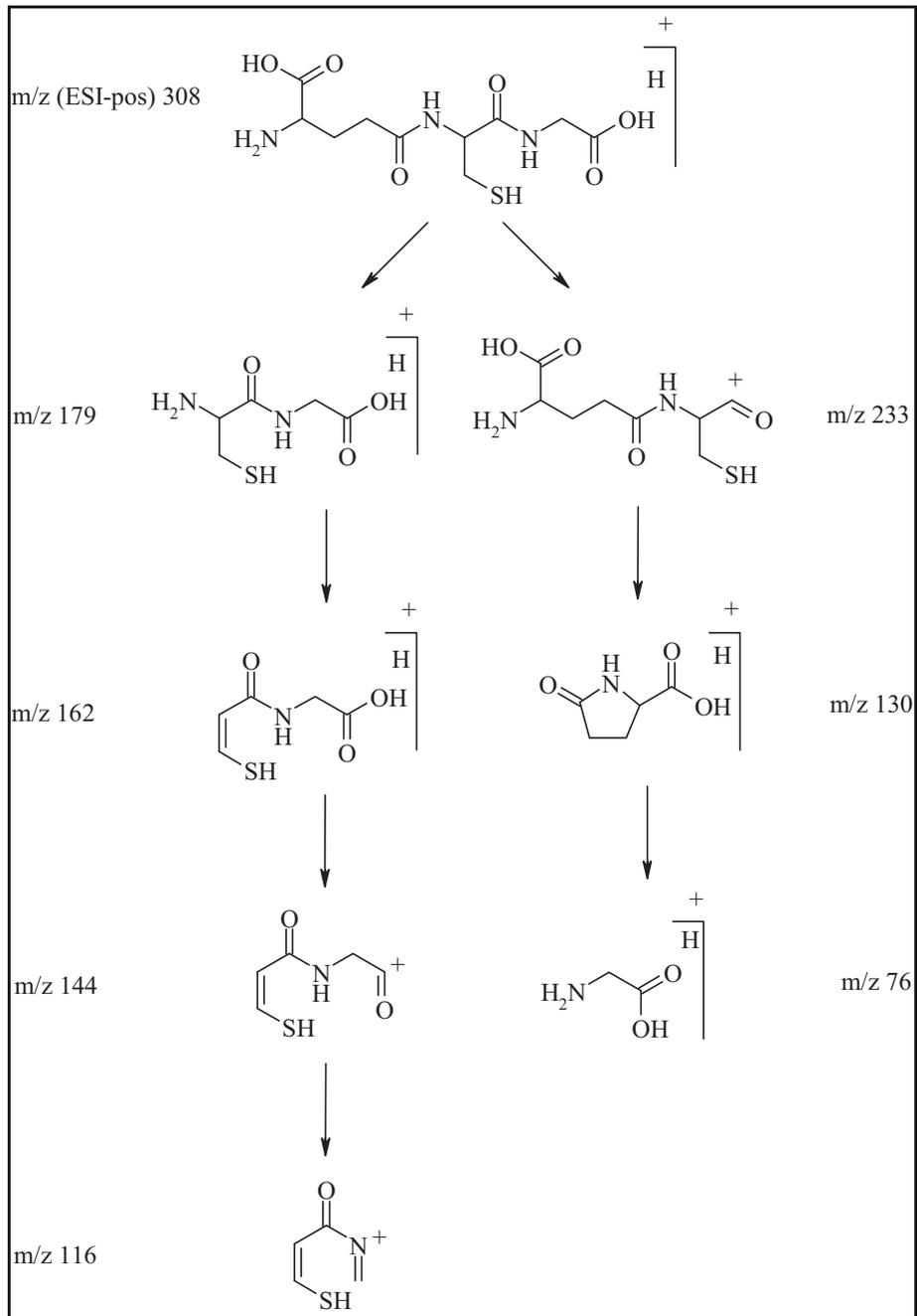


Abbildung 60: Fragmentierungsschema von Glutathion im positiven ESI-Ionisierungsmodus, verändert nach Cui *et al.* (2005)

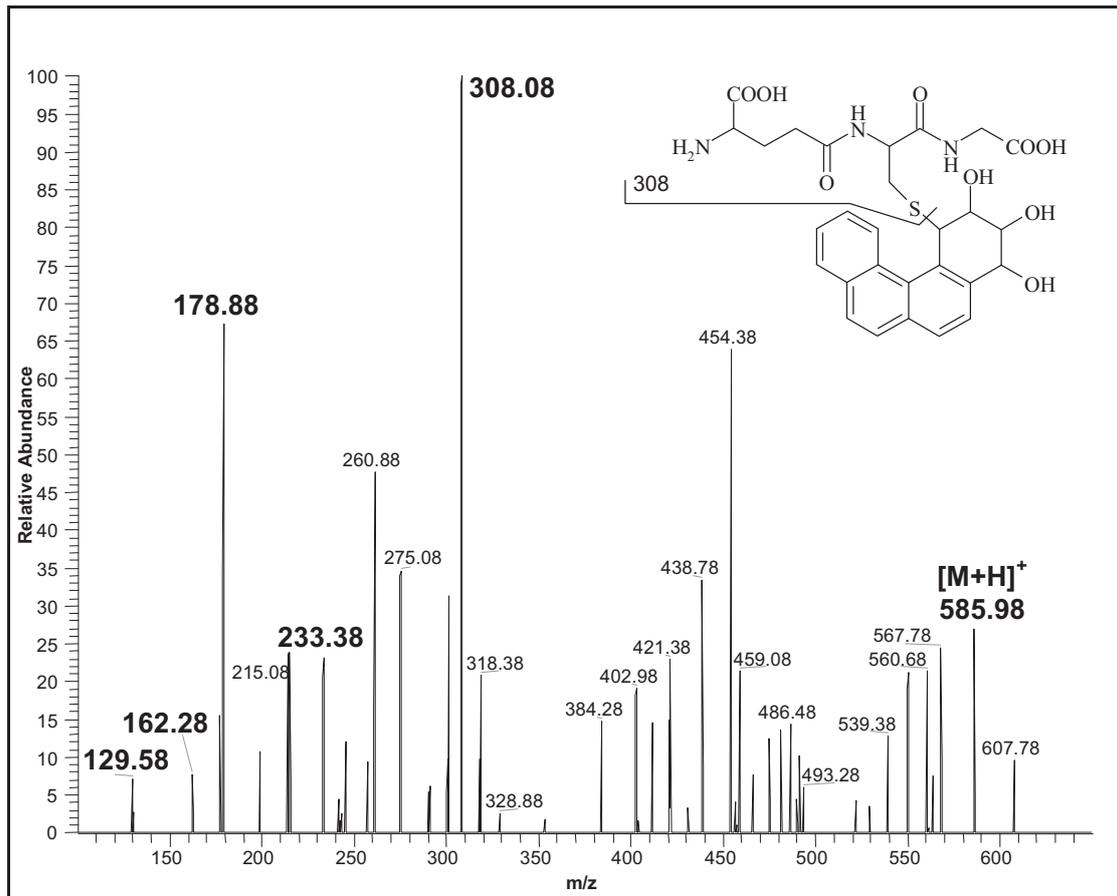


Abbildung 61: MS-Spektrum des BcPheD-SG einer Mediumprobe (ESI-positiv, DAU-Modus, m/z 586 → 100-700)

Wie bei Dieckhaus *et al.* (2005), Mahajan und Evans (2008) und Wen *et al.* (2008) beschrieben, zeigte sich auch in den Experimenten mit BPD-SG, DBPD-SG und BcPheD-SG, dass im negativen Ionisierungsmodus durch Kollision mit Argon das Fragment m/z 272 reproduzierbar gebildet wird. Es kann als Screening-Fragment bei der Suche nach GSH-Konjugaten unbekannter Analyten zum Einsatz kommen. Die positive Ionisierung im MS/MS-Parent-Modus kann hingegen zur Aufklärung von unbekannt Strukturen genutzt werden, sobald ein GSH-Konjugat als solches erkannt wurde. Die Anwendbarkeit dieser Methode verdeutlicht Abbildung 62, welche das Massenspektrum des BcPheD-SG im PAR-Modus darstellt. Die Applikation der PAR-Scan-Technik ermittelt dabei solche $[M+H]^+$ -Ionen, die beim Fragmentierungsprozess protoniertes GSH (m/z 308) hervorbringen. Hierbei wurde im Q1 die Parent-Masse m/z 586 bei Auswahl des Fragments m/z 308 als *Daughter-Ion* für Q3 detektiert. Zur quantitativen Bestimmung bekannter GSH-Konjugate ist jedoch aufgrund der höheren Sensitivität der SRM-Modus am besten geeignet.

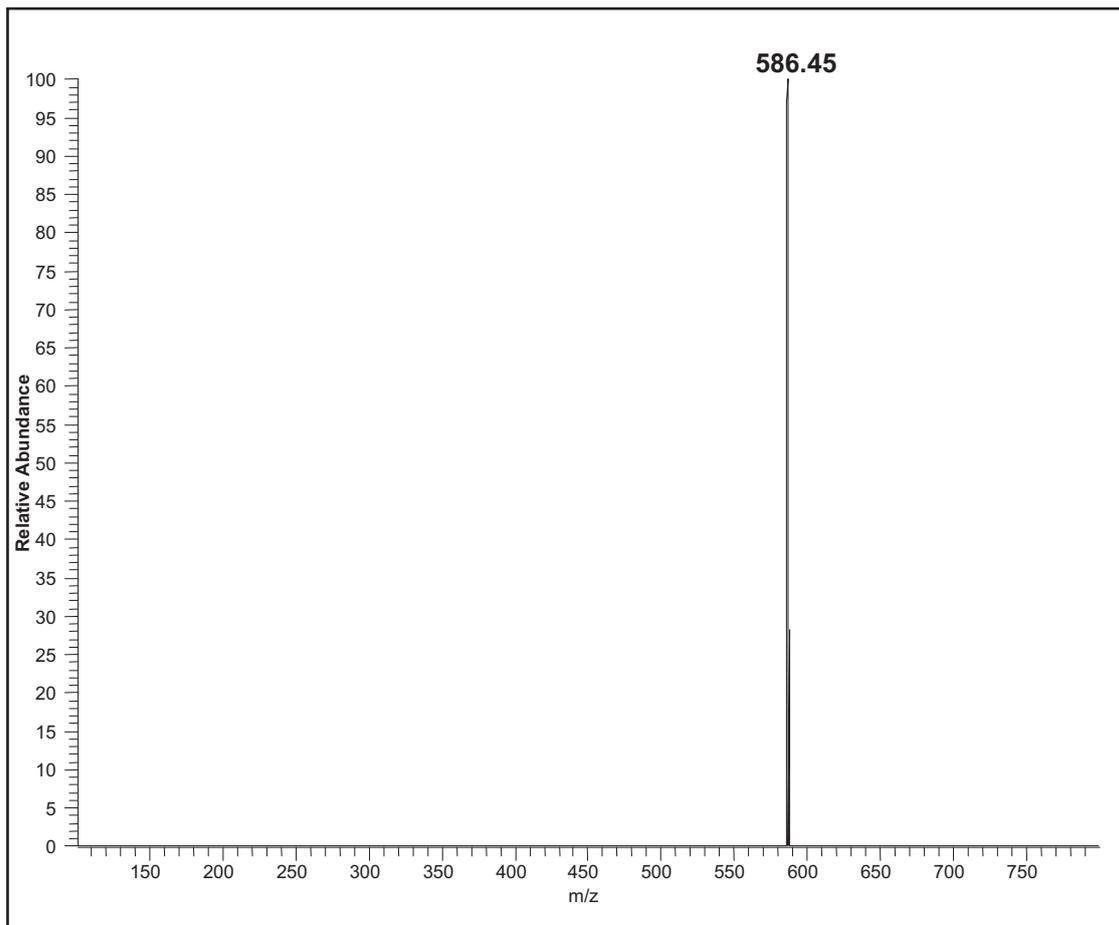


Abbildung 62: MS-Spektrum des BcPheD-SG (ESI-positiv, PAR-Modus, m/z 100-800 → 308)

Das Massenspektrum für den internen Standard 1-MP-SG bei Ionisierung im positiven ESI-Modus ist in Abbildung 63 (A) dargestellt. Im DAU-Scan-Modus zeigte das Molekül-Ion das m/z 522 ($[M+H]^+$), während als Hauptfragment das m/z 215 generiert wurde, welches durch Abspaltung des Glutathionrestes vom 1-MP-SG entstand. 1-MP-SG ist ein benzylichsches GSH-Konjugat, das andere Fragmentmuster aufweist als aliphatische oder aromatische GSH-Konjugate sie zeigen. Ein typisches Merkmal hierbei ist die thermisch bedingte Bruchstelle S-C (Baillie und Davis 1993), wie sie auch in diesem Fall zwischen dem Glutathion-Rest und der Methylengruppe am Pyrenteil des Moleküls auftrat. Das gezeigte Massenspektrum ist ein Beispiel dafür, dass GSH-Konjugate im positiven ESI-Ionisierungsmodus unter Kollision mit Argon nicht zwangsläufig einheitliche Fragmente ergeben.

Auch bei Verwendung des PAR-Modus ließ sich durch Auswahl des Fragments m/z 215 für Q3 das Ausgangsmolekül-Ion m/z 522 in Q1 detektieren (Abb. 63 (B)). So gelang ebenfalls die Demonstration der erfolgreichen Anwendbarkeit des PAR-Modus zur Strukturaufklärung unbekannter GSH-Konjugate anhand des protonierten Glutathions m/z 308.

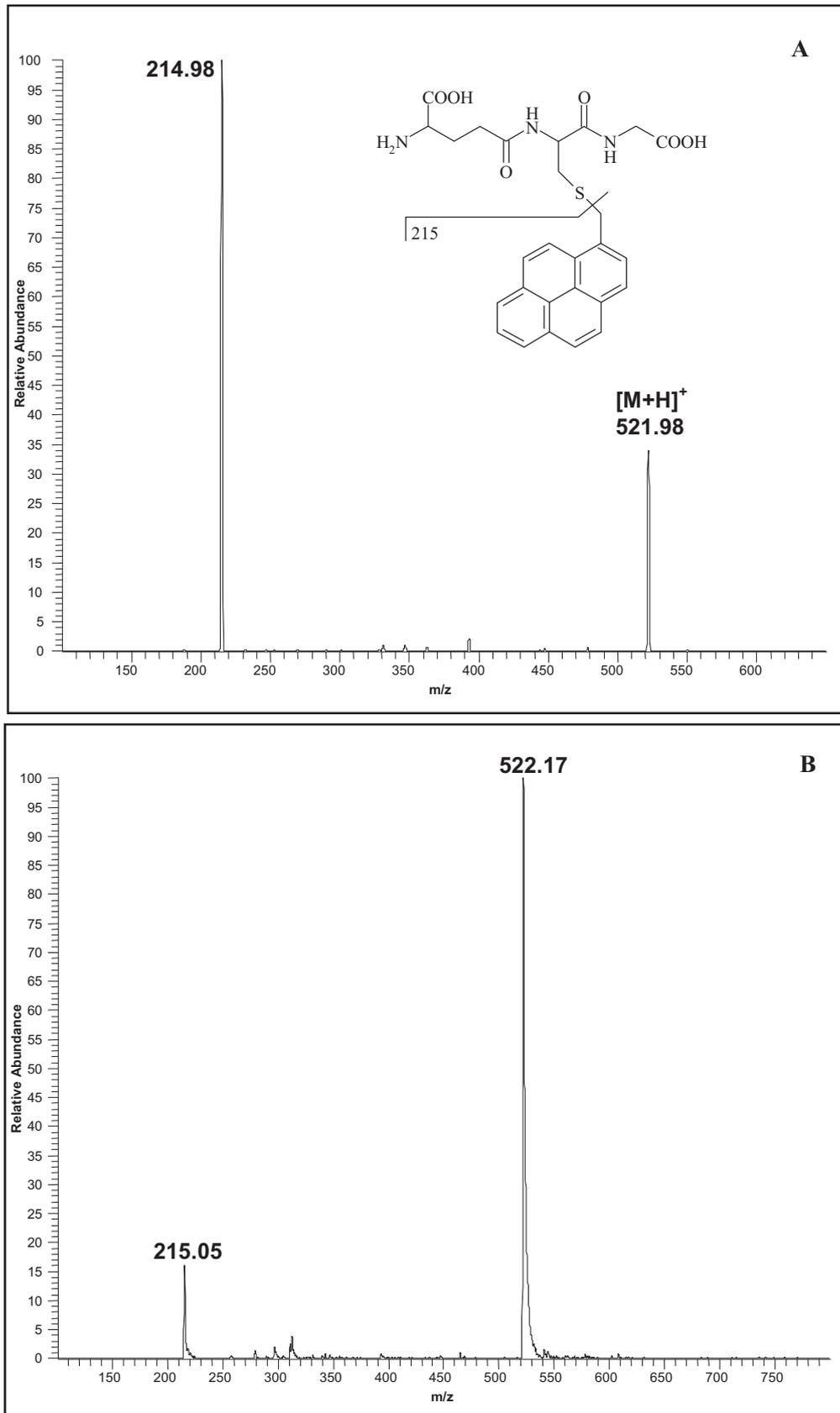


Abbildung 63: (A) MS-Spektrum des 1-MP-SG (ESI-positiv, DAU-Modus, m/z 522 → 100-650) und (B) MS-Spektrum des 1-MP-SG (ESI-positiv, PAR-Modus, m/z 100-800 → 215)

4.4.1.2 Quantitative Bestimmung von BcPheD-SG

Abbildung 64 zeigt das Chromatogramm einer BcPheD-SG-Kalibrierlösung unter den optimierten Messparametern (Kapitel 3.6). Die Zuordnung der BcPheD-SG-Peaks erfolgte anhand von Literaturbefunden nach Funk (1992).

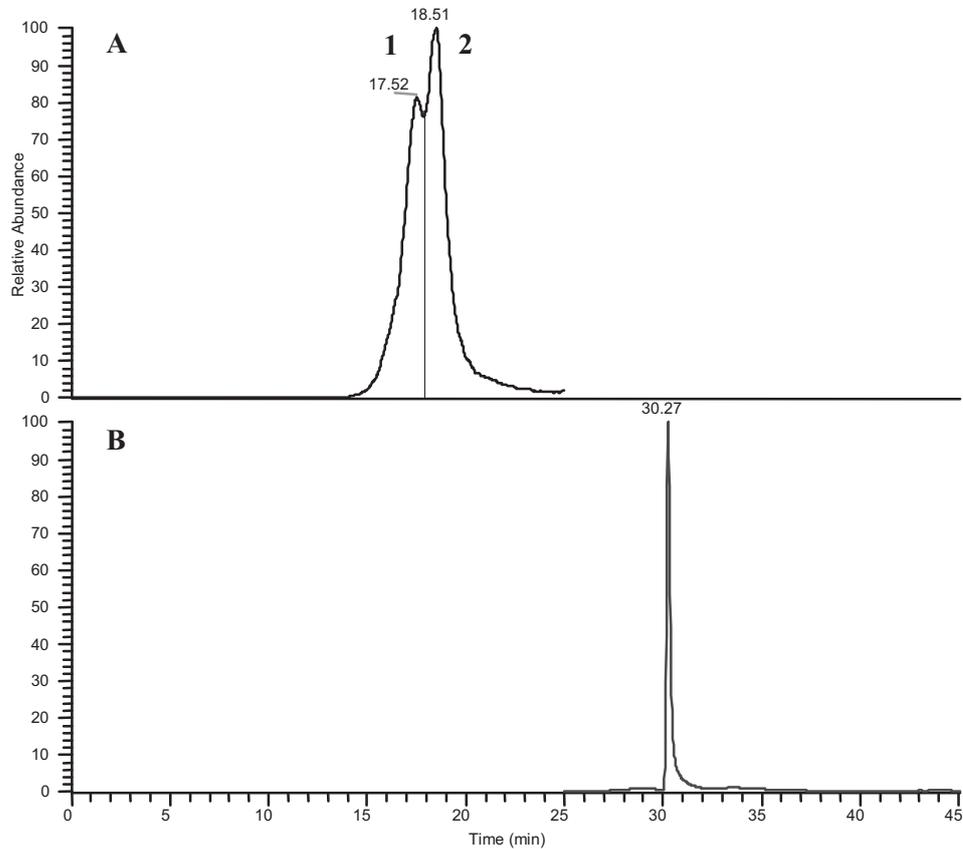


Abbildung 64: Beispielchromatogramm einer BcPheD-SG-Kalibrierlösung im SRM-Modus, (A) BcPheD-SG-Analyten ((1) (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)-BcPheD-SG, (2) (1*R*,2*R*,3*R*,4*S*)-BcPheD-SG), (B) 1-MP-SG (Interner Standard)

Abbildung 65 (A) gibt einen Überblick über die einzelnen Chromatogramm-Zeitfenster einer BcPheD-SG Kalibrierlösung, die für die Quantifizierung der beiden Analyten relevant sind. Die entsprechenden Chromatogramm-Zeitfenster einer Mediumprobe (19 ml Medium, Inkubation mit 20 μ M 3,4-Diol-B[*c*]Phe für 12 h) sind in Abbildung 65 (B) gezeigt.

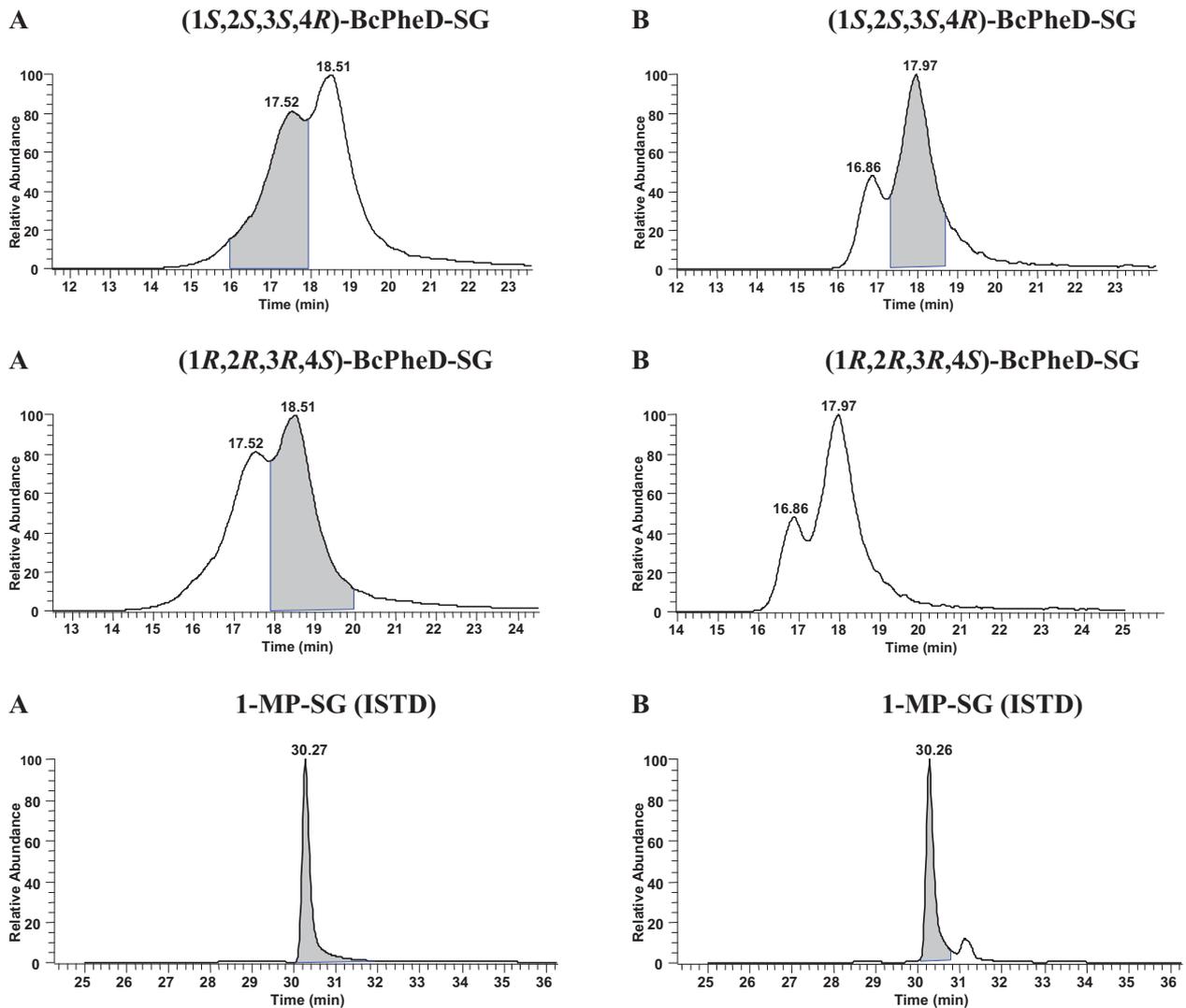


Abbildung 65: Beispielchromatogramme (A) einer BcPheD-SG-Kalibrierlösung und (B) einer Mediumprobe (19 ml Medium aus einer Inkubation der Caco-2-Zellen mit 20 μ M 3,4-Diol-B[c]Phe für 12 h). In der Mediumprobe konnte nur das (1S,2S,3S,4R)-BcPheD-SG und nicht das (1R,2R,3R,4S)-BcPheD-SG nachgewiesen werden. Ausschnitte für die Quantifizierung

Da die Optimierungen der chromatographischen Bedingungen keine Basislinientrennung der Analyten zuließen und zudem relativ breite Peaks unvermeidbar waren, erfolgte zur Bestätigung der Peakzuordnung ein Dotierungs-Experiment. Hierbei wurde die BcPheD-SG-Kalibrierlösung zur Mediumprobe aus einer Caco-2-Zellinkubation mit 3,4-Diol-B[c]Phe zugegeben. Die zugehörigen Chromatogramme zeigt Abbildung 66. Hierbei stellt Chromatogramm 1 die dotierte Lösung bestehend aus BcPheD-SG-Kalibrierlösung und Mediumprobe dar, Chromatogramm 2 die separate Mediumprobe und Chromatogramm 3 die separate BcPheD-SG-Kalibrierlösung. Es zeigte sich im Chromatogramm 1, dass der Peak des (1S,2S,3S,4R)-BcPheD-SG der Kalibrierlösung durch das Versetzen mit der Probelösung im Vergleich zum (1R,2R,3R,4S)-BcPheD-SG-Peak größer geworden war. Das bedeutet, dass in der Probe nur das (1S,2S,3S,4R)-BcPheD-SG als bekanntes GSH-Konjugat identifiziert werden konnte. Zusätzlich enthielt die Mediumprobe eine Substanz, deren Peak auf der

HPLC-Säule vor dem (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)-BcPheD-SG eluierte. Möglicherweise könnte es sich hierbei um ein isomeres GSH-Konjugat des *syn*-BcPheDE handeln, wobei die Elutionsreihenfolge nicht mit den aus Literaturdaten (Funk 1992) erhaltenen Ergebnissen übereinstimmt. Ohne die Verfügbarkeit der BcPheD-SG-Referenzverbindungen des *syn*-BcPheDE lässt sich die Zuordnung der Peaks jedoch nicht endgültig abschließen.

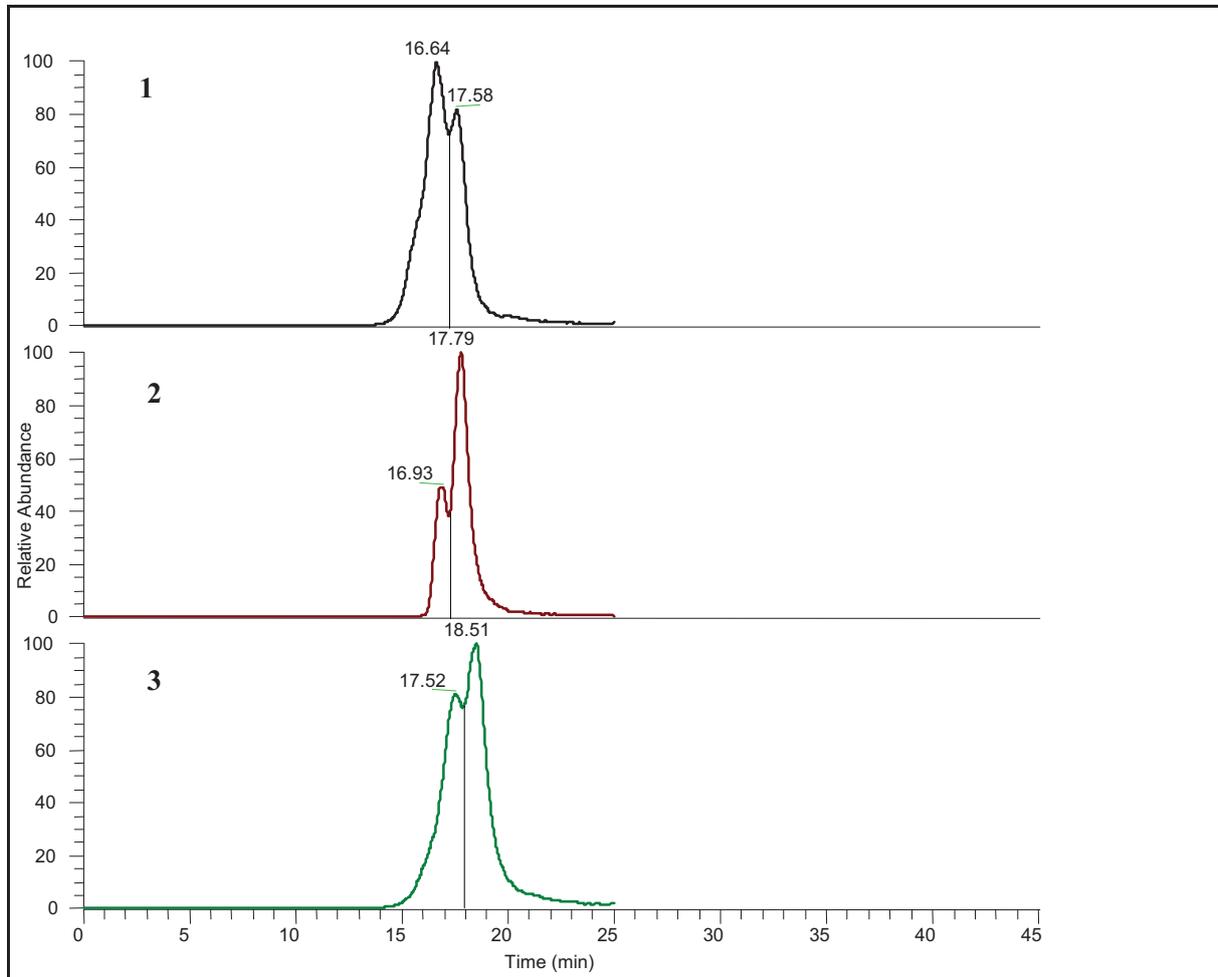


Abbildung 66: Chromatogramme (1) BcPheD-SG-Kalibrierlösung + Mediumprobe aus einer Caco-2-Zellinkubation mit 3,4-Diol-B[c]Phe (20 μ M) für 12 h, (2) Mediumprobe aus einer Caco-2-Zellinkubation mit 3,4-Diol-B[c]Phe (20 μ M) für 12 h, (3) BcPheD-SG-Kalibrierlösung

4.4.1.3 Bildung der BcPheD-SG-Konjugate und Transport ins Medium

Nach einer 3,4-Diol-B[c]Phe-Inkubation von Caco-2-Zellen erfolgte die Analytik mittels LC-MS/MS nach entwickeltem *Clean-Up*. Abbildung 67 zeigt die Ergebnisse von analysierten Medienproben aus Caco-2-Zellen, die mit 3,4-Diol-B[c]Phe (20 μ M) jeweils 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h oder 72 h behandelt worden waren. Hierbei sind die MW \pm SD von jeweils 3 biologischen Replikaten angegeben. Es wurde die Zeitabhängigkeit der ins Medium transportierten GSH-Konjugate (1*R*,2*R*,3*R*,4*S*)-BcPheD-SG und (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)-BcPheD-SG bestimmt, die unter GST-Katalyse aus dem intrazellulär durch CYP1A1 und CYP1B1 gebildeten BcPheDE mit GSH entstehen können.

Das (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)-BcPheD-SG-Konjugat konnte in den untersuchten Medienproben bestimmt werden, daher war der Transport dieses Metaboliten aus der Zelle in das umgebende Medium nachgewiesen. Das (1*R*,2*R*,3*R*,4*S*)-BcPheD-SG-Konjugat war hingegen nicht nachweisbar. Diese Beobachtung hatten auch bereits analysierte Zellextraktproben eines analogen Inkubationsansatzes in einem Vorversuch gezeigt.

Die Kinetik des (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)-BcPheD-SG zeigt einen Anstieg von 6 h bis 36 h. Ab 36 h wird für das nachgewiesene Stereoisomer eher eine Plateauphase beobachtet.

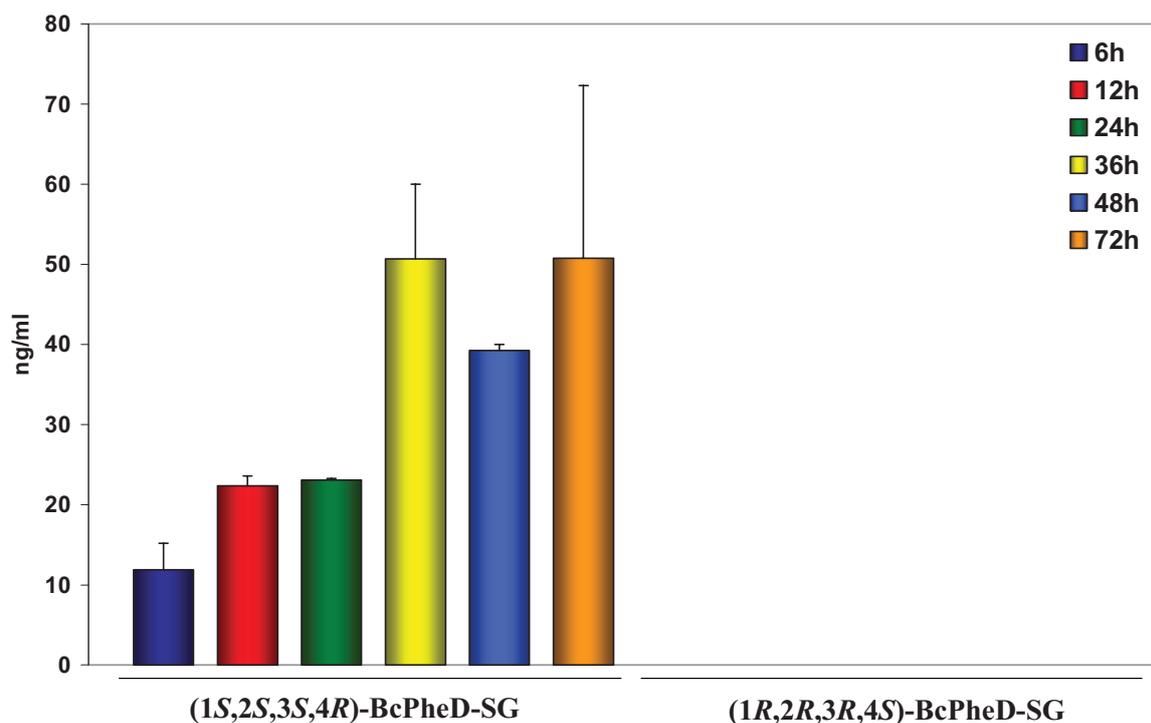


Abbildung 67: (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)-BcPheD-SG- und (1*R*,2*R*,3*R*,4*S*)-BcPheD-SG-Konjugate im Medium (extrazellulär) in ng/ml nach Inkubation der Proben mit 3,4-Diol-B[c]Phe (20 μ M) für 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h oder 72 h. Dargestellt sind die MW \pm SD von jeweils 3 biologischen Replikaten.

4.4.1.4 Inkubationen der Caco-2-Zellen mit BcPheDE

Um die Stereoselektivität bei der Umsetzung des 3,4-Diol-B[c]Phe über das (+)-*anti*-BcPheDE zum (1*R*,2*R*,3*R*,4*S*)-BcPheD-SG genauer zu charakterisieren, wurde ein zusätzliches Experiment mit dem direkten metabolischen Vorläufer des BcPheD-SG durchgeführt. Dabei erfolgte die Behandlung der Caco-2-Zellen mit (\pm)-*anti*-BcPheDE (5 μ M) für 24 h und 48 h.

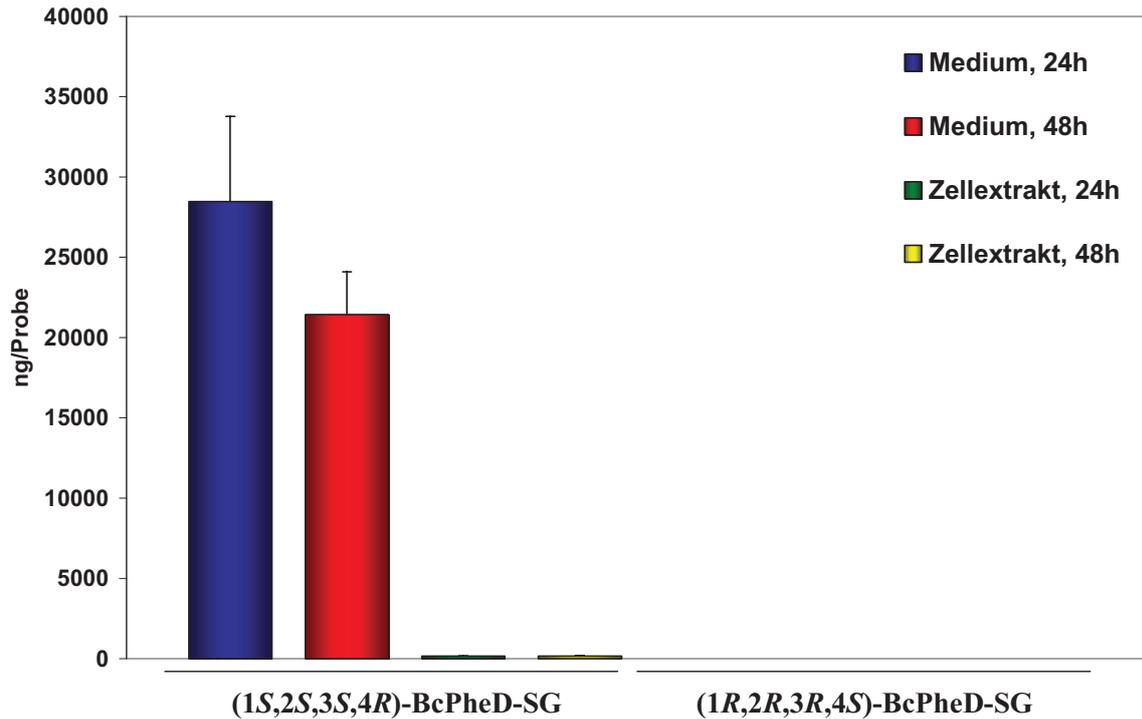


Abbildung 68: (1S,2S,3S,4R)-BcPheD-SG- und (1R,2R,3R,4S)-BcPheD-SG-Konjugate in ng/Probe im Medium (extrazellulär) und im Zellextrakt (intrazellulär) nach Inkubation der Proben mit BcPheDE (5 μ M) für 24 h oder 48 h. Dargestellt sind die MW \pm SD von jeweils 3 biologischen Replikaten.

In Abbildung 68 sind die MW \pm SD der BcPheD-SG-Konjugate von jeweils 3 biologischen Replikaten angegeben. Um extrazelluläre und intrazelluläre Ergebnisse besser vergleichen zu können, sind die Konzentrationen der Konjugate in ng/Probe angegeben.

Dieser Versuch zeigte deutlich, dass nur das (1S,2S,3S,4R)-BcPheD-SG intrazellulär gebildet und ins Medium transportiert wurde, während das (1R,2R,3R,4S)-BcPheD-SG erneut weder intrazellulär noch im Medium nachzuweisen war. Damit konnte gezeigt werden, dass auch die direkte Inkubation mit (\pm)-*anti*-BcPheDE ausschließlich zur Bildung des (1S,2S,3S,4R)-BcPheD-SG-Konjugates führte und somit nicht eine stereoselektive Oxidation des (\pm)-*trans*-3,4-Diol-B[c]Phe für die ausschließliche Bildung des (1R,2R,3R,4S)-BcPheD-SG verantwortlich ist.

Der bestimmte Gesamtgehalt an exportierten GSH-Konjugaten im Medium in Bezug zur eingesetzten Menge des 3,4-Diol-B[c]Phe zeigte, dass nach Inkubation der Caco-2-Zellen etwa 0,4 % an BcPheD-SG-Konjugaten im Medium wiedergefunden werden. Bei Inkubation mit (\pm)-*anti*-BcPheDE wurden hingegen etwa 50 % der eingesetzten BcPheDE-Menge intrazellulär konjugiert und als BcPheD-SG ins Medium transportiert.

4.4.2 Bestimmung von B[c]Phe-Metaboliten mittels HPLC-UV

Ein HPLC-Chromatogramm der Referenzsubstanzen der B[c]Phe-Metaboliten ist in Abbildung 69 dargestellt. Ergänzend zu den Retentionszeiten wurden bei der Identifizierung der Peaks in den Chromatogrammen die UV-Spektren der B[c]Phe-Metaboliten verwendet (Kapitel 10.1.6.1, Abb. 87).

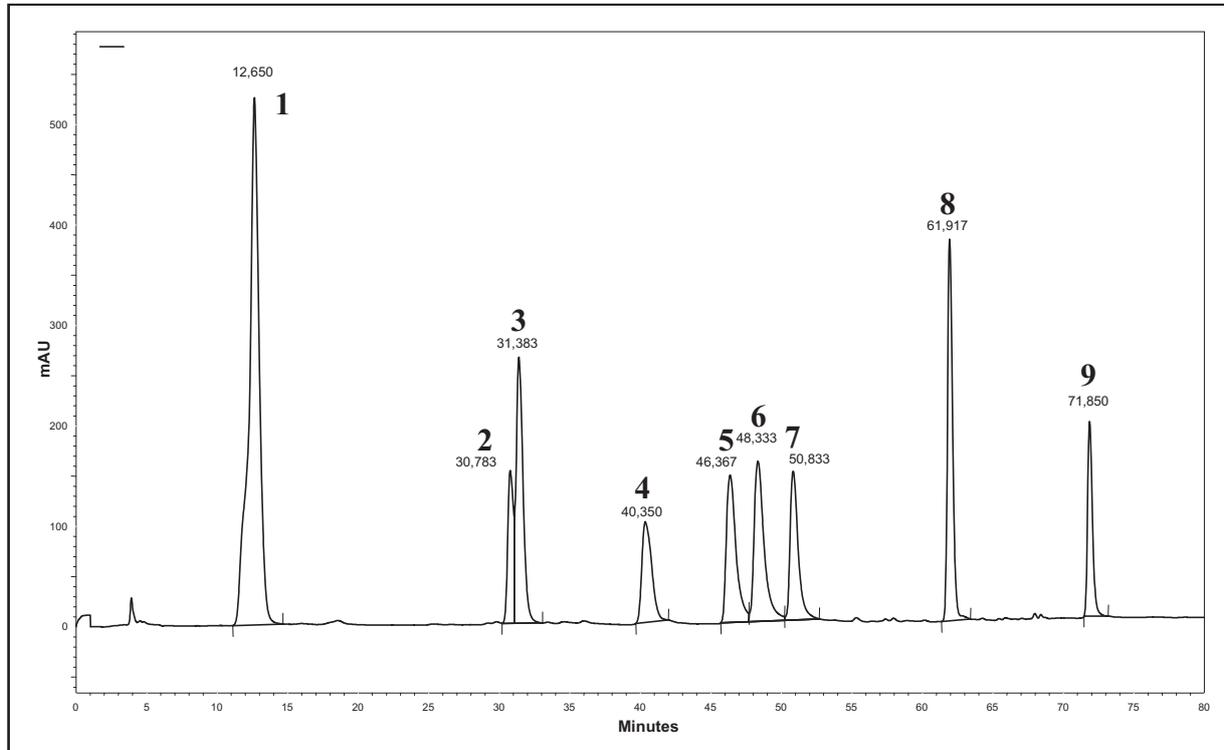


Abbildung 69: Referenz-HPLC-Chromatogramm der B[c]Phe-Metaboliten (1: 1,4/2,3-Tetrol-B[c]Phe, 2: 5,6-Diol-B[c]Phe, 3: 3,4-Diol-B[c]Phe, 4: 1-OH-B[c]Phe, 5: 2-OH-B[c]Phe, 6: 3-OH-B[c]Phe, 7: 4-OH-B[c]Phe, 8: B[c]Phe, 9: PER)

4.4.2.1 Bildung der B[c]Phe-Metaboliten und Transport ins Medium

Zur Bestimmung von B[c]Phe-Metaboliten wurden in Zellkulturflaschen ausdifferenzierte Caco-2-Zellen mit 10 μ M B[c]Phe 24 h, 48 h und 72 h inkubiert und Zellextrakte sowie Medien mittels HPLC-UV nach entwickeltem *Clean-Up* analysiert. Abbildung 70 stellt die MW von jeweils 3 biologischen Replikaten dar. Hierbei wurde die Zeitabhängigkeit der im Zellinneren enthaltenen und der ins Medium transportierten Phenole (1-, 2-, 3- und 4-OH-B[c]Phe) sowie Dihydrodirole (3,4- und 5,6-Diol-B[c]Phe) und des 1,4/2,3-Tetrol-B[c]Phe bestimmt. Die Bildungen der Metaboliten verlaufen unter CYP1A1- und CYP1B1-vermittelter Oxidation und anschließender mEH-Katalyse zu den Dihydrodiolen oder folgender nicht-enzymatischer Isomerisierung zu den Phenolen. Die Phenole können dann zu Glucuroniden oder Sulfaten konjugiert werden. Eine Bildung des Tetrols resultiert aus erneuter CYP-assoziiertes Oxidation der Dihydrodirole mit anschließender spontaner

Hydrolyse der Dihydrodiolepoide. Zur besseren Vergleichbarkeit von Medium- und Zellextraktproben sind die Metaboliten-Konzentrationen in ng/Probe angegeben.

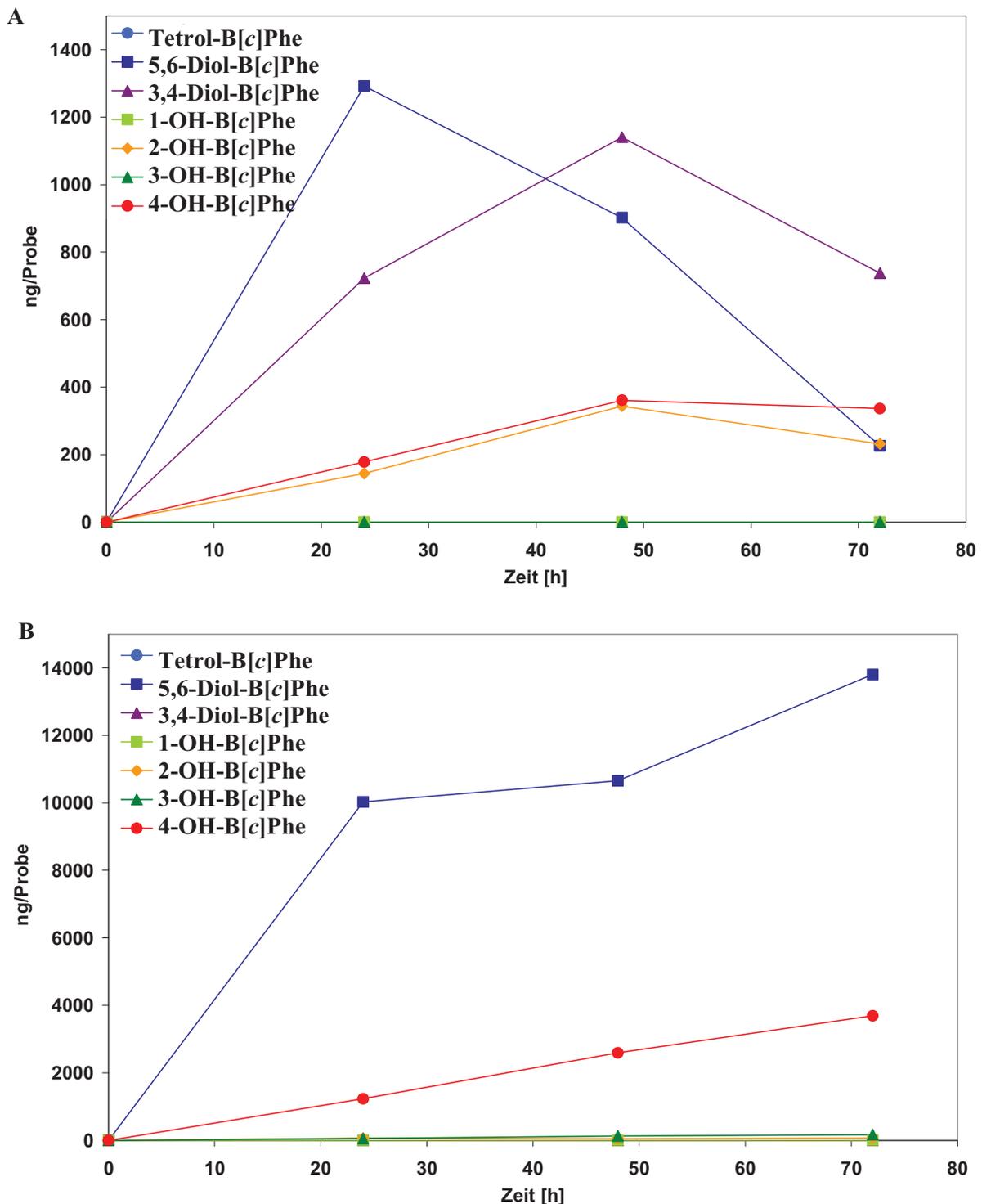


Abbildung 70: B[c]Phe-Metabolitenprofil (A) im Zellextrakt (intrazellulär) und (B) im Medium (extrazellulär) in ng/Probe nach Inkubation der Proben mit B[c]Phe (10 μ M) für 24 h, 48 h oder 72 h. Gezeigt sind die MW von jeweils 3 biologischen Replikaten.

In den inkubierten Zellen konnten als Metaboliten das 3,4- und 5,6-Diol-B[c]Phe sowie das 2- und 4-OH-B[c]Phe bestimmt werden. Das 1,4/2,3-Tetrol-B[c]Phe und die isomeren

Phenole 1- und 3-OH-B[c]Phe waren hingegen nicht nachweisbar (Abb. 70 (A)). Intrazellulär lagen die Konzentrationsmaxima von 3,4-Diol-B[c]Phe sowie von 2- und 4-OH-B[c]Phe bei einer Inkubationszeit von 48 h, während das 5,6-Diol-B[c]Phe bereits bei 24 h das Maximum erreicht hatte und danach fortlaufend geringere Konzentration zeigte. Dies könnte sein frühes Auftreten in hohen Gehalten im Medium erklären, das heißt, ein schneller Transport des 5,6-Diol-B[c]Phe ins Medium ist anzunehmen. Des Weiteren zeigte sich extrazellulär das 4-OH-B[c]Phe, dessen Konzentration bis zu einer Inkubationszeit von 72 h kontinuierlich anstieg. Das 3,4-Diol-B[c]Phe war hingegen im Medium nicht detektierbar, was auf einen nicht vorhandenen Transport aus der Zelle heraus schließen lässt. Die übrigen B[c]Phe-Metaboliten waren dagegen nur in sehr niedrigen Konzentrationen im Medium enthalten beziehungsweise nicht nachweisbar (Abb. 70 (B)).

Bei Bezug der Gesamtmenge an detektierten Metaboliten auf die Ausgangsmenge B[c]Phe zu Beginn der Inkubation, wurden nach 24 h etwa 30 %, nach 48 h etwa 35 % und nach 72 h etwa 42 % Metabolisierungsprodukte nachgewiesen.

4.4.2.2 Qualitativer Nachweis von BcPheD-SG-Konjugaten

In Ergänzung zu den oben beschriebenen Analyten wurden einzelne Caco-2-Zellproben auf die Bildung von GSH-Konjugaten untersucht. Abbildung 71 (A) zeigt das Chromatogramm (ESI-negativ, SRM-Modus) einer Probe aus dem vorausgegangenen Inkubationsansatz von Caco-2-Zellen mit B[c]Phe (10 μ M für 48 h). Diese Probe weist bei einer Retentionszeit von 14,89 min einen BcPheD-SG-spezifischen Peak auf. Die um etwa 2 min im Vergleich zu den BcPheD-SG-Referenzverbindungen (Kapitel 4.4.1.2) verkürzte Retentionszeit des BcPheD-SG-Peaks ergibt sich durch leicht veränderte Chromatographiebedingungen. Zusätzlich erfolgte eine Analyse im DAU-Modus, um durch die Bestimmung der GSH-spezifischen Fragmente eine weitere Absicherung auf die erfolgte Bildung eines GSH-Konjugates zu erhalten (Abb. 71 (B)). Hierbei ließen sich die Fragmente m/z 272, 254, 210, 179 und 143 sowie das BcPheD-SG-spezifische Fragment m/z 311 und folglich das Auftreten eines BcPheD-SG-Konjugates in der Caco-2-Zellprobe nachweisen.

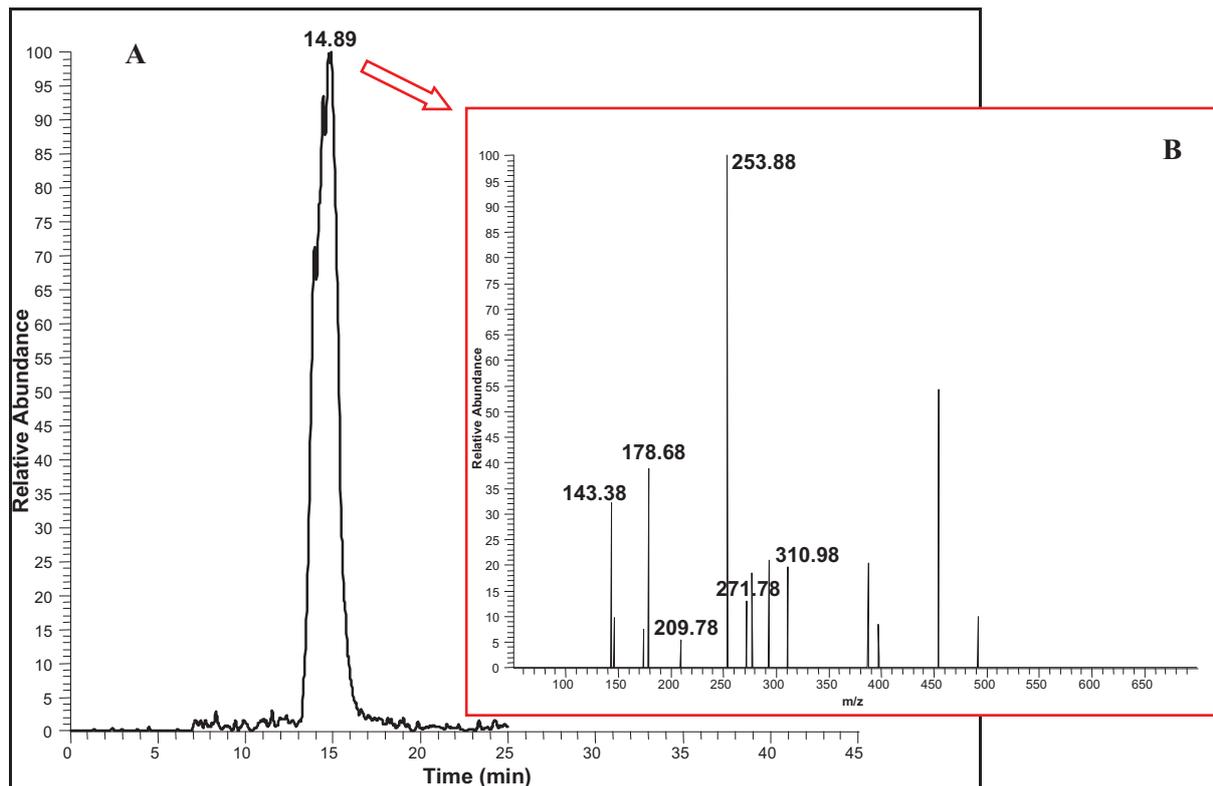


Abbildung 71: (A) Chromatogramm einer Mediumprobe (10 μ M B[c]Phe für 48 h, ESI-negativ, SRM-Modus) und (B) MS-Spektrum des Peaks bei 14,89 min (ESI-negativ, DAU-Modus)

4.5 Mercaptursäure-Analytik im Urin mittels LC-MS/MS

Für die Bestimmung von im Urin ausgeschiedener Mercaptursäuren lebensmittel- oder umweltrelevanter Xenobiotika war die Kenntnis über ihr Verhalten in der LC-MS/MS erforderlich. Um charakteristische Molekül-Ionen und gruppenspezifische Fragmente zu erhalten, wurden Massenspektren von Mercaptursäure-Referenzlösungen aufgenommen. Hierbei fanden die Mercaptursäuren von Benzol (*S*-Phenylmercaptursäure, *S*-PMA), von Toluol (*S*-Benzylmercaptursäure, *S*-BMA) sowie von dem PAK Naphthalin (*S*-Naphthylmercaptursäure, *S*-NMA) Verwendung. Als interner Standard diente die deuterierte *S*-PMA (*S*-PMA- d_5). Das Massenspektrum der *S*-PMA bei negativer ESI-Ionisierung (Abb. 72 (A)) ergab das charakteristische Fragment m/z 109, welches aus der Spaltung des Moleküls zwischen dem Schwefelatom und dem Mercaptursäure-Rest resultiert. *S*-PMA- d_5 zeigte bei negativer ESI-Ionisierung ein der *S*-PMA analoges Massenspektrum (Abb. 72 (B)), wobei das charakteristische Fragment aufgrund des Deuterierungsgrades m/z 114 war. Das Massenspektrum der *S*-BMA enthielt unter identischen Ionisierungsbedingungen das Fragment m/z 123 (Abb. 72 (C)) und die *S*-NMA zeigte ebenfalls unter identischen Parametern das Fragment m/z 159 (Abb. 72 (D)).

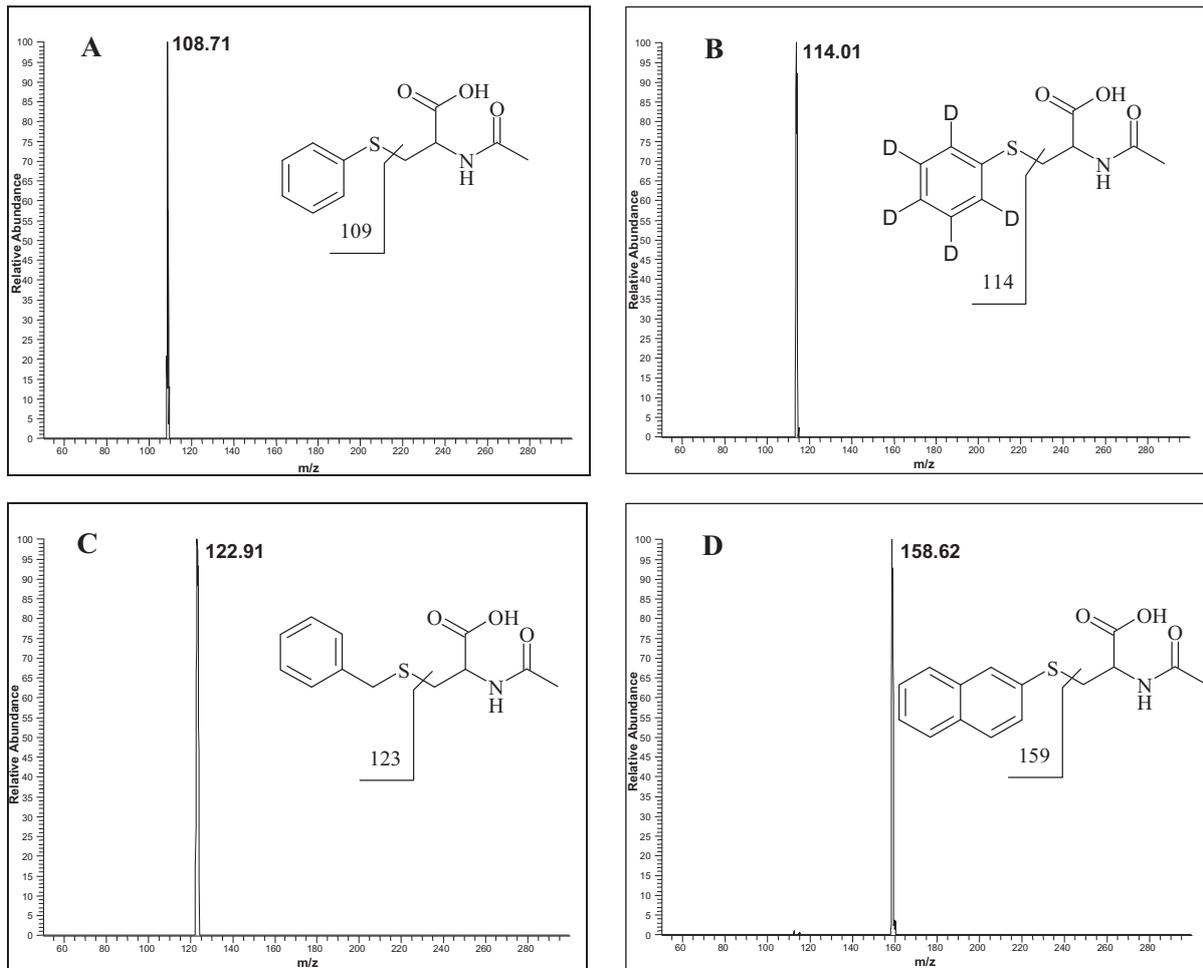


Abbildung 72: MS-Spektren von (A) *S*-PMA (ESI-negativ, DAU-Modus m/z 238 \rightarrow 50-300), (B) *S*-PMA- d_5 (ESI-negativ, DAU-Modus m/z 243 \rightarrow 50-300), (C) *S*-BMA (ESI-negativ, DAU-Modus m/z 252 \rightarrow 50-300) und (D) *S*-NMA (ESI-negativ, DAU-Modus m/z 288 \rightarrow 50-300)

Da für die Mercaptursäure des Naphthalins (*S*-NMA) in allen analysierten Urinproben lediglich Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze ermittelt wurden, konzentrieren sich die folgenden Ergebnisse auf die Untersuchungen der Mercaptursäuren *S*-PMA und *S*-BMA.

Abbildung 73 zeigt das Chromatogramm einer Mercaptursäure-Kalibrierlösung, wobei das Chromatogramm 1 den Totalionenstrom (TIC) widerspiegelt. Die weiteren Chromatogramme zeigen die *S*-PMA- d_5 (m/z 243 \rightarrow 114) (Abb. 73 (2)), die *S*-PMA (m/z 238 \rightarrow 109) (Abb. 73 (3)) und die *S*-BMA (m/z 252 \rightarrow 123) (Abb. 73 (4)).

Die Kollisionsenergien (*Collision cell offset voltage*, Coff) für die Fragmentierungsreaktionen wurden für alle Substanzen optimiert, wobei sich die jeweils höchsten Signalintensitäten bei folgenden Einstellungen ergaben: *S*-PMA- d_5 : 22 V, *S*-PMA: 22 V und *S*-BMA: 15 V.

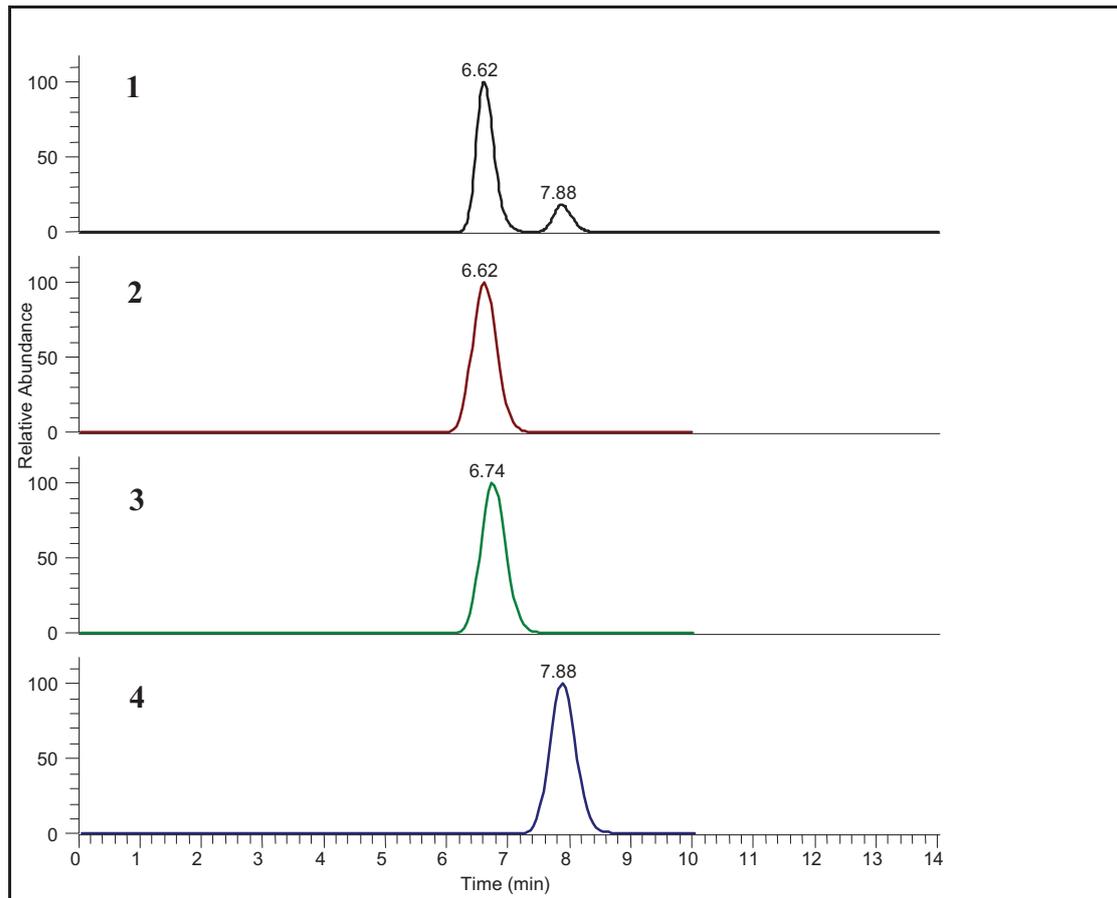


Abbildung 73: Beispielchromatogramm einer Mercaptursäure-Kalibrierlösung aufgenommen im ESI-negativ SRM-Modus; Peakzuordnung: (1) Gesamtchromatogramm (TIC), (2) S-PMA-d₅ (ISTD, m/z 243 → 114), (3) S-PMA (m/z 238 → 109), (4) S-BMA (m/z 252 → 123)

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen die einzelnen für die Quantifizierung erforderlichen Zeitfenster. Während Abbildung 74 (A) die Chromatogramm-Ausschnitte einer Mercaptursäure-Kalibrierlösung zeigt, sind in Abbildung 74 (B) die jeweiligen Ausschnitte einer gemäß Kapitel 3.10 analysierten Urinprobe dargestellt. Die Retentionszeiten und damit auch die Zuordnung der Peaks in der Urinprobe wurden zusätzlich durch ein Dotierexperiment verifiziert.

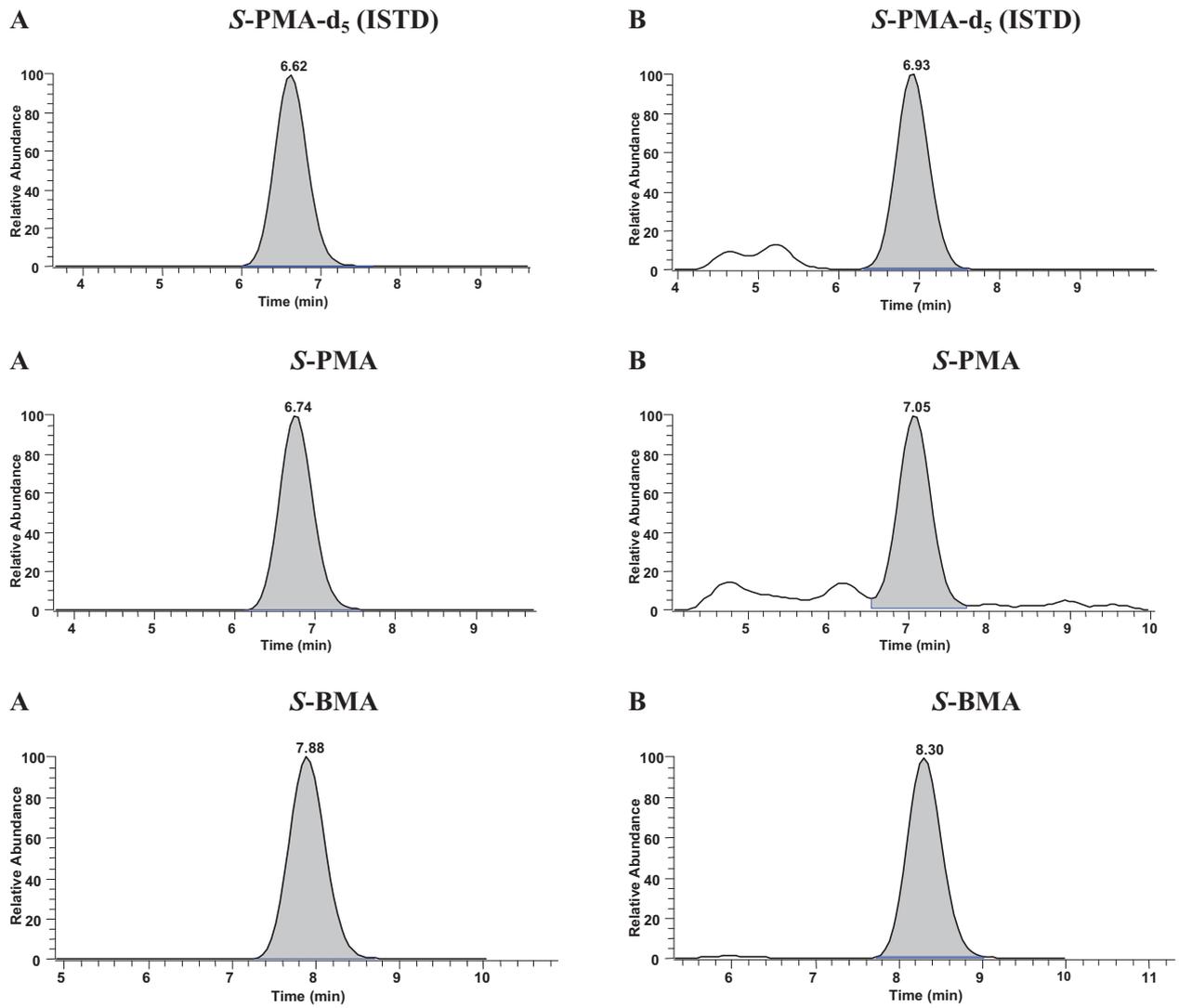


Abbildung 74: Beispielchromatogramme (A) einer Mercaptursäure-Kalibrierlösung und (B) einer Urinprobe, Ausschnitte für die Quantifizierung

4.5.1 Bestimmung von Mercaptursäuren in Nichtraucher- und Raucher-Urinen

Für die Untersuchung auf Mercaptursäuren dienten Urinproben von insgesamt zehn Nichtrauchern, zwei Zigaretten-Rauchern sowie zehn Shisha (Wasserpfeifen)-Rauchern aus einem Kooperationsprojekt mit dem BfR zum Biomonitoring bei Wasserpfeifen-Rauchern. Die Proben wurden vor der LC-MS/MS-Analytik einem zuvor entwickelten *Clean-Up* gemäß Kapitel 3.10 unterzogen. Dieses SPE-Verfahren erlaubte durch den gezielten Einsatz eines Anionenaustauscher-Materials eine gute Probenaufreinigung für Analyten mit einer Säuregruppe im Molekül. So konnten die zu analysierenden Mercaptursäuren effektiv von den sonstigen Urinbestandteilen abgetrennt werden.

In Abbildung 75 (A) sind die Ergebnisse der *S*-PMA-Bestimmung im 24 h-Urin von Nichtrauchern, Zigaretten-Rauchern sowie Shisha-Rauchern dargestellt. Abbildung 75 (B) zeigt die *S*-PMA-Konzentrationen in Abhängigkeit der in den Urinen bestimmten Creatininhalt, wodurch sich eine bessere Vergleichbarkeit mit Literaturdaten ergibt. Die höchsten *S*-PMA-Gehalte waren im Urin von Rauchern zu finden. Die Analytik der Nichtraucher-Urine hingegen brachte mit *S*-PMA-Gehalten von 0,55 bis 1,46 µg/g Creatinin durchweg niedrigere Konzentrationen des Benzol-Metaboliten hervor als die untersuchten Zigaretten-Raucher-Proben (1,86 bis 2,29 µg/g Creatinin). Die Proben der Wasserpfeifen-Raucher zeigten mit *S*-PMA-Gehalten zwischen 0,09 und 2,88 µg/g Creatinin einen großen Schwankungsbereich.

Die entwickelte Schwefelsäurebehandlung der Urinproben vor der Analyse führte zu höheren *S*-PMA-Gehalten. Eine Erklärung hierfür ist die Umsetzung von ebenfalls im Harn enthaltener prä-*S*-PMA zur *S*-PMA durch Abspaltung von Wasser aus der prä-*S*-PMA. Diese pH-abhängige Umwandlung läuft bereits im Urin ab, wobei sich sehr variable Werte ergeben können. Der Gehalt an *S*-PMA würde demnach bei direkter Bestimmung ohne Anpassung des pH-Wertes unterhalb der tatsächlichen Gesamtkonzentration liegen. Dieser Befund steht im Einklang mit den kürzlich auch von Paci *et al.* (2007) erhaltenen Ergebnissen, die ebenfalls erhöhte *S*-PMA-Gehalte nach der Zugabe von Schwefelsäure zum Urin ermittelten.

Die Ergebnisse der Bestimmung des Toluol-Metaboliten *S*-BMA im 24-h-Humanurin von Nichtrauchern, Zigaretten-Rauchern sowie Wasserpfeifen-Rauchern sind in Abbildung 76 dargestellt. Es waren keine erhöhten *S*-BMA-Konzentrationen in Raucher-Urinproben nachweisbar. Abbildung 76 (B) stellt die *S*-BMA-Konzentrationen in Abhängigkeit der Creatininhalt der Urine dar, wobei eine adäquate Vergleichbarkeit der einzelnen Proben gewährleistet ist. Die vor der Analyse durchgeführte Schwefelsäure-Behandlung zeigte bezüglich des *S*-BMA keinerlei Effekt. Dies bestätigt indirekt die Verstoffwechslung von Toluol zur *S*-BMA (Abb. 4) und nicht die Bildung einer isomeren Tolymercaptursäure, welche über eine prä-Mercaptursäure gebildet werden könnte.

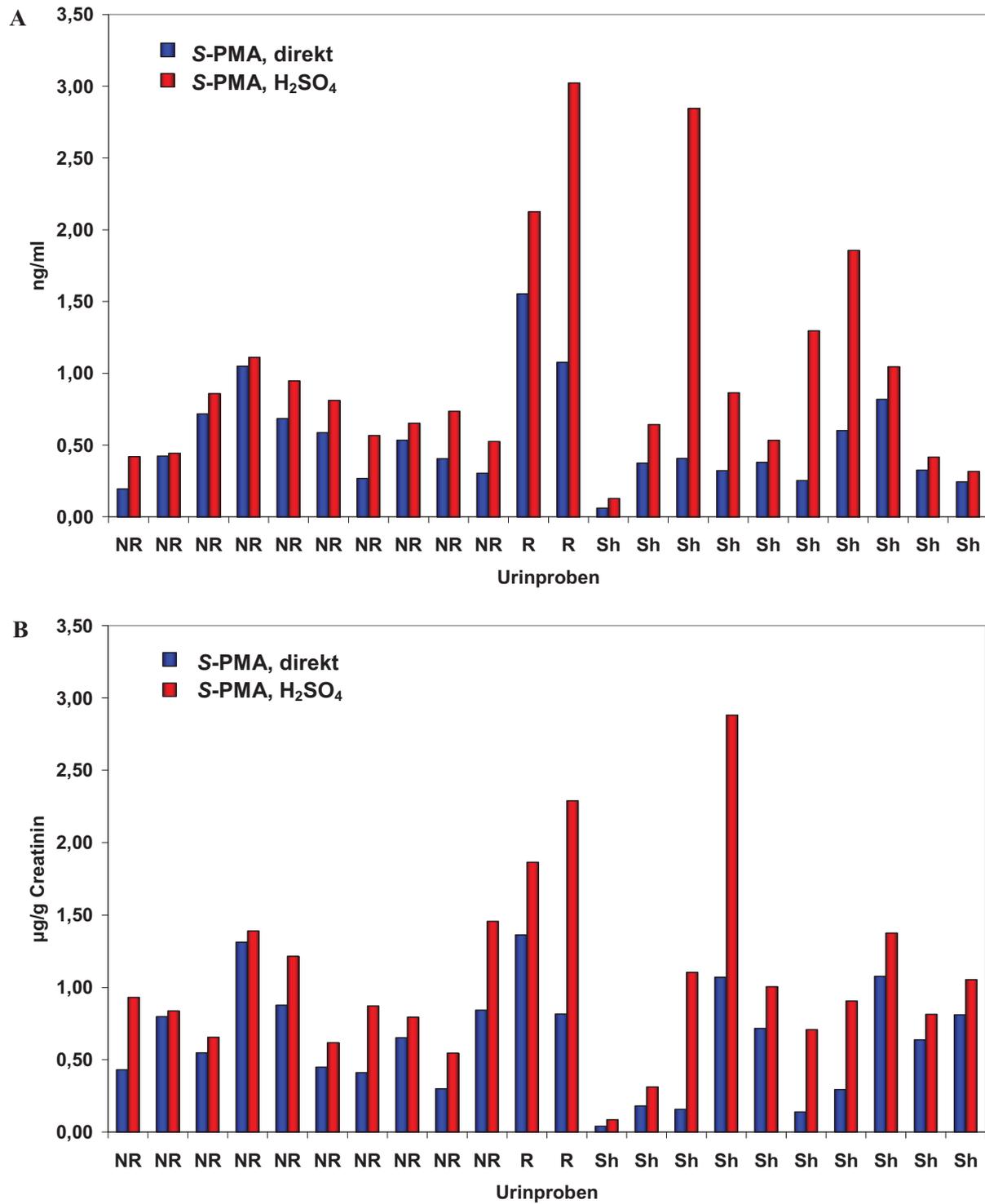


Abbildung 75: S-PMA-Konzentrationen im Urin (A) in ng/ml und (B) in µg/g Creatinin (NR = Nichtraucher, R = Zigaretten-Raucher, Sh = Shisha (Wasserpfeifen)-Raucher)

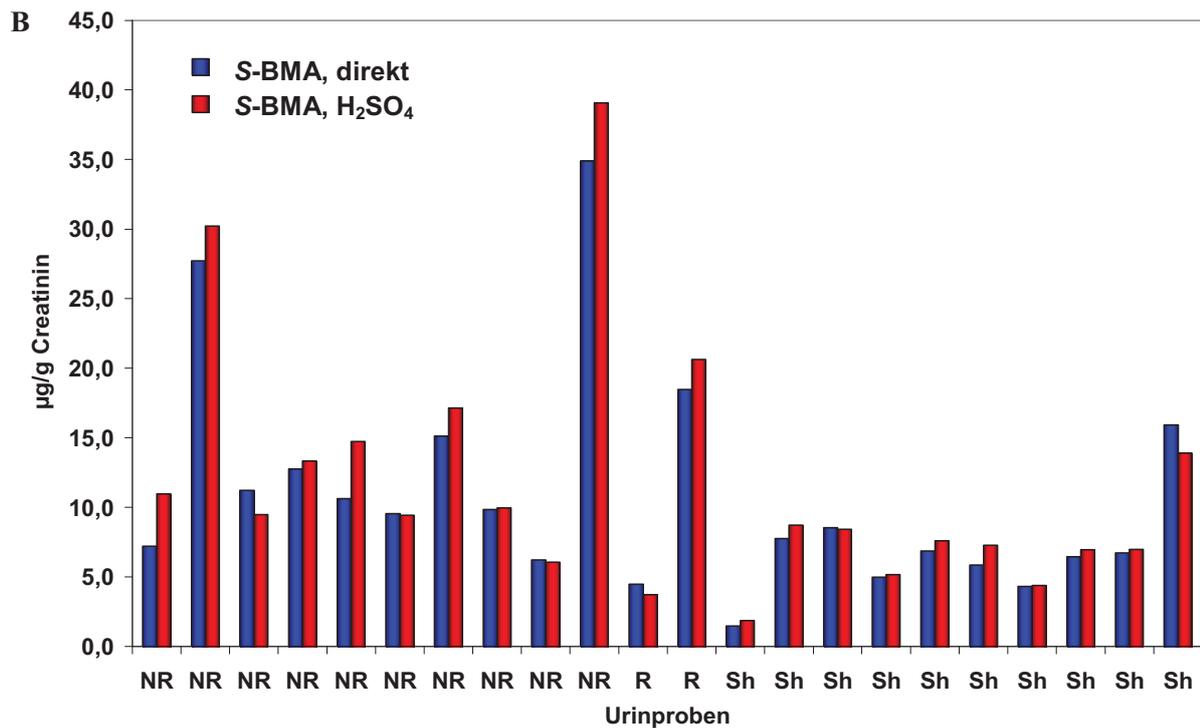
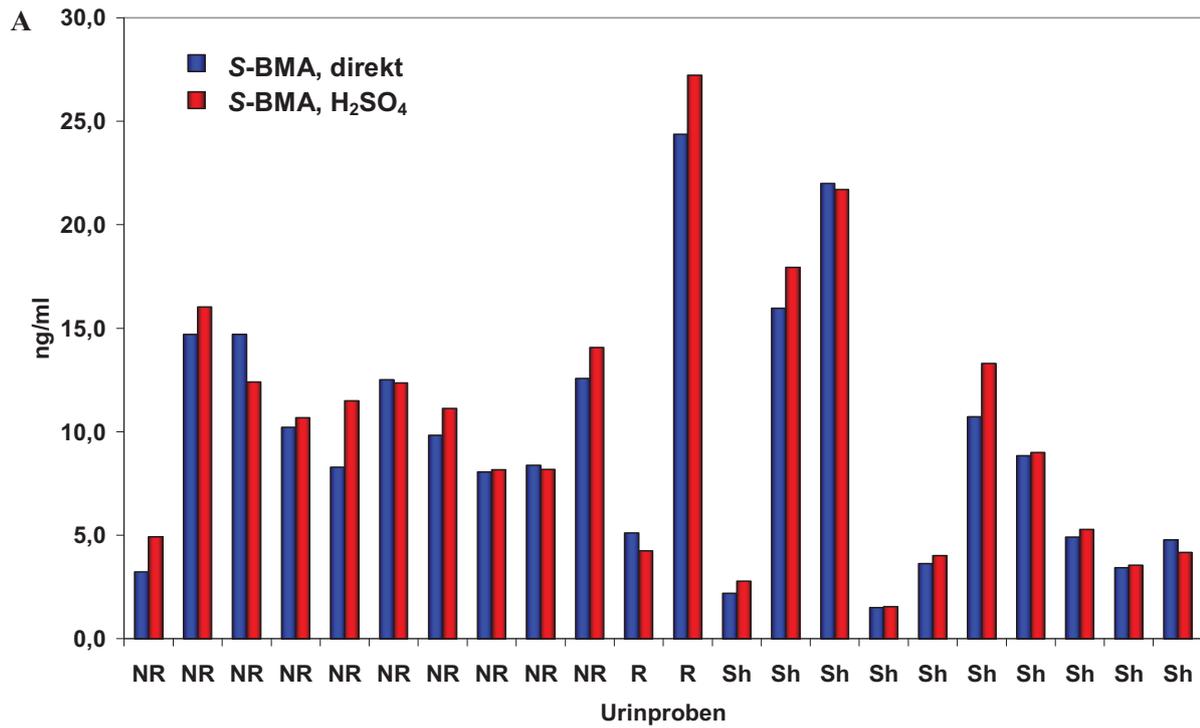


Abbildung 76: S-BMA-Konzentrationen im Urin (A) in ng/ml und (B) in µg/g Creatinin (NR = Nichtraucher, R = Zigaretten-Raucher, Sh = Shisha (Wasserpfeifen)-Raucher)

5 Diskussion

5.1 LC-MS/MS-Methodenetablierung für die Bestimmung der GSH-Konjugate

Die Entwicklung einer sensitiven und selektiven LC-MS/MS-Methode zur Analytik der GSH-Konjugate erlaubte die Untersuchung von Transportvorgängen im Caco-2-Zellsystem. So zeigte sich, dass auch ohne den Einsatz radioaktiver Markierung Untersuchungen zum Transport von GSH-Konjugaten durchgeführt werden können. Bislang waren ähnliche Versuchsansätze überwiegend durch entsprechend markierte Substanzen umgesetzt worden, wie beispielsweise bei Buesen *et al.* (2003). Dort diente ^{14}C -markiertes B[a]P zur Untersuchung des Metabolismus und des Transportes der gebildeten Stoffwechselprodukte von B[a]P im Caco-2-Zellsystem.

Es erwies sich vor allem die SRM-Technik des Massenspektrometers als geeignet zur Bestimmung der Konjugate im Zellextrakt sowie im umgebenden Medium des Zellsystems Caco-2. Darüber hinaus konnte sogar das TranswellTM-System Anwendung für gerichtete Transportuntersuchungen der GSH-Konjugate finden, obgleich die Probenvolumina lediglich 2 ml betragen. Dennoch waren die etablierten Analysenmethoden ausreichend empfindlich zur Quantifizierung der Analyten in diesen geringen Probenmengen. Die erforderlichen Nachweisempfindlichkeiten im sub-ppb-Bereich für die jeweiligen PAK-SG-Konjugate waren jedoch ausschließlich mit dem SRM-Modus zu erzielen, was vorherige Untersuchungen mittels SIM-Modus gezeigt hatten (Kapitel 4.2.1.2).

GSH-Konjugate ergeben aufgrund gemeinsamer Strukturelemente, wie dem Glutathion-spezifischen Fragment m/z 272, reproduzierbar induzierbare Fragmentierungsreaktionen, die für alle untersuchten PAK-SG-Konjugate gleichermaßen zur Messung herangezogen werden konnten. Eine Variation der Kollisionsenergie brachte unterschiedliche Fragmentierungsmuster hervor, die eine Auswahl mehrerer potentieller Fragmente für die Quantifizierung ergab. Die konstante Abspaltung des Fragments m/z 272 vom Molekül-Ion im negativen ESI-Modus zeigte im Gegensatz zu den anderen, ebenfalls reproduzierbar auftretenden GSH-spezifischen Fragmenten, die höchste Signalintensität, welche somit die höchste Detektionsempfindlichkeit der Analyten herbeiführte (Kapitel 10.1.1.1). Dies war insbesondere bei der Bestimmung von Proben mit sehr geringen GSH-Konjugat-Konzentrationen von großer Bedeutung, die beispielsweise bei den Inhibierungsexperimenten mit den Hemmstoffen MK571 und Ko143 hinsichtlich einer konkreten Aussage über die Blockierung des Transportes oder die Verminderung der Transportrate relevant waren.

Eine sinnvolle Ergänzung zum SRM-Modus des Massenspektrometers zeigte der DAU-Modus, welcher eine zusätzliche Aufklärung der GSH-spezifischen Fragmente zuließ. Diese MS/MS-Methode war vor allem bei der Analytik eines potentiellen GSH-Konjugates im Sinne einer Strukturaufklärung von Nutzen. Anwendung fand diese Technik zum Beispiel bei der postulierten Entstehung von GSH-Konjugaten aus den *syn*-Dihydrodiolepidoxiden, auf deren Bildung anhand der entsprechend determinierten Fragmente geschlossen werden konnte (Kapitel 4.3.1.3). Der ebenfalls der Strukturaufklärung dienende PAR-Modus gewährte eine

Rückverfolgbarkeit zum Molekül-Ion anhand eines spezifischen Fragments (Kapitel 4.4.1.1). Dieckhaus *et al.* (2005) hatten bereits über die Möglichkeit der Ermittlung von Ausgangsstrukturen unbekannter Moleküle mit Hilfe eines charakteristischen Fragments im PAR-Modus berichtet. Aufgrund des konstant auftretenden Fragments m/z 272 wäre des Weiteren die Möglichkeit zur Verwendung des CNL-Modus bei Proben mit unbekanntem GSH-Konjugaten gegeben. Im Rahmen eines Screenings könnte auf diese Weise die Gesamtheit der in einer Probe enthaltenen GSH-Konjugate mittels des gemeinsamen Verlustes von m/z 272 ermittelt werden.

Die LC-MS/MS-Analytik erlaubt durch gezieltes Ausblenden nicht relevanter Probenbestandteile beziehungsweise mittels konkreter Auswahl von *Parent*- und *Daughter*-Ion der relevanten Analyten auch eine Messung ohne vorheriges komplexes *Clean-Up* der jeweiligen Probe. Dennoch gilt es zu beachten, dass ko-eluierende Substanzen und Matrixbestandteile konzentrierter biologischer Proben eine vorübergehende Unterdrückung der Ionisierung und damit eine verminderte Signalintensität für die Analyten verursachen können. Um dieses Phänomen der Ionensuppression zu umgehen sowie die – je nach Belastungsgrad – erforderliche Reinigungsprozedur des Massenspektrometers zu minimieren, sollte generell eine effiziente Probenaufarbeitung bei komplexen biologischen Matrizes zum Beispiel mittels SPE durchgeführt werden (King *et al.* 2000; Mallet *et al.* 2001; Muller *et al.* 2002). Nach Constantopoulos *et al.* (1999) sind sowohl Ionensuppression als auch Ionenanreicherung durch konkurrierende Ionisierung zwischen Matrixbestandteilen und Analyten möglich. Eine effiziente chromatographische Trennung mittels hoher Retention (Matuszewski *et al.* 1998) sowie die Verwendung von Isotopen-markierten internen Standards (Jemal *et al.* 2003) bewirken eine Minimierung der Ionensuppression. Ein weiterer förderlicher Effekt ist das Vermeiden einer Überladung der HPLC-Säule durch Anpassung der Probenkonzentrationen (Choi *et al.* 2001). Im Rahmen der Bestimmung der unterschiedlichen PAK-SG-Konjugate wurde jeweils eine effektive Aufreinigung der Analyten mittels der entwickelten SPE erreicht, um Matrixeffekte bei der LC-MS/MS-Messung weitestgehend zu reduzieren. Zudem wurde der strukturell sehr ähnlich wie die Analyten aufgebaute interne Standard 1-MP-SG eingesetzt. Zur Verhinderung einer Ionensuppression war ebenfalls eine hohe Retentionszeit von etwa 13 min für die Trennung der diastereomeren BPD-SG-Konjugate förderlich. Eine verkürzte Retentionszeit hätte außerdem eine unerwünschte Ko-Elution der beiden Isomeren zur Folge gehabt. Beim DBPD-SG war lediglich eine Retentionszeit von etwa 6 min zur Basislinientrennung der beiden Diastereomeren erforderlich, was jedoch als ausreichend hinsichtlich eventueller Matrixeffekte erachtet wurde. Beim BcPheD-SG hingegen war trotz einer hohen Retentionszeit von etwa 17 min keine Basislinientrennung der beiden diastereomeren GSH-Konjugate zu erzielen. Hierbei konnte auch keine Optimierung durch den Zusatz von 0,1 % Ameisensäure zum Elutionsmittel erzielt werden, der bei den BPD-SG- und DBPD-SG-Konjugaten eine deutlich verbesserte Peakschärfe und Signalintensität im Vergleich zu einem reinen Methanol/Wasser-Eluenten bewirkt hatte.

Im Rahmen der Abschätzung von Nachweisgrenzen der GSH-Konjugate in Medium und Zell-extrakt ergaben die mittels XCalibur-Software ermittelten Signal/Rausch (S/N)-Verhältnisse bei bereits starkem Untergrundrauschen des Chromatogramms gelegentlich noch S/N-Verhältnisse größer 3. In der Regel wird in der chromatographischen Analytik ein S/N-Verhältnis von 3 für die Nachweisgrenze vorgesehen (Rinne *et al.* 2007; Dahl *et al.* 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch eine sichere Vorgehensweise bevorzugt und bei zu starkem Untergrundrauschen ein S/N-Verhältnis größer 3 für die jeweilige Nachweisgrenze ausgewählt. Dennoch erwiesen sich die abgeschätzten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen als ausreichend empfindlich für die vorgesehenen Experimente. Sogar die aus dem TranswellTM-System hervorgehenden, lediglich 2 ml Volumen umfassenden Proben, resultierten nach der Aufarbeitungs- und vor allem der Aufkonzentrierungsprozedur in sehr gut auswertbaren Chromatogrammen. So konnten durch Anreicherung der Analyten während der Aufarbeitung der TranswellTM-Medienproben Bestimmungsgrenzen von 0,038 µg/l bei den BPD-SG-Konjugaten erzielt werden (Kapitel 10.1.1.5). Ohne Aufkonzentrierung der Konjugat-Lösungen ließen sich bei Aufgabe auf das LC-MS/MS-System BPD-SG-Konzentrationen von etwa 2,5 µg/l gut detektieren. Dies entspricht bei einem Injektionsvolumen von 20 µl einer absoluten Menge von 0,05 ng. Das Auftreten von Störpeaks konnte durch den sehr spezifischen Einsatz des SRM-Modus vermieden werden.

Bei der Bestimmung der GSH-Konjugate ergab sich nach der Aufarbeitung der Medienproben die Notwendigkeit einer zügigen Messung an der LC-MS, da bei längerer Lagerung des aufgearbeiteten Extraktes bei Raumtemperatur eine Zersetzungsreaktion der Konjugate eintrat. Eine Zersetzungsreaktion im Sinne einer Sulfoxidation ist bereits bei Werner *et al.* (1996) für Mercaptursäuren beschrieben worden. Eine Untersuchung der aufgearbeiteten Proben, die nach dem *Clean-Up* bei Raumtemperatur für drei Tage gelagert worden waren, ergab jedoch aufgrund zu geringer Konzentrationen keinen eindeutigen Nachweis auf das Phänomen der Sulfoxidation. Die untersuchten Medienproben hatten einen pH-Wert von 9, während die Zellextrakte einen pH-Wert von 5 aufwiesen. Bei pH 5 waren die GSH-Konjugate stabil, während im leicht alkalischen Milieu die Bildung von Sulfoxiden aus den GSH-Konjugaten postuliert wurde. Eine Einstellung des pH-Wertes der Medien vor der Aufarbeitung auf den schwach sauren Bereich zeigte eine Lösung der Problematik. Verantwortlich für den Zersetzungsprozess könnte auch die Anwesenheit von Luftsauerstoff in der Probe sein, welcher eine Oxidation des Konjugates begünstigen könnte. Dies kann durch Einleiten von Stickstoff in die aufgearbeitete Probe vor einer Lagerung bei Raumtemperatur vermieden werden. Bei Aufarbeitung der Proben gemäß Kapitel 3.4 und ohne anschließende Lagerung waren Zersetzungsreaktionen jedoch zu vernachlässigen, wofür die im Rahmen der Bestimmung von Wiederfindungsraten (Kapitel 10.1.1.6) und Wiederholbarkeiten (Kapitel 10.1.1.7) erzielten Ergebnisse sprechen.

PAK-SG-Konjugat-Analytik: Aufgrund der im Dünndarm lokalisierten Resorption von Nahrungsbestandteilen ist das Caco-2-Zellmodell als geeignetes System zur Analyse der Resorptionsvorgänge in der gastrointestinalen Barriere allgemein anerkannt (Hidalgo *et al.* 1989; Ebert *et al.* 2005a).

Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass die Detoxifizierung der Dihydrodiole und der Dihydrodiolepoxide der untersuchten PAK anhand der Bildung der entsprechenden GSH-Konjugate im Caco-2-Modell nachgewiesen werden konnte. Diese Feststellung war besonders im Hinblick auf die Entgiftung der ultimalen Kanzerogene (+)-*anti*-BPDE, (-)-*anti*-DBPDE und (-)-*anti*-BcPheDE von großer Bedeutung, da diese Intermediate ein starkes Potential zur Bildung von DNA-Addukten besitzen. So war bereits 1974 von Sims *et al.* (1974) postuliert worden, dass das BPDE der hauptsächlich an die DNA bindende Metabolit des B[a]P ist. Thakker *et al.* konnten diese Hypothese 1977 bestätigen. Ferner zeigte nach Slaga *et al.* (1979) das (+)-*anti*-BPDE die stärkste tumorigene Potenz aller vier möglichen stereoisomeren BPDE-Moleküle.

Generell wurden die GSH-Konjugate der Dihydrodiolepoxide von PAK im TranswellTM-System mit einem Nettoflux in basolateraler Richtung transportiert. Dies bedeutet folglich, dass die in Analogie zum menschlichen Dünndarmepithel aufgebauten Caco-2-Zellen diese Konjugate überwiegend in Richtung Blutkreislauf transportieren und entsprechend der *in-vivo*-Situation nur in geringerem Ausmaß in Richtung Darmlumen.

Untersuchungen zum B[a]P: Beim B[a]P handelt es sich um die Leitsubstanz und den meistuntersuchten Vertreter der PAK, wobei wenige Untersuchungen zur Metabolisierung im Darm vorliegen. Infolge dessen und aufgrund der mit einer hohen biologischen Wirkung assoziierten Struktur-Aktivitäts-Beziehung dieses Bay-Region-PAKs wurden für diese Substanz die umfangreichsten Experimente durchgeführt. Die BPD-SG-Konjugate waren sowohl beim ungerichteten Transportversuch mit Zellkulturflaschen im Zellextrakt und Medium als auch im gerichteten Exkretionsversuch im Rahmen des TranswellTM-Systems gut detektierbar. Aufgrund der höheren Bedeutung der Detoxifizierung des (+)-*anti*-BPDE lag auf den BPD-SG-Konjugaten der *anti*-BPDE-Enantiomere der analytische Schwerpunkt. Zusätzlich wurde jedoch die Bildung der korrespondierenden BPD-SG-Konjugate der *syn*-BPDE-Enantiomere analysiert, welche nicht als Referenzverbindungen zur Verfügung standen. Diese Verbindungen wären jedoch aufgrund identischer m/z-Verhältnisse wie bei den BPD-SG-Konjugaten vom *anti*-BPDE im Zuge der durchgeführten Analysen kdetektiert worden. Aufgrund nicht vorhandener zusätzlicher Peaks konnten aber keine BPD-SG-Konjugate vom *syn*-BPDE nachgewiesen werden. Dies kann einerseits in einer mangelnden Stabilität dieser Konjugate begründet sein. Andererseits sind auch eine fehlende BPD-SG-Konjugat-Bildung aus dem *syn*-BPDE während der Inkubation, möglicherweise aufgrund einer Substratselektivität der involvierten GSTs, oder aber eine wesentlich geringer ausgeprägte Formation im Vergleich zu den korrespondierenden *anti*-Verbindungen denkbar.

Im Falle der weniger stark ausgeprägten Konjugatbildung lägen die Konjugate vom *syn*-BPDE dann unterhalb der Nachweisgrenze.

Generell wurden im Medium höhere Gehalte des Stereoisomeren (7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-BPD-SG im Vergleich zum (7*S*,8*R*,9*R*,10*R*)-BPD-SG gemessen (Kapitel 4.2.1.3), wofür zwei mögliche Erklärungen in Betracht gezogen werden können. Zum einen besteht eine bereits bekannte und von Sundberg *et al.* (1998) beschriebene Selektivität der metabolischen Bildung des (+)-*anti*-BPDE, welches den metabolischen Vorläufer vom (7*R*,8*S*,9*S*,10*S*)-BPD-SG darstellt. Zum anderen ist auch zusätzlich ein stereoselektiver Transport vorstellbar.

Ein erhöhter Efflux ins Medium mit linearem Anstieg der BPD-SG-Konjugate zeigte sich bei Vorinkubation der Caco-2-Zellen mit Oltipraz (Kapitel 4.2.1.3). Nach Ermittlung der BPD-SG-Konjugat-Gehalte im Zellextrakt ergab sich folgender Befund: Ohne vorherige Behandlung mit Oltipraz zeigte sich spätestens ab 24 h Inkubationszeit eine deutliche Konjugatabnahme, was in einer intrazellulären Produkthemmung begründet sein könnte (Srivastava *et al.* 2002), die eine Abnahme der Konjugatbildung herbeiführte und hiermit eine Erklärung für die Plateaubildung beider GSH-Konjugate bei 24 h im Medium lieferte. Nach Oltipraz-Behandlung wiesen die analysierten Zellextrakte zu allen Zeitpunkten relativ konstante Konzentrationen beider GSH-Konjugate auf. Diese Gehalte lagen jedoch deutlich unter denen, die in den Ansätzen ohne Vorbehandlung mit Oltipraz erhalten wurden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine Hemmung der intrazellulären CYP-Aktivität und der damit verminderten Bildung der Dihydrodiolepxide. Eine Produkthemmung wurde im Zellextrakt trotz der postulierten GST-Induktion durch Oltipraz nicht beobachtet. Dies bewirkte auch den kontinuierlichen Efflux der GSH-Konjugate ins Medium, der die nahezu lineare Zunahme der Konjugate im Medium erklärt.

Eine Vorbehandlung der Zellen mit dem BCRP-Inhibitor Ko143 demonstrierte keine Auswirkung auf den BPD-SG-Transport aus der Zelle ins Medium (Kapitel 4.2.1.3). Dies wurde deutlich beim Vergleich der Zellen, die mit und ohne Ko143 behandelt wurden. Die entsprechenden Gehalte an BPD-SG-Konjugaten in den zugehörigen Medienproben waren bei diesen Zellansätzen nahezu identisch. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass der BCRP-Transporter nicht am aktiven Transport der untersuchten GSH-Konjugate beteiligt ist.

Eine Induzierbarkeit des BPD-SG-Transportes im TranswellTM-System konnte wie unter Kapitel 4.2.1.4 aufgeführt, mit Oltipraz, Quercetin und Butyrat erreicht werden.

Zur Klasse der Flavonoide gehörend, ist der gelbe Naturfarbstoff Quercetin in unterschiedlichen Obst- und Gemüsearten enthalten und soll als Polyphenol physiologisch positive Effekte besitzen, unter anderem eine sich aus den antioxidativen Eigenschaften ergebende antikanzerogene Wirkung. Des Weiteren handelt es sich beim Quercetin um eine Substanz, die den *Aryl-Hydrocarbon*-Rezeptor (AhR) zu aktivieren vermag (Ciolino *et al.* 1999), eine schwache Induktion von CYP1A1 zeigt und den Transport von Phase-II-Metaboliten deutlich anregen kann (Ebert *et al.* 2007). Zudem induziert Quercetin eine ARE (*Antioxidative Response Element*)/Nrf2-vermittelte Genexpression (Tanigawa *et al.* 2007).

Die bereits von Ebert *et al.* (2007) festgestellte Anregung des Transportes von Phase-II-Metaboliten durch Quercetin konnte anhand der durchgeführten Experimente auch für GSH-Konjugate bestätigt werden. Im Vergleich zur Kontrollinkubation zeigten die mit Quercetin vorbehandelten Ansätze signifikant gesteigerte GSH-Konjugat-Transportraten. Da Quercetin als Flavonoid in zahlreichen Lebensmitteln enthalten ist, kommt dieser Substanzklasse eine besondere Relevanz bei der Entgiftung von Lebensmittelkontaminanten zu. Die Funktion von Quercetin beim Schutz vor DNA-Schäden konnte von Wilms *et al.* (2005) bei gleichzeitiger Behandlung von humanen Lymphozyten mit B[a]P und Quercetin manifestiert werden. Um die erhaltenen Ergebnisse weiter zu vertiefen, wären zusätzliche Inkubationsexperimente mit anderen Flavonoiden denkbar. Bei Erhalt ähnlicher Resultate ließe sich die Wichtigkeit einer präventiven Ernährung mit flavonoidhaltigen Nahrungsmitteln unterstreichen.

Oltipraz ähnelt strukturell den natürlicherweise in Brassicaceen enthaltenen 1,2-Dithiol-3-thionen. Es wurde ursprünglich zur Bekämpfung des Bilharziose-Erregers *Schistosoma haematobium* entwickelt (Gentilini *et al.* 1980). Oltipraz repräsentiert eine chemopräventive Substanz, die in der Lage ist, CYP1A1 (Le Ferrec *et al.* 2002), CYP1B1 (Ebert *et al.* 2005b) und GST (Clapper und Szarka 1998) zu induzieren. Viele experimentelle Studien an verschiedenen Organen von Tieren haben bisher eine hemmende Wirkung von Oltipraz gegenüber chemisch (zum Beispiel durch PAK) induzierten Tumoren gezeigt (Wattenberg und Bueding 1986; Rao *et al.* 1991; Benson 1993). Für diese protektive Wirkung wird die Induktion von Phase-II-Enzymen wie der GST in Betracht gezogen (Kensler *et al.* 1987; Davidson *et al.* 1990; Benson 1993). Darüber hinaus wird postuliert, dass auch die Glucuronosyltransferase durch die Anwesenheit von Oltipraz induziert wird (Auyeung *et al.* 2003). Nguyen *et al.* (2003) konnten zeigen, dass die Induktion der Phase-II-Enzyme GST und UGT über den AhR sowie über den Transkriptionsfaktor Nrf2 verläuft, der an ein ARE in der regulatorischen Region des jeweiligen *Target* Gens bindet.

Tatsächlich verdeutlichten die unter 4.2.1.4 aufgeführten Resultate, dass eine Vorbehandlung der Zellen mit Oltipraz die Konjugatmenge im Medium und damit die Transportrate signifikant steigern konnte, wodurch der Detoxifizierungsprozess gefördert wurde.

Butyrat ist eine kurzkettige Fettsäure, die bei der Fermentation von Ballaststoffen im Darm entsteht. Kautenburger *et al.* (2005) konnten zeigen, dass die Butyrat-Bildung im menschlichen Darmlumen einen protektiven Effekt durch Reduktion der Überlebensrate transformierter Darmzellen bewirkte. Es ist verantwortlich für gesteigerte Proteinlevel von verschiedenen GST-Isoformen und der gesamten GST-Enzym-Aktivität in HT29-Zellen (Scharlau *et al.* 2009). Eine GST-Genexpression durch Butyrat konnten auch Pool-Zobel *et al.* (2005) nachweisen, weshalb es hinsichtlich einer möglichen Erhöhung der GSH-Konjugat-Transportrate im Rahmen dieser Arbeit zum experimentellen Einsatz gelangte. Im Vergleich zum Kontrollansatz verdeutlichten die signifikant gesteigerten GSH-Konjugatmengen im Medium nach einer Butyrat-Vorinkubation der Caco-2-Zellen den die Detoxifizierung fördernden Einfluss dieser Substanz.

Ein wichtiger Untersuchungsansatz beschäftigte sich zudem mit der Identifizierung der am GSH-Konjugat-Transport beteiligten Transportproteine. Bei Caco-2-Inkubationsansätzen in Zellkulturflaschen hatte eine Vorbehandlung mit Ko143 keinen Effekt gezeigt (Kapitel 4.2.1.3), dennoch sollte dieses Resultat ebenfalls im TranswellTM-System verifiziert werden. Hierfür wurden Vorinkubationen der Caco-2-Zellen mit ausgewählten Transporter-Hemmstoffen durchgeführt. Die Substanz Ko143 stellt ein tetracyclisches Analoges zum Fumitremorgin C (FTC) dar (Allen *et al.* 2002). Das FTC ist ein Inhibitor des BCRP, dem wiederum die Zuständigkeit für den Transport von Phase-II-Metaboliten zugesprochen wird. Aufgrund neurotoxischer Effekte ist das FTC für die Verwendung *in-vivo* nicht geeignet. Die dem FTC analoge Verbindung Ko143 wurde für die Untersuchungen verwendet. Hierbei wurde postuliert, dass Ko143 die Fähigkeit besitzt, den Transport der BPD-SG-Konjugate aus der Zelle in das umgebende Medium zu unterbinden beziehungsweise zu reduzieren. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden Medien untersucht, deren Zellen vor der Zugabe des Inkubationsagens 7,8-Diol-B[a]P mit Ko143 vorinkubiert worden waren. Als Vergleich dienten mit DMSO vorinkubierte Mediumproben. Auf diese Weise sollte sich zeigen, ob bei Behandlung mit Ko143 der Transport der B[a]P-Metaboliten ins Medium reduziert oder auch vollständig gehemmt werden konnte.

Als weiterer Hemmstoff wurde MK571 verwendet, wobei es sich um einen Inhibitor für die MRP-Transporter handelt.

Im Rahmen der Inhibitionsversuche mit den genannten Hemmstoffen konnte gezeigt werden, dass nicht das BCRP, sondern die Klasse der MRPs bei der Exkretion der BPD-SG-Konjugate involviert ist (Kapitel 4.2.1.5). Mittels konzentrationsabhängiger Vorinkubation der Caco-2-Zellen mit 5 μM MK571 bis 50 μM MK571 konnte belegt werden, dass bei Konzentrationen von 5 μM und 10 μM eine Reduzierung des BPD-SG-Transportes und bei Konzentrationen von 25 μM und 50 μM eine vollständige Blockierung des Transportes erzielbar waren (Daten nicht gezeigt). Da der Transport in höherem Maße in basolateraler Richtung erfolgte, ergab sich die Möglichkeit, dass der MRP1 und/oder der MRP3 als verantwortliche Transporter in Frage kamen. MRP2 hingegen besaß aufgrund seiner Lokalisation in der apikalen Membran nur eine geringfügige Bedeutung. Aufgrund nicht vorhandener spezifischer Hemmstoffe für MRP1 und MRP3 ließ sich der verantwortliche Transporter mittels Inhibitionsexperimenten nicht verifizieren. Jedoch konnte mithilfe von im BfR hergestellten Caco-2 *knockdown*-Klonen belegt werden, dass bei Abwesenheit des MRP1 die Konjugat-Transportrate in basolateraler Richtung stark reduziert ist (Daten nicht gezeigt). Daher ergaben sich Hinweise, dass der MRP1 das hauptverantwortliche Transportprotein für die Exkretion der BPD-SG-Konjugate darstellt. Zusätzlich konnte im Rahmen dieses Experimentes der MRP2 als apikal verantwortlicher Transporter für die BPD-SG-Konjugate vermutet werden (Abb. 77).

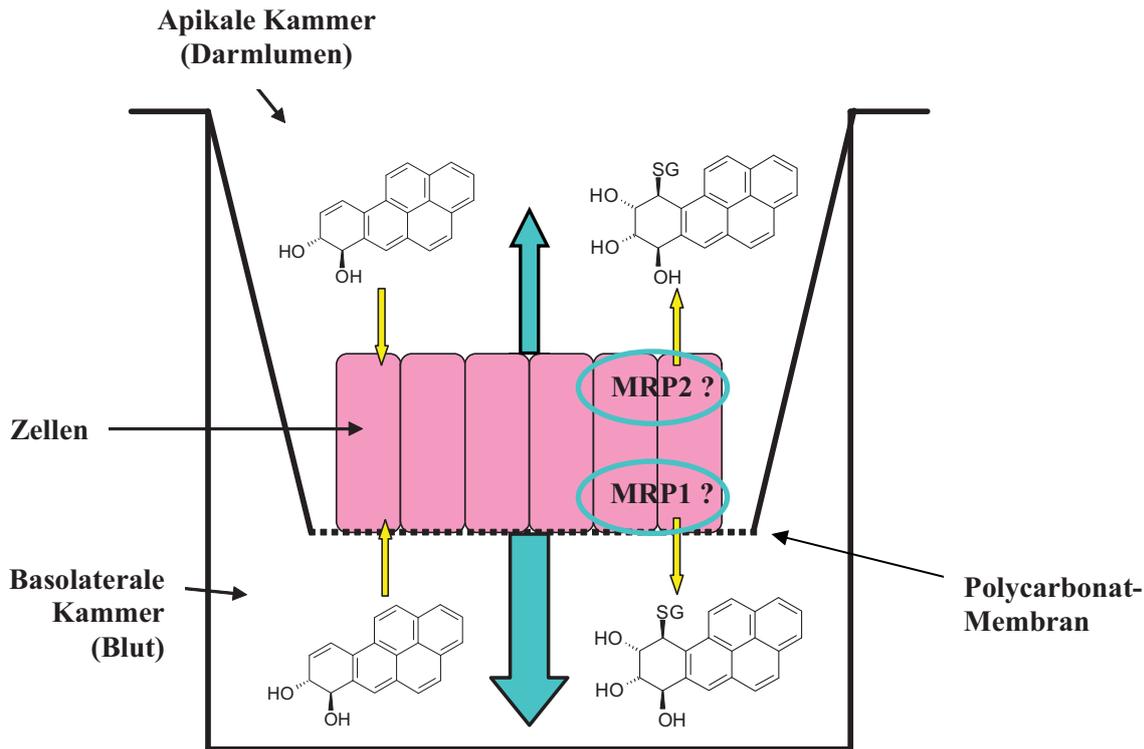


Abbildung 77: Caco-2 Transwell™-System, Zugabe von 7,8-Diol-B[a]P in die apikale und die basolaterale Kammer mit anschließender Bildung und MRP-vermitteltem Transport der nachgewiesenen BPD-SG-Konjugate. Es bestehen Hinweise, dass der Transport durch MRP1 in basolateraler und durch MRP2 in apikaler Richtung erfolgt.

Als ergänzendes Experiment zeigten die mit (\pm)-*anti*-BPDE ausgeführten Inkubationen, dass auch bei einer gezielten Eliminierung des Reaktionsschrittes vom 7,8-Diol-B[a]P zum BPDE die basolateral transportierten BPD-SG-Konjugate den bedeutenderen Anteil ausmachten. Darüber hinaus war keine Diskriminierung hinsichtlich der Bildung eines der beiden BPD-SG-Konjugate vorhanden (Kapitel 4.2.1.6), so wie es bei entsprechenden Inkubationen mit DBPDE beobachtet werden konnte (Kapitel 4.3.1.4). Aufgrund der begrenzten Halbwertszeit des BPDE von 4 min in wässriger Lösung (Glatt *et al.* 1991) kam für den überwiegenden Anteil der Inkubationsversuche das deutlich stabilere 7,8-Diol-B[a]P zum Einsatz.

Die BPDE-Inkubation der Caco-2-Zellen ergab höhere Gehalte an BPD-SG-Konjugaten im Medium als die analoge Inkubation mit 7,8-Diol-B[a]P, wobei jeweils ein Vergleich mit der eingesetzten Menge an Inkubationsagens erfolgte. Die Inkubation mit 7,8-Diol-B[a]P setzt eine zusätzliche CYP-vermittelte Oxidation zum BPDE voraus, wobei diese Umsetzung auch durch parallel ablaufende Metabolisierungsprozesse gestört sein kann. Eine direkte Inkubation mit BPDE beinhaltet aufgrund einer größeren Menge an verfügbarem BPDE ein höheres Potential einer Detoxifizierungsreaktion mit Glutathion. Anhand dieser Ausführungen lässt sich die leicht erhöhte Bilanz der Bildung von BPD-SG-Konjugaten von etwa 1,1 % nach einer BPDE-Inkubation verglichen mit etwa 0,2 % nach einer 7,8-Diol-B[a]P-Inkubation deuten. Die hohe Reaktivität des Dihydrodiolepoxids könnte zudem weitere Reaktionen, wie

die spontane Umsetzung zum Tetrol oder Bindungen an Zellbestandteile bewirken, so dass die Konjugationsreaktionen mit Glutathion limitiert sind.

Die Zellinkubation mit dem Mutterkohlenwasserstoff B[a]P diente zur Überprüfung der metabolischen Kompetenz der Caco-2-Zellen bezüglich der Aktivierung des B[a]Ps. Von Bedeutung waren eine Erweiterung des Metabolitenprofils dieses PAKs sowie die Abschätzung der Bildung des 7,8-Diol-B[a]Ps, welches die direkte metabolische Vorstufe des ultimal kanzerogenen (+)-*anti*-BPDE darstellt. Im Rahmen dieser Inkubationsexperimente konnte gezeigt werden, dass die phenolischen Hauptmetaboliten das 1-OH-B[a]P und das 3-OH-B[a]P sowie in leicht untergeordnetem Maße das 9-OH-B[a]P beziehungsweise ihre korrespondierenden Sulfate oder Glucuronide waren (Kapitel 4.2.2.1). Dies ließ sich sowohl im Zellextrakt als auch im Medium beobachten, so dass von einem der Bildungsrate entsprechenden Abtransport der Metaboliten ausgegangen werden kann. Bezüglich des B[a]P-Metabolismus konnten bereits Selkirk *et al.* (1976) in Rattenleber-Mikrosomen belegen, dass generell 3- und 9-Phenol neben 1- und 7-Phenol die Hauptmetaboliten darstellen. Eine weitere Übereinstimmung der erhaltenen Ergebnisse ergab sich mit Literaturdaten von Buesen *et al.* (2003). Diese Daten zeigten auf, dass B[a]P im Caco-2-Zellsystem überwiegend zu sehr polaren Metaboliten verstoffwechselt wird, welche sich im Zellüberstand nachweisen lassen. Das für die Bildung von (+)-*anti*-BPDE relevante 7,8-Diol-B[a]P wies im Zellextrakt sowie im Medium verglichen mit den phenolischen Metaboliten lediglich geringe Konzentrationen auf. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine schnell erfolgende Weiteroxidation zum reaktiven BPDE und dessen Bindung an Zellbestandteile sein. Ebenfalls möglich wäre eine Umsetzung des BPDE zum 7,8,9,10-Tetrol-B[a]P, dessen Konzentration bis zu einer Inkubationszeit von 72 h im Zellextrakt kontinuierlich anstieg. Dieser Mechanismus entspräche ebenso einer Detoxifizierungsreaktion, da das hydrophilere Tetrol-B[a]P ausgeschieden werden könnte, ohne dass es zum Beispiel zur Bildung von DNA-Addukten kommen könnte. Alternativ wäre auch die Entgiftung des aus dem 7,8-Diol-B[a]P hervorgehenden (+)-*anti*-BPDE über eine Bildung von BPD-SG-Konjugaten denkbar. Da jedoch bei der Untersuchung auf die Bildung von BPD-SG-Konjugaten von mit B[a]P inkubierten Caco-2-Zellen keine Konjugate detektierbar waren (Kapitel 4.2.2.3), kann dieser Entgiftungsmechanismus hierbei nicht primär in Betracht gezogen werden. Allerdings zeigte sich in einer zusätzlich durchgeführten Stabilitätsuntersuchung, dass das 7,8-Diol-B[a]P bei einer für die enzymatische Spaltung mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase erforderlichen 16-stündigen Behandlung bei 38 °C nicht vollständig stabil war. Daraus lässt sich folgern, dass die Analyse von Zellextrakt und Medium wahrscheinlich etwas verringerte 7,8-Diol-B[a]P-Konzentrationen ergab als ursprünglich durch die Inkubation gebildet worden waren. Demzufolge erscheint die direkte Inkubation der Caco-2-Zellen mit 7,8-Diol-B[a]P als besser geeignete Variante, um den BPD-SG-Entstehungs- und Transportmechanismus im Zellsystem Caco-2 nachvollziehen zu können.

Eine potentielle Induktion des B[a]P-Metaboliten-Transportes wurde analog dem BPD-SG durchgeführt. Neben der Vorbehandlung mit Quercetin, Oltipraz und Butyrat kam ferner noch

B[k]F als Induktor zum Einsatz, da für diese Substanz eine starke Induktion von CYP1A1 und CYP1B1 nachgewiesen wurde (Schmoldt *et al.* 1981; Lampen *et al.* 2004; Spink *et al.* 2008). Quercetin bewirkte eine signifikante Erhöhung der 1- und 3-Phenol-Konzentrationen im Zellextrakt. Oltipraz-Vorinkubationen ergaben eine leicht gesteigerte intrazelluläre Bildung von 3-OH-B[a]P. Butyrat hatte keine erhöhten B[a]P-Metaboliten-Konzentrationen zur Folge, während B[k]F lediglich den Transport von 3-OH-B[a]P ins Medium förderte. Ferner führte die Oltipraz-Vorbehandlung zu einem signifikant gesteigerten Transport der 1- und 3-Phenole ins Medium, die nach Ebert *et al.* (2005a) mit einer Induktion der BCRP-Genexpression assoziiert sein könnte. Oltipraz und Quercetin hatten einen bereits von Ebert *et al.* (2005b und 2007) für das B[a]P-3-sulfat beschriebenen förderlichen Effekt für die Detoxifizierung.

Untersuchungen zum DB[a,l]P: Der Detoxifizierung des DBPDE kommt eine besondere Bedeutung zu, da diese Substanz aufgrund ihrer Fjord-Region-Struktur ein noch stärker kanzerogenes Potential aufweist als das BPDE (Devanesan *et al.* 1990; Jacob *et al.* 1999; Luch 2009). Hierbei ist anzuführen, dass die Stereochemie des ultimal kanzerogenen (+)-*anti*-BPDE der des (-)-*anti*-DBPDE entspricht.

Eine Detektion der DBPD-SG-Konjugate vom (\pm)-*anti*-DBPDE konnte sowohl beim ungerichteten Transportversuch mit Zellkulturflaschen im Zellextrakt und Medium als auch im gerichteten Exkretionsversuch im Rahmen des TranswellTM-Systems erzielt werden. Die für die BPD-SG-Konjugate etablierten massenspektrometrischen Parameter ließen sich auf die entsprechenden DBPD-SG-Konjugate gut übertragen. Ein analytischer Schwerpunkt wurde auf die DBPD-SG-Konjugate vom *anti*-DBPDE gelegt. Ergänzend wurde auch die Bildung der korrespondierenden DBPD-SG-Konjugate vom *syn*-DBPDE untersucht, welche als Referenzverbindungen nicht verfügbar waren. Anhand identischer m/z-Verhältnisse wie bei den DBPD-SG-Konjugaten aus dem *anti*-DBPDE konnte hierbei ein zusätzlicher Peak ko-detektiert werden (Kapitel 4.3.1.3). Im Gegensatz zum BPD-SG scheint beim DBPD-SG ein stabiles Konjugat vom *syn*-Dihydrodiolepoxid gebildet zu werden, wofür eine weniger stark ausgeprägte Selektivität zwischen *anti*- und *syn*-Isomer der involvierten GSTs verantwortlich sein könnte. Eine ebenfalls in Betracht zu ziehende Möglichkeit wäre eine höhere Stabilität und/oder weniger ausgeprägte Reaktivität des *syn*-DBPDE und den daraus hervorgegangenen DBPD-SG-Diastereomeren im Vergleich zum *syn*-BPDE und den korrespondierenden BPD-SG-Diastereomeren.

Im Gegensatz zum TranswellTM-System-Versuch (Abb. 51) zeigten die Medienproben des ungerichteten Transportversuches (Abb. 50) höhere Konzentrationen an (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG als an (11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG im Falle einer (\pm)-*anti*-DBPDE Behandlung. Bei (\pm)-*trans*-11,12-Diol-DB[a,l]P-Inkubationen wiesen die Medienproben mehr (11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG als (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG auf. Demzufolge könnte der "normale" Metabolismusweg über das (\pm)-*trans*-11,12-Diol-DB[a,l]P und den anschließenden Hauptmetaboliten (11*R*,12*S*,13*S*,14*R*)-DBPDE zum (11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG ablaufen

(Abb. 78). Eine Abweichung von diesem Weg könnte jedoch durch die direkte Zugabe von (\pm)-*anti*-DBPDE ausgelöst werden, da in diesem Fall der normale Metabolismusweg aufgrund eines Substratüberschusses blockiert sein könnte. Als Ergebnis wäre die Bildung des (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG der bevorzugte Metabolismusweg. Basierend auf der Tatsache, dass die Metabolisierung des 11,12-Diol-DB[*a,l*]P im Darm größtenteils zum (-)-*anti*-DBPDE erfolgt, wird dieser Metabolit im Anschluss zum (11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG reagieren. Bei *in-vitro*-Inkubationen jedoch könnte das racemische (\pm)-*anti*-DBPDE aufgrund eines höheren Anteils an (+)-*anti*-DBPDE als Vorläufer mehr (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG ergeben.

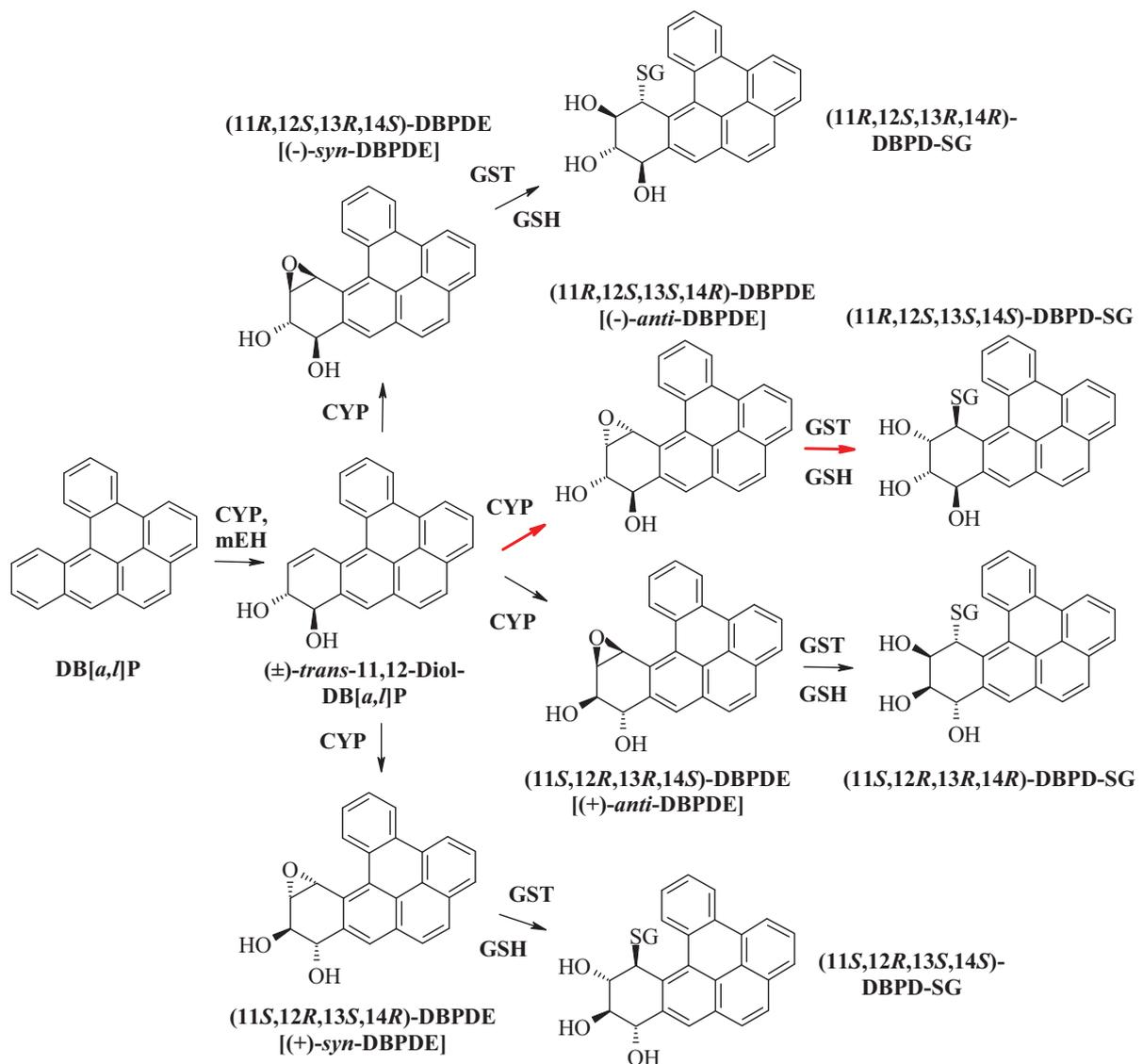


Abbildung 78: Bildung von (11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG aus (-)-*anti*-DBPDE und (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG aus (+)-*anti*-DBPDE sowie von (11*R*,12*S*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG aus (-)-*syn*-DBPDE und (11*S*,12*R*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG aus (+)-*syn*-DBPDE ausgehend vom DB[*a,l*]P. Der postulierte "normale" metabolische Hauptweg der GSH-Konjugat-Bildung vom *anti*-DBPDE ist durch rote Reaktionspfeile gekennzeichnet.

Eine Bilanzierung der Bildung von DBPD-SG-Konjugaten aus 11,12-Diol-DB[*a,l*]P beziehungsweise aus DBPDE in Caco-2-Zellen zeigte eine höhere Bildungsrate zugunsten der

DBPDE-Inkubation. Während Inkubationen mit DBPDE etwa 7,6 % an DBPD-SG-Konjugaten im Vergleich zur eingesetzten Menge an Inkubationsagens ergaben, brachten Ansätze mit 11,12-Diol-DB[*a,l*]P nur etwa 0,3 % der GSH-Konjugate hervor. Wie auch bei den BPD-SG-Konjugaten kann dieses Ergebnis mit einer größeren Menge an verfügbarem Dihydrodiolepoxid für die Konjugationsreaktion mit Glutathion – im Falle der DBPDE-Inkubation der Zellen – interpretiert werden. Im Vergleich zur Inkubation mit BPDE zeigte die Behandlung der Zellen mit DBPDE außerdem einen etwa 7-fach erhöhten Umsatz zu den GSH-Konjugaten. Diese effektivere Bilanz lässt sich vermutlich auf eine stärker ausgeprägte Stabilität des DBPDE aufgrund der Fjord-Region-Struktur verglichen mit der instabileren Bay-Region-Struktur des BPDE zurückführen.

Um die metabolische Kompetenz der Caco-2-Zellen abschätzen zu können und das Metabolitenprofil zu ergänzen, wurden zusätzlich Inkubationen mit dem Mutterkohlenwasserstoff DB[*a,l*]P durchgeführt. Darüber hinaus sollte so die Bildung des 11,12-Diol-DB[*a,l*]P als direkte metabolische Vorstufe des ultimal kanzerogenen (-)*anti*-DBPDE erfasst werden. Diese Inkubationsexperimente brachten als Hauptmetaboliten das 11,12-Diol-DB[*a,l*]P im Zellextrakt hervor (Kapitel 4.3.2.2). Da gleichzeitig jedoch kein 11,12,13,14-Tetrol-DB[*a,l*]P nachzuweisen war, konnte ein Entgiftungsschritt des 11,12-Diol-DB[*a,l*]P und seines metabolischen Nachfolgers DBPDE über das Tetrol nicht in Erwägung gezogen werden. Demzufolge erhält die Detoxifikation im Rahmen der DBPD-SG-Bildung eine wichtige Bedeutung. Der ergänzende qualitative Nachweis der mit DB[*a,l*]P inkubierten Caco-2-Zellen auf DBPD-SG konnte anschließend tatsächlich den Nachweis der Bildung von DBPD-SG-Konjugaten erbringen (Kapitel 4.3.2.5). Interessanterweise ergab sich bei Inkubationen mit B[*a*]P ein dem DB[*a,l*]P inverses Bild: Hierbei ließ sich eine Detoxifizierung über das entsprechende 7,8,9,10-Tetrol, nicht jedoch die Bildung der BPD-SG-Konjugate beobachten.

Bezüglich der in Ergänzung ausgeführten Induktionsversuche mit Quercetin, Oltipraz, Butyrat und B[*k*]F zeigte sich hauptsächlich mit B[*k*]F ein apikal signifikant gesteigerter Metaboliten-Transport, wobei insbesondere die starke Exkretion des 7-OH-DB[*a,l*]P zu nennen ist. Oltipraz konnte signifikant erhöhte apikale und basolaterale Transporte aller nachweisbaren Metaboliten herbeiführen (Kapitel 4.3.2.3). Quercetin zeigte geringfügig verstärkte Exkretionsraten von 7-OH-DB[*a,l*]P in apikaler Richtung sowie einen signifikant erhöhten Transport von 11,12-Diol-DB[*a,l*]P in basolateraler Richtung. Daraus lässt sich folgern, dass Quercetin als Vertreter der Flavonoide einen schwach ausgeprägten Einfluss auf die Induktion der involvierten Transportproteine ausüben kann. Folglich kann postuliert werden, dass eine flavonoidreiche Ernährung einen geringen Beitrag zu den beschriebenen Transportvorgängen der DB[*a,l*]P-Phase-I-Metaboliten und des Phase-II-Sulfates leistet. Dennoch wären umfangreichere Experimente mit zusätzlichen Flavonoiden erforderlich, um konkrete Aussagen hinsichtlich exkretionsfördernder Auswirkungen treffen zu können. Das im Darm aus Ballaststoffen entstehende Fermentationsprodukt Butyrat zeigte ebenfalls den Effekt einer signifikant gesteigerten basolateralen 11,12-Diol-DB[*a,l*]P-Transportrate.

Die Transportproteine der DB[a,l]P-Metaboliten konnten des Weiteren in einem zusätzlichen Experiment anhand zugesetzter Hemmstoffe identifiziert werden (Kapitel 4.3.2.4). Frühere Ergebnisse hatten gezeigt, dass in der Caco-2-Zelllinie Benzo[a]pyren-3-sulfat und Benzo[a]pyren-3-glucuronid apikal vom BCRP transportiert werden (Ebert *et al.* 2005b). Aufgrund der exklusiven Nachweisbarkeit von 7-OH-DB[a,l]P beziehungsweise DB[a,l]P-7-sulfat in den apikalen Kompartimenten des TranswellTM-Systems ergab sich die Annahme, dass das BCRP hierbei aufgrund seiner Lokalisation in der apikalen Membran ebenfalls als Haupttransporter wirken könnte. Folglich sollte überprüft werden, ob die Metaboliten 8,9- und 11,12-Diol-DB[a,l]P sowie 7-OH-DB[a,l]P beziehungsweise DB[a,l]P-7-sulfat den Substraten des BCRP-Transporters angehörten. Die Ergebnisse zeigten, dass der BCRP-spezifische Inhibitor Ko143 einen Effekt auf den DB[a,l]P-7-sulfat-Transport hatte, da eine reduzierte Metabolitenkonzentration im Vergleich zur Kontrollinkubation vorlag. Folglich konnte das BCRP als involvierter Transporter bei der Exkretion des 7-OH-DB[a,l]P beziehungsweise seines Sulfatkonjugates identifiziert werden. Andererseits zeigte Ko143 keinerlei Effekt auf den Transport von 8,9- und 11,12-Diol-DB[a,l]P ins Medium, so dass das BCRP nicht an dem Transport dieser Metaboliten beteiligt sein konnte. Die aus den Vorinkubationen mit MK571 erhaltenen Ergebnisse zeigten eine signifikante Abnahme oder sogar die komplette Inhibierung des Transportes in die apikalen und basolateralen Kompartimente aller analysierten Metaboliten. Daher konnten die MRP-Transporter als hauptverantwortliche Transportproteine bezüglich der untersuchten Metaboliten identifiziert werden. Nach erfolgter MK571-Vorinkubation war ausschließlich noch ein 7-OH-DB[a,l]P-Peak in den zugehörigen Proben detektierbar. Diese Beobachtung müsste folglich das Ergebnis der weiterhin vorhandenen BCRP-Aktivität sein.

Untersuchungen zum B[c]Phe: Als Strukturanaloges zum DB[a,l]P und Vertreter der Gruppe 2B der PAK-Klassifikationsgruppen gemäß der IARC (Kapitel 1.2) wurde das B[c]Phe für weitere Caco-2-Zellinkubationen verwendet. Obgleich das B[c]Phe ein schwach kanzerogener PAK ist, weist das durch Metabolisierung entstehende Dihydrodiolepoxid (-)-*anti*-BcPheDE ein stark kanzerogenes Potential auf (Levin *et al.* 1980; Jacob *et al.* 1999). Hierbei entspricht die Konfiguration des (-)-*anti*-BcPheDE den ultimal kanzerogenen Substanzen (+)-*anti*-BPDE und (-)-*anti*-DBPDE.

Grundsätzlich war für die Quantifizierung der BcPheD-SG-Konjugate ebenfalls die LC-MS/MS-Methode im SRM-Modus geeignet. Allerdings waren Abwandlungen zu den Methoden der BPD-SG- und der DBPD-SG-Bestimmungen erforderlich. So zeichnete sich trotz vorhandener GSH-spezifischer Fragmente bei negativer ESI-Ionisierung ab, dass eine Messung im positiven Ionisierungsmodus höhere Signalintensitäten ergeben würde. Dabei konnten durch Variation der Kollisionsenergie unterschiedliche Fragmentierungsmuster produziert werden, deren Fragment m/z 308 die höchste Signalintensität verzeichnete und

infolgedessen als *Daughter*-Ion für den SRM-Modus selektiert wurde. Bei dem ausgewählten Fragment m/z 308 handelt es sich um das protonierte Glutathion-Molekül.

Im Gegensatz zur BPD-SG- sowie zur DBPD-SG-Bestimmung konnte bei der Analytik der BcPheD-SG-Referenzverbindungen jedoch trotz chromatographischer Optimierungen keine Basislinientrennung der beiden Peaks erreicht werden. Aufgrund vergleichsweise breiter BcPheD-SG-Peaks waren auch die Nachweisgrenzen weniger empfindlich als im Falle der BPD-SG- und DBPD-SG-Analyten. Da das B[c]Phe allerdings ausschließlich als ein die Xenobiotika B[a]P sowie DB[a,l]P ergänzendes PAK-Inkubationsagens für wenige ausgewählte Experimente eingesetzt wurde, konnten die etablierten chromatographischen und massenspektrometrischen Parameter als ausreichend erachtet werden.

Eine Besonderheit im Falle der B[c]Phe-Inkubationen verursachten die Ergebnisse aufgrund des alleinigen Auftretens eines der beiden BcPheD-SG-Konjugate. In sämtlichen untersuchten Proben ließ sich nach Inkubation mit 3,4-Diol-B[c]Phe oder aber (\pm)-*anti*-BcPheDE ausschließlich das (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)-BcPheD-SG detektieren, das aus dem ultimal kanzerogenen ($-$)-*anti*-BcPheDE entsteht. Das (1*R*,2*R*,3*R*,4*S*)-BcPheD-SG war hingegen nicht nachweisbar. Eine mögliche Erklärung könnte in einem stereoselektiven Transport des (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)-BcPheD-SG begründet sein, da Abbildung 67 einzig dieses Diastereomer im Medium zeigt. Dagegen spricht allerdings das in Abbildung 68 dargestellte Resultat, welches auch im Zellextrakt kein (1*R*,2*R*,3*R*,4*S*)-BcPheD-SG aufweist. Demzufolge wäre eine GST-bedingte Selektivität bei der Bildung der Konjugate vorstellbar, wobei eine stereoselektive Diskriminierung allein das (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)-BcPheD-SG bilden würde. Die dem B[c]Phe strukturanaloge Substanz DB[a,l]P zeigte – je nach Inkubationsagens (11,12-Diol-DB[a,l]P oder DBPDE) – eine stereoselektive Bildung ihrer GSH-Konjugat-Diastereomere. Dennoch ließen sich im Gegensatz zum B[c]Phe beide DBPD-SG-Konjugate nachweisen.

Grundsätzlich war die untersuchte Detoxifizierung des (\pm)-*trans*-3,4-Diol-B[c]Phe beziehungsweise des (\pm)-*anti*-BcPheDE aufgrund der Formation des GSH-Konjugates erfolgreich und ungeachtet chromatographischer Einschränkungen gut nachweisbar.

Die Bilanzierung der GSH-Konjugat-Bildung aus 3,4-Diol-B[c]Phe beziehungsweise aus BcPheDE in Caco-2-Zellen ergab eine höhere Bildungsrate bei der BcPheDE-Inkubation. Während mit BcPheDE behandelte Zellen etwa 50 % an GSH-Konjugaten im Vergleich zur eingesetzten Menge an Inkubationsagens im Medium aufwiesen, zeigten mit 3,4-Diol-B[c]Phe inkubierte Zellen nur etwa 0,4 % an BcPheD-SG-Konjugaten in den Medienproben. Dieses Ergebnis kann, wie bei den Ausführungen zu den GSH-Konjugaten vom BPDE und vom DBPDE, ebenfalls mit einer größeren Menge an verfügbarem Dihydrodiolepoxid für die Konjugationsreaktion mit Glutathion bei der direkten BcPheDE-Inkubation erklärt werden. Die effektive Umsetzungsrate vom BcPheDE zum Glutathionkonjugat von 50 % kann zudem auf eine hohe chemische Stabilität kombiniert mit einer Fjord-Region-Stabilisierung des BcPheDe und möglicherweise auch auf eine stärker ausgeprägte Affinität zum Glutathion im Vergleich zu den entsprechenden Dihydrodiolepoxiden vom B[a]P und DB[a,l]P zurückgeführt werden.

In Ergänzung erfolgten Inkubationen mit dem Mutterkohlenwasserstoff B[c]Phe zur Bewertung der metabolischen Kompetenz der Caco-2-Zellen, die als Hauptmetaboliten die Dihydrodiol 5,6-Diol-B[c]Phe und 3,4-Diol-B[c]Phe erzeugten. Bereits 1983 konnte von Ittah *et al.* mittels *in-vitro*-Studien mit den aus Rattenleber erhaltenen Cytochrom-P450-Isoformen CYP2A, CYP2B1 und CYP1A1 zum Ausdruck gebracht werden, dass B[c]Phe bevorzugt in der 5,6-Position metabolisiert wird. Seidel *et al.* (1998) konnten den Nachweis erbringen, dass unter anderem die humanen Isoformen CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 sowohl die 5,6- als auch die 3,4-Dihydrodiol vom B[c]Phe generieren. Diese Daten stimmen mit den in Abbildung 70 aufgeführten Ergebnissen überein. Besonderes Interesse galt der Bildung des 3,4-Diol-B[c]Phe als metabolischem Vorläufer des kanzerogenen BcPheDE. Das 3,4-Diol-B[c]Phe repräsentierte im Zellextrakt neben dem 5,6-Diol-B[c]Phe den Hauptmetaboliten, im Medium hingegen war der Metabolit nicht detektierbar. Dieser Befund lässt auf einen fehlenden Transport aus dem Zellinneren in das umgebende Medium schließen.

Durch eine ergänzende Untersuchung der mit B[c]Phe inkubierten Caco-2-Zellen auf BcPheD-SG konnte abschließend die Bildung des Konjugates nachgewiesen werden (Kapitel 4.4.2.2). Hierbei ergab sich ein dem DB[a,l]P analoges Bild: Während die Detoxifizierung über das BcPheD-SG-Konjugat gezeigt werden konnte, ließ sich eine Bildung des entsprechenden 1,2,3,4-Tetrol-B[c]Phe nicht detektieren. Daraus lässt sich ableiten, dass die beiden Fjord-Region-PAK DB[a,l]P und B[c]Phe bezüglich der aufgezeigten Entgiftungsreaktionen – ausgehend vom jeweiligen Mutterkohlenwasserstoff – übereinstimmen. Im Gegensatz dazu zeigt der Bay-Region-PAK B[a]P nur nach Inkubationen der Zellen mit 7,8-Diol-B[a]P oder BPDE eine nachweisbare Bildung von BPD-SG-Konjugaten, nicht jedoch nach Inkubationen mit dem Mutterkohlenwasserstoff. B[a]P-Inkubationen der Zellen führen hingegen zur Formation des entsprechenden 7,8,9,10-Tetrols. Infolge dieser Beobachtungen könnte auf eine strukturspezifische Selektivität zwischen Fjord- und Bay-Region-PAK hinsichtlich der Metabolitenbildung Tetrol und GSH-Konjugat geschlossen werden. Abschließend sollten diesbezüglich jedoch noch weitere PAK in die Untersuchungen integriert werden, um eine verlässlichere Aussage treffen zu können.

Zusammenfassend dokumentieren die für alle drei PAK B[a]P, DB[a,l]P und B[c]Phe ermittelten Befunde, dass nach Inkubationen der Caco-2-Zellen mit den jeweiligen Dihydrodiolen oder aber Dihydrodioloxiden eine Detoxifizierung über die Bildung der GSH-Konjugate sowie deren Transport aus den Caco-2-Zellen gegeben ist. Nach Behandlung der Zellen mit den Mutterkohlenwasserstoffen erfolgen ebenfalls Entgiftungsmechanismen über die Bildung der GSH-Konjugate oder Tetrole. Die Untersuchungen konnten für die bislang noch nicht ausreichend im Darmmodell analysierten Substanzen B[a]P, DB[a,l]P und B[c]Phe relevante Stoffwechselwege aufzeigen.

Darüber hinaus verdeutlichen die Ergebnisse, dass der Detoxifizierungsprozess durch Lebensmittelinhaltsstoffe wie Flavonoide stimulierbar ist. Hieraus ergibt sich – möglicherweise auch für weitere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe – ein ernährungsrelevanter Aspekt.

5.2 LC-MS/MS-Methodenetablierung für die Bestimmung der Mercaptursäuren

In Anlehnung an die analytische Bestimmung von GSH-Konjugaten konnte eine geeignete Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis der Mercaptursäuren vom kanzerogenen Benzol (*S*-Phenylmercaptursäure, *S*-PMA) und vom nicht kanzerogenen Toluol (*S*-Benzylmercaptursäure, *S*-BMA) entwickelt werden. Demzufolge lässt sich eine Exposition mit Benzol sowie Toluol anhand ihrer jeweiligen Mercaptursäuren im Urin einwandfrei verfolgen.

Auch andere Autoren haben sich mit der Thematik beschäftigt, wobei überwiegend Breitbanduntersuchungen von Mercaptursäuren im Urin auf pharmakologischer Ebene in der Literatur zu finden sind (Scholz *et al.* 2005; Wagner *et al.* 2006). Diese sogenannten *metabonomics*-Studien werden ergänzt durch Untersuchungen zu Arbeitsplatzbelastungen mit ausgewählten Lösungsmitteln, deren Mercaptursäure-Metaboliten im Urin der Arbeiter als Biomarker verwendet wurden (Manini *et al.* 2006). Umweltbedingte Expositionen mit Fremdstoffen und die daraus resultierende Bildung von Mercaptursäuren sowie deren Analytik wurden beispielsweise von Paci *et al.* (2007) am Beispiel des Benzols beschrieben.

Die *volatile organic compounds* (VOC) Benzol und Toluol können auch über Lebensmittel aufgenommen werden, wobei die Kontamination der Produkte auf einer externen Belastung, beispielsweise bei Lagerung in Tankstellenshops, basieren kann oder auch auf eine mögliche Bildung von Benzol aus dem Konservierungsstoff Benzoesäure zurückführbar ist. Als weitere relevante Quellen sind Abgase sowie bei Rauchern als Hauptaufnahmequelle für Benzol der Zigarettenrauch anzuführen.

Das Prinzip der Isotopenverdünnung, welches in dieser Methode durch Zugabe des internen Standards *S*-PMA- d_5 angewendet wurde, stellt sich aufgrund des extrem ähnlichen chromatographischen Verhaltens von Analyt und internem Standard als ein optimales Verfahren zur Quantifizierung heraus. Ergänzend erfolgt durch die Isotopenverdünnung auch eine Minimierung des Ionensuppression-Phänomens im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse. Aufgrund der guten Sensitivität und Selektivität wurde die LC-MS/MS-Technik im SRM-Modus nach einer für die Analyten spezifischen Optimierung eingesetzt. Durch Variation der Kollisionsenergie konnten die jeweiligen Signalintensitäten der *Daughter*-Ionen gesteigert werden. Allerdings waren im Gegensatz zu den GSH-Konjugaten bei den untersuchten Mercaptursäuren keine komplexen Fragmentgemische generierbar, sondern jede Mercaptursäure produzierte bei Kollision im Quadrupol 2 des Massenspektrometers jeweils ein charakteristisches Fragment-Ion (Abb. 72).

Bezüglich der Nachweisgrenzen von *S*-PMA und *S*-BMA sind zusätzliche Möglichkeiten zur Optimierung der Empfindlichkeiten gegeben, wenn die in den Urinen enthaltenen Mercaptursäuren im Rahmen des *Clean-Up* angereichert werden. Da keine absolut unbelasteten Urine zur Methodvalidierung vorlagen, wie es zum Beispiel bei der GSH-Konjugat-Methodvalidierung durch *Blank*-Medien und *Blank*-Zellextrakte der Fall war, ergaben sich die Konzentrationen für die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der

Mercaptursäuren aus mehrfach verdünnten Kalibrierlösungen (Kapitel 10.1.7.1). Hierbei ließen sich Konzentrationen von 0,6 µg/l *S*-PMA sowie von 0,7 µg/l *S*-BMA bei einem Injektionsvolumen von 20 µl noch gut detektieren.

Die entwickelte Behandlung der Urine mit Schwefelsäure vor dem eigentlichen *Clean-Up* konnte den Nachweis erbringen, dass es unter den beschriebenen Versuchsbedingungen zu einer Umsetzung von prä-Mercaptursäuren in Mercaptursäuren kommt. In sämtlichen analysierten Harnen konnte die Menge an *S*-PMA durch die Herabsetzung des pH-Wertes gesteigert werden. Das Vorläufermolekül der *S*-PMA, die prä-*S*-PMA, wird im Rahmen dieser durch Säure initiierten Reaktion durch Wasserabspaltung zur *S*-PMA umgesetzt (Abb. 79), wodurch die Bestimmung des Gesamt-*S*-PMA-Gehaltes ermöglicht wird.

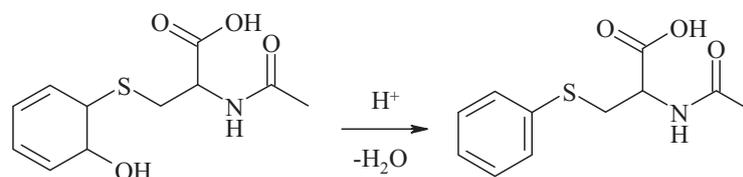


Abbildung 79: Säurekatalysierte Umsetzung der prä-*S*-PMA zur *S*-PMA

Eine auffällige Beobachtung hinsichtlich dieser durch Säure katalysierten Umsetzung bestand in den Verhältnissen von prä-*S*-PMA- und *S*-PMA-Gehalten bei verschiedenen hohen Belastungsgraden mit Benzol. So zeigten beispielsweise die Raucherproben aufgrund einer höheren Exposition mit Benzol gravierendere Unterschiede zwischen *S*-PMA-Konzentrationen mit und ohne Schwefelsäurebehandlung als gering belastete Proben. Möglicherweise wird bei dem physiologisch normalen pH-Wert im Urin von 5-7 sowie hohen Gesamt-*S*-PMA-Gehalten eine verhältnismäßig geringe Menge an prä-*S*-PMA spontan zur *S*-PMA umgesetzt. Wenn andererseits die Gesamtmenge an *S*-PMA klein ist, könnte der Großteil der prä-*S*-PMA zur *S*-PMA umgewandelt werden. Demzufolge ergäbe ein Verzicht auf die Schwefelsäurebehandlung bei hoch belasteten Urinen eine deutliche Unterschätzung des Gesamt-*S*-PMA-Gehaltes (Paci *et al.* 2007).

Die analysierten Raucherproben wiesen keine erhöhten *S*-BMA-Gehalte im Vergleich zu Nichtraucherproben auf, wie es beim Metaboliten *S*-PMA gezeigt werden konnte. Im Zigarettenrauch sind im Hauptstrom 3,2 µg bis 61,7 µg Benzol pro Zigarette sowie 5,4 µg bis 81,8 µg Toluol pro Zigarette enthalten (Darrall *et al.* 1998). Aus diesen Angaben könnte gefolgert werden, dass auch bei der *S*-BMA zwischen Raucher- und Nichtraucherproben Konzentrationsunterschiede bestehen sollten. Raucher und Nichtraucher wiesen anhand der ermittelten *S*-BMA-Gehalte jedoch ähnliche Toluolbelastungen auf. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Zigarettenrauch im Vergleich zu sonstiger umweltbedingter Toluolemission lediglich einen geringen Belastungsfaktor darstellt. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre eine unzureichende Spezifität der *S*-BMA als Biomarker für Umweltbelastungen. Schettgen *et al.* (2008) zeigten beispielsweise eine zusätzliche

potentielle *S*-BMA-Quelle auf. So verweisen sie auf die Verwendung von Benzylalkohol in kosmetischen Produkten und eine sich anschließende mögliche Bildung von *S*-BMA im Stoffwechsel. Eine mögliche Erklärung ist auch die überwiegende Metabolisierung des Toluols über Benzylalkohol und Benzaldehyd zur Benzoesäure mit anschließender Reaktion unter Glycinaddition zur Hippursäure (Abb. 4). Die Verstoffwechslung des Toluols über Benzylalkohol und Benzylsulfat zur *S*-BMA stellt nach Maestri *et al.* (1997) hingegen nur einen schwach ausgeprägten Weg dar. Bei dem Stoffwechselweg zur *S*-BMA wäre eine Limitierung durch die erforderlichen Sulfotransferasen aufgrund einer schnellen Sättigung des Sulfatesterweges denkbar. Folglich wäre der metabolische Weg zur Hippursäure begünstigt. Vorstellbar ist auch eine schlecht ablaufende Umsetzung des gebildeten Benzylsulfates mit Glutathion durch die involvierten GSTs.

Darüber hinaus sollte für weitere Studien eine höhere Probandenanzahl ausgewählt werden, um das Auftreten ähnlicher *S*-BMA-Gehalte bei Raucher- und Nichtraucher-Urinen bestätigen zu können. Der Befund konnte jedoch bereits durch Literaturdaten gestützt werden, welche aus einer vergleichbar angelegten Untersuchung analoge Resultate hervorbrachten (Schettgen *et al.* 2008).

Die analysierten Harnproben von Wasserpfeifen-Rauchern zeigten eine Streuung der *S*-PMA und *S*-BMA-Konzentrationen. So ergaben sich bei der *S*-PMA um mehr als den Faktor 30 variierende Gehalte und auch die *S*-BMA-Konzentrationen differierten um einen Faktor von etwa 7. Nach der gesundheitlichen Bewertung des BfR (2009a) stellt der regelmäßige Gebrauch von Wasserpfeifen Gesundheitsgefahren dar, die kaum geringer sind als die des regelmäßigen Zigarettenkonsums. Da die Zusammensetzung der verwendeten Wasserpfeifen-Tabaksorten generell stark variieren kann, ist auch mit unterschiedlich stark ausgeprägten Belastungen an Benzol und Toluol zu rechnen.

Die Untersuchung der Bildung der *S*-Naphthylmercaptursäure (*S*-NMA) erbrachte keine quantifizierbaren Ergebnisse, da für die Gesamtheit der untersuchten Urine die Konzentrationen dieses Naphthalin-Metaboliten unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Im Urin von Versuchstieren wie Mäusen und Ratten konnte nach Naphthalin-Inhalationen die *S*-NMA nachgewiesen werden (Pakenham *et al.* 2002). Daraus lässt sich folgern, dass beim humanen Stoffwechsel möglicherweise weniger schwefelhaltige Naphthalin-Metaboliten gebildet werden. Stattdessen könnte das durch CYP-vermittelte Oxidation gebildete Naphthalin-1,2-oxid vermehrt durch Epoxidhydrolasen zu Diolen umgesetzt werden. So zeigen Literaturdaten, dass das 1,2-Dihydrodiolnaphthalin und das α -Naphthol charakteristische humane Metaboliten des Naphthalins sind. Außerdem wurden Naphthylsulfate und Naphthylglucuronide im Humanurin nachgewiesen (Andreoli *et al.* 1999).

Hecht *et al.* (2008) konnten im Humanurin den Nachweis einer Mercaptursäure vom PAK Phenanthren erbringen. Die detektierte Mercaptursäure *N*-acetyl-*S*-(*r*-4,*t*-2,3-trihydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-*c/t*-1-phenanthryl)-L-cystein ging metabolisch aus dem *anti*-3,4-Diol-1,2-epoxyphenanthren hervor und wurde als einziges Isomer nachgewiesen. In der Absicht, dem von Hecht *et al.* beschriebenen Befund nachzugehen, kam ein Teil der untersuchten Urine von

Nichtrauchern und Rauchern für zusätzliche qualitative Untersuchungen zum Einsatz. Hierbei erfolgten Messungen im SRM-, DAU- und CNL-Modus mit der Intention, Mercaptursäuren von Substanzen nachzuweisen, gegenüber denen die Probanden durch Nahrungsaufnahme oder Umweltfaktoren oftmals exponiert sind. Dementsprechend wurden die Analysen parallel zur Untersuchung der Mercaptursäure vom Phenanthren ebenfalls für die Mercaptursäuren von Acrylamid, Acrolein und Glycidol durchgeführt.

Acrylamid wird überwiegend über stärkehaltige und stark erhitzte Lebensmittel aufgenommen (Tareke *et al.* 2002) und unterliegt im Körper einer Metabolisierung zum Glycidamid, dem eine genotoxische Wirkung zugesprochen wird (Boettcher und Angerer 2005). Da Acrylamid und Glycidamid getrennte Mercaptursäuren bilden, wurde analytisch der qualitative Nachweis beider Mercaptursäuren angestrebt.

Eine Exposition mit dem toxischen Acrolein ist in einer Aufnahme zuvor überhitzter tierischer und pflanzlicher Fette, beispielsweise während des Frittierprozesses, begründet.

Das kanzerogene Glycidol kann hingegen in Form seiner Fettsäureester bei der Raffination pflanzlicher Speiseöle entstehen, wobei nach Aufnahme der Öle in den menschlichen Organismus eine Hydrolyse dieser Ester in Glycidol und Fettsäuren erfolgt (BfR 2009b).

Im Rahmen dieser Experimente wurden die m/z-Verhältnisse der jeweiligen Mercaptursäuren analysiert, da die Referenz-Mercaptursäuren nicht zur Verfügung standen. Eine Phenanthren-basierte Mercaptursäure konnte in den untersuchten Urinproben nicht nachgewiesen werden. Es ließen sich jedoch Peaks mit den m/z-Verhältnissen der Mercaptursäuren vom Glycidol (2,3-Dihydroxypropyl-MA), vom Acrolein (3-Hydroxypropyl-MA) und vom Glycidamid (2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl-MA) mittels SRM-Modus detektieren. Eine zusätzliche Absicherung zur Identifizierung dieser Mercaptursäuren konnte mittels DAU- und CNL-Messungen erzielt werden. Eine CNL-Messung mit konstantem Verlust des Mercaptursäure-spezifischen m/z 129 zeigte die Gesamtheit der in einer Probe enthaltenen Mercaptursäuren an. Der Einsatz des DAU-Modus resultierte bei Auswahl des jeweiligen Molekül-Ions im Erhalt der spezifischen Fragmente, was den qualitativen Nachweis erlaubte (Kapitel 10.2). Sowohl in Raucher- als auch in Nichtraucherproben konnten die Mercaptursäuren gefunden werden. Daher ist davon auszugehen, dass bei Nichtrauchern Lebensmittelbelastungen die jeweilige Quelle darstellen. Zur endgültigen Identifizierung dieser Mercaptursäuren sowie zur Quantifizierung ist die Verwendung der Referenzverbindungen unverzichtbar. Dennoch konnte die ausgearbeitete Methode ihre Anwendbarkeit auch für unbekannte Mercaptursäuren demonstrieren.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die entwickelte Mercaptursäure-Analytik als nicht-invasive Technik einen Beitrag zum Biomonitoring lebensmittel- und umwelt-relevanter Fremdstoffe leisten kann. Die Analytik von Mercaptursäuren dient insbesondere der Bestimmung von Konjugaten toxikologisch-relevanter elektrophiler Metaboliten.

6 Zusammenfassung

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) repräsentieren eine Klasse von Xenobiotika, die – neben anderen Quellen – in unterschiedlichen Arten von Lebensmitteln auftreten. Nach der Nahrungsaufnahme werden die PAK bereits beim Passieren des Gastrointestinaltraktes durch Phase-I- und Phase-II-Enzyme metabolisiert. Die hierbei gebildeten Metaboliten unterliegen anschließend einem Transport durch die in den Epithelzellen entlang des Verdauungstraktes lokalisierten Proteine der *ATP-binding cassette*-Familie. PAK können über ihre jeweiligen Dihydrodirole zu den biologisch aktiven Dihydrodirolepoxiden umgesetzt werden, welche über die Fähigkeit verfügen, genotoxische DNA-Addukte zu bilden. Es besteht jedoch die Möglichkeit der Detoxifizierung der Dihydrodirolepoxide durch Konjugationsreaktionen mit Glutathion (GSH) sowie einer nachfolgenden Exkretion der gebildeten Konjugate aus der Zelle.

Mit dem Ziel der Bestimmung von GSH-Konjugaten der kanzerogenen PAK Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P), Dibenzo[*a,l*]pyren (DB[*a,l*]P) und Benzo[*c*]phenanthren (B[*c*]Phe) wurden spezifische LC-ESI-MS/MS-Methoden entwickelt. Medium- und Zellextraktproben von Caco-2-Zellkulturen, die mit den Dihydrodiolen oder Dihydrodirolepoxiden eines jeweiligen PAK zuvor inkubiert worden waren, unterlagen zunächst einem Aufreinigungsschritt mittels Festphasenextraktion (SPE). Für die Quantifizierung der GSH-Konjugate erwies sich die LC-MS/MS-Technik im *Selected Reaction Monitoring* (SRM)-Modus aufgrund der guten Sensitivität und Selektivität als am besten geeignet. Während dieses Prozesses erfolgte eine Fragmentierungsreaktion des jeweiligen Molekül-Ions zu seinem korrespondierenden *Daughter*-Ion. Zusätzliche massenspektrometrische Scan-Modi, wie der *Daughter Scan* (DAU)-Modus, fanden im Rahmen von Strukturaufklärungen Anwendung.

Die Detoxifizierung mittels GSH-Konjugation konnte im Caco-2-Zellmodell für die Substanzklasse der PAK anhand ihrer Vertreter B[*a*]P, DB[*a,l*]P und B[*c*]Phe mit der entwickelten Analytik erfolgreich untersucht werden. Hierbei lag der Fokus auf der Entgiftung der ultimal kanzerogenen Dihydrodirolepoxide (+)-*anti*-BPDE, (-)-*anti*-DBPDE sowie (-)-*anti*-BcPheDE. Dieser Prozess beinhaltete sowohl die Bildung der GSH-Konjugate als auch deren Transport aus der Caco-2-Zelle in das umgebende Medium, der im TranswellTM-System überwiegend in basolateraler Richtung erfolgte und daher einer Exkretion in Richtung Blutkreislauf gleichzusetzen war. Das entwickelte analytische Verfahren erlaubte folglich die Durchführung von Transportexperimenten in Zellkultur, ohne dass isotope markierte Substanzen eingesetzt werden mussten.

Durch Vorbehandlung des Zellsystems mit spezifischen Hemmstoffen konnten die *Multidrug Resistance-associated Proteins* und nicht das *Breast Cancer Resistance Protein* als verantwortliche Transporter von GSH-Konjugaten identifiziert werden. Einflüsse ausgewählter Substanzen mit chemopräventivem Potential, wie Oltipraz, Quercetin und Butyrat, bewirkten überdies detoxifizierungs-fördernde Effekte durch Induktion der GSH-

Konjugat-Transportrate. Des Weiteren gaben Inkubationen von Caco-2-Zellen mit den Mutterkohlenwasserstoffen B[a]P, DB[a,l]P und B[c]Phe Aufschluss über die metabolische Kompetenz der Zellen und das jeweilige Gesamtmetabolitenprofil.

Typische niedermolekulare aromatische Kohlenwasserstoffe mit nur einem Ringsystem sind Benzol und Toluol, die auch zu den *volatile organic compounds* (VOC) gezählt werden. Die genannten VOC können über Lebensmittel aufgenommen werden, wobei die Produkte durch eine externe Kontamination belastet sein können. Im Falle des Benzols wird auch eine mögliche Bildung aus dem Konservierungsstoff Benzoesäure diskutiert. Darüber hinaus sind ebenfalls inhalative Belastungen durch Abgase sowie speziell bei Rauchern der Zigarettenrauch als Hauptaufnahmequelle für Benzol anzuführen. Nach Inhalation, dermalen oder oraler Exposition werden Benzol und Toluol im menschlichen Körper zu ihren korrespondierenden Mercaptursäuren verstoffwechselt, die neben anderen Metaboliten mit dem Urin ausgeschieden werden. Dieser Detoxifizierungsprozess kann für analytische Untersuchungen im Sinne der Bestimmung von Belastungsmarkern herangezogen werden und stellt gleichzeitig eine nicht-invasive Technik dar. Dem *Clean-Up* der Urinproben mittels SPE wurde eine Schwefelsäurebehandlung der Urine vorgeschaltet, um eine quantitative Umwandlung von prä-Mercaptursäuren in Mercaptursäuren zu erreichen. Mit dieser entwickelten Methode ließ sich folglich der Gesamtgehalt an *S*-Phenylmercaptursäure (*S*-PMA) ermitteln. Zur Bestimmung der als Biomarker fungierenden Mercaptursäuren diente die LC-MS/MS-Technik, wobei aufgrund der hohen Empfindlichkeit ebenfalls der SRM-Modus zum Einsatz gelangte. Die im Vergleich zu Nichtrauchern in Raucher-Urinen gefundenen höheren *S*-PMA-Gehalte verdeutlichen einen stärkeren Belastungsgrad der Raucher mit Benzol. Demgegenüber ließen sich in Raucher- und Nichtraucher-Urinen vergleichbare Konzentrationen der *S*-Benzylmercaptursäure nachweisen, was möglicherweise auf eine ähnliche Belastung mit Toluol schließen lässt. Die *S*-Naphthylmercaptursäure als Biomarker des PAKs Naphthalin konnte im Zuge der Untersuchungen nicht detektiert werden.

Die entwickelte Methode wurde darüber hinaus zu einer qualitativen Analyse weiterer Mercaptursäuren lebensmittelrelevanter Fremdstoffe herangezogen. Die zusätzlich zum massenspektrometrischen SRM-Modus eingesetzten DAU- und *Constant Neutral Loss* (CNL)-Modi detektierten hierbei die charakteristischen Masse/Ladungs-Verhältnisse der Mercaptursäuren von Glycidamid, Glycidol und Acrolein. Dabei zeigte sich aufgrund gruppenspezifischer Fragmente eine mögliche Anwendbarkeit der Methode auch für unbekannte Mercaptursäuren.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die in der vorliegenden Arbeit entwickelten analytischen Methoden eine selektive und sensitive Bestimmung von sowohl GSH-Konjugaten als auch Mercaptursäuren unter *in-vitro*- und *in-vivo*-Bedingungen mittels LC-MS/MS erlauben, welche als Biomarker einer Entgiftung intermediärer reaktiver Metaboliten von kanzerogenen Fremdstoffen große Aufmerksamkeit verdienen.

Summary

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) represent a class of xenobiotics occurring, among other sources, in different types of food. After food consumption PAH are metabolised as early as passing the human gastrointestinal tract by a number of phase I and II enzymes. The metabolites formed are handled by several transport proteins of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily present in epithelial cells lining the alimentary tract. PAH can be metabolised via their specific dihydrodiols to the biologically active dihydrodiol epoxides which can form genotoxic DNA adducts. On the other hand, dihydrodiol epoxides can be detoxified by conjugation with glutathione (GSH) and subsequent transport of the resulting conjugates out of the cell.

For the determination of GSH-conjugates of the carcinogenic PAH benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P), dibenzo[*a,l*]pyrene (DB[*a,l*]P) and benzo[*c*]phenanthrene (B[*c*]Phe) specific LC-ESI-MS/MS-methods were established. Medium- and cell extract samples from Caco-2 cell cultures incubated with dihydrodiols or dihydrodiol epoxides of a particular PAH were cleaned up by a solid phase extraction (SPE) step. LC-MS/MS analysis operated in the selected reaction monitoring mode (SRM) appeared to have the best specificity and sensitivity for the analysis of these GSH-conjugates whose molecular-ions are fragmented during this process to their associated daughter-ions. Additional mass spectrometric scan modes like the daughter scan mode were used for structure determinations.

Detoxification by GSH-conjugation could be successfully analysed for the class of PAH by means of its representatives B[*a*]P, DB[*a,l*]P and B[*c*]Phe in the Caco-2 cell system with the described method. In this connection the focus was based on the detoxification of the ultimate carcinogens (+)-*anti*-BPDE, (-)-*anti*-DBPDE and (-)-*anti*-BcPheDE. This process included the formation of the GSH-conjugates as well as their transportation from the Caco-2 cells into the surrounding medium which occurred in the transwellTM-system overall to the basolateral side signifying an excretion into the blood circulation. Accordingly, this method enables the procedure of transport experiments in cell culture with non-labeled compounds.

Pre-treatments of the cell system with specific inhibitors could identify the multidrug resistance-associated proteins and not the breast cancer resistance protein as responsible transporters for the GSH-conjugates. Influences of selected substances possessing a chemopreventive potential, like oltipraz, quercetin and butyrate, caused supporting detoxification effects by inducing the GSH-conjugate transport rate. Furthermore, incubations of Caco-2 cells with the parent compounds B[*a*]P, DB[*a,l*]P and B[*c*]Phe gave information about the metabolic competence of the cells and the respective metabolic pattern.

Typical low-molecular aromatic hydrocarbons with only one ring system are benzene and toluene, which belong to the volatile organic compounds (VOC). The mentioned VOC can be taken in via food, whose contamination can be caused by external sources. In case of benzene, a probable formation out of the preservative benzoic acid is under discussion. Beyond that,

there are inhalative contaminations caused by exhaust fumes and especially for smokers the cigarette smoke as main intake source for benzene. After inhalation, dermal or oral exposition, VOC like benzene and toluene are transformed during metabolism in the human body to their corresponding mercapturic acids which are excreted besides other metabolites by urine. This detoxification process can be used for analysis concerning markers of exposure and it represents simultaneously a non-invasive technique. Prior to sample clean-up by SPE, the urine samples were treated with sulfuric acid in order to achieve a quantitative transformation of pre-mercapturic acids into their respective mercapturic acids. By means of the developed method, the total *S*-phenylmercapturic acid (*S*-PMA) concentration could be revealed. For determination purposes of these mercapturic acid biomarkers served the LC-MS/MS technique and due to its high sensitivity the SRM-mode was applied.

In comparison to non-smokers, the smokers urine showed higher amounts of *S*-PMA and therewith higher levels of exposure to benzene. In contrast, similar concentrations of *S*-benzylmercapturic acid could be revealed in smokers and non-smokers urine, what is probably provoked by an equal exposure to toluene. *S*-naphthylmercapturic acid as biomarker of the PAH naphthalene could not be detected in the course of the examinations.

Moreover, the developed method was applied for a qualitative analysis of further food-relevant mercapturic acids. Besides the mass spectrometric SRM-mode the adopted DAU- and constant neutral loss (CNL)-modes detected the characteristic *m/z*-ratios belonging to the mercapturic acids of glycidamide, glycidol and acrolein. Thereby, the adaptability of this method, also for unknown mercapturic acids, was shown due to group-specific fragments.

In summary, one can conclude, that the analytical methods developed in this work allow selective and sensitive determinations of both GSH-conjugates and mercapturic acids under *in vitro* and *in vivo* conditions with LC-MS/MS. These biomarkers resulting from detoxifications of intermediate reactive metabolites of carcinogenic xenobiotics deserve great attention.

7 Literaturverzeichnis

- Akerboom, T. P. and H. Sies (1989). "Transport of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione conjugates across the hepatocyte plasma membrane." Methods Enzymol **173**: 523-34
- Allen, J. D., A. van Loevezijn, J. M. Lakhai, M. van der Valk, O. van Tellingen, G. Reid, J. H. Schellens, G. J. Koomen and A. H. Schinkel (2002). "Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C." Mol Cancer Ther **1**(6): 417-25
- Andreoli R., P. Manini, E. Bergamaschi, A. Mutti, I. Franchini I and W. M. Niessen (1999). "Determination of naphthalene metabolites in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization." J Chromatogr A **847**(1-2):9-17
- Anzenbacher, P. and E. Anzenbacherova (2001). "Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics." Cell Mol Life Sci **58**(5-6): 737-47
- Auyeung, D. J., F. K. Kessler and J. K. Ritter (2003). "Mechanism of rat UDP-glucuronosyltransferase 1A6 induction by oltipraz: evidence for a contribution of the Aryl hydrocarbon receptor pathway." Mol Pharmacol **63**(1): 119-27
- Baillie, T. A. and M. R. Davis (1993). "Mass spectrometry in the analysis of glutathione conjugates." Biol Mass Spectrom **22**(6): 319-25
- Benson, A. B., 3rd (1993). "Oltipraz: a laboratory and clinical review." J Cell Biochem Suppl **17F**: 278-91
- BfR (2009a). "Gesundheits- und Suchtgefahren durch Wasserpfeifen." Aktualisierte Gesundheitliche Bewertung* Nr. 011/2009 des BfR vom 26. März 2009
- BfR (2009b). "Fragen und Antworten zu Glycidol-Fettsäureestern." FAQ des BfR vom 30. April 2009)
- Boettcher, M. I. and J. Angerer (2005). "Determination of the major mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine by LC-ESI-MS/MS." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **824**(1-2): 283-94
- Boogaard, P. J. and N. J. van Sittert (1995). "Biological monitoring of exposure to benzene: a comparison between S-phenylmercapturic acid, trans,trans-muconic acid, and phenol." Occup Environ Med **52**(9): 611-20
- Bottcher, C., E. V. Roepenack-Lahaye, E. Willscher, D. Scheel and S. Clemens (2007). "Evaluation of matrix effects in metabolite profiling based on capillary liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry." Anal Chem **79**(4): 1507-13
- Boulenc, X., M. Bourrie, I. Fabre, C. Roque, H. Joyeux, Y. Berger and G. Fabre (1992). "Regulation of cytochrome P450IA1 gene expression in a human intestinal cell line, Caco-2." J Pharmacol Exp Ther **263**(3): 1471-8

- Brunnemann, K. D., M. R. Kagan, J. E. Cox and D. Hoffmann (1989). "Determination of benzene, toluene and 1,3-butadiene in cigarette smoke by GC-MDS." Exp Pathol **37**(1-4): 108-13
- Buesen, R., M. Mock, A. Seidel, J. Jacob and A. Lampen (2002). "Interaction between metabolism and transport of benzo[*a*]pyrene and its metabolites in enterocytes." Toxicol Appl Pharmacol **183**(3): 168-78
- Buesen, R., M. Mock, H. Nau, A. Seidel, J. Jacob and A. Lampen (2003). "Human intestinal Caco-2 cells display active transport of benzo[*a*]pyrene metabolites." Chem Biol Interact **142**(3): 201-21
- Byrd, G. D., K. W. Fowler, R. D. Hicks, M. E. Lovette and M. F. Borgerding (1990). "Isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in the determination of benzene, toluene, styrene and acrylonitrile in mainstream cigarette smoke." J Chromatogr **503**(2): 359-68
- Cantor, K. P. (1997). "Drinking water and cancer." Cancer Causes Control **8**(3): 292-308
- Causon, R. (1997). "Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **689**(1): 175-80
- Chen, Y. N., L. A. Mickley, A. M. Schwartz, E. M. Acton, J. L. Hwang and A. T. Fojo (1990). "Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpression of a novel resistance-related membrane protein." J Biol Chem **265**(17): 10073-80
- Choi, B. K., D. M. Hercules and A. I. Gusev (2001). "Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal suppression." J Chromatogr A **907**(1-2): 337-42
- Churchill, J. E., D. L. Ashley and W. E. Kaye (2001). "Recent chemical exposures and blood volatile organic compound levels in a large population-based sample." Arch Environ Health **56**(2): 157-66
- Ciolino, H. P., P. J. Daschner and G. C. Yeh (1999). "Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially." Biochem J **340** (Pt 3): 715-22
- Clapper, M. L. and C. E. Szarka (1998). "Glutathione S-transferases--biomarkers of cancer risk and chemopreventive response." Chem Biol Interact **111-112**: 377-88
- Commandeur, J. N., G. J. Stijntjes and N. P. Vermeulen (1995). "Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione *S*-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics." Pharmacol Rev **47**(2): 271-330
- Conney, A. H. (1982). "Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture." Cancer Res **42**(12): 4875-917

- Constantopoulos, T. L., G. S. Jackson and C. G. Enke (1999). "Effects of salt concentration on analyte response using electrospray ionization mass spectrometry." J Am Soc Mass Spectrom **10**(7): 625-34
- Cruz-Correa, M., D. A. Shoskes, P. Sanchez, R. Zhao, L. M. Hyland, S. D. Wexner and F. M. Giardiello (2006). "Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis." Clin Gastroenterol Hepatol **4**(8): 1035-8
- Cui S., Kim S. J., Jo S. C., Lee Y. M. and Lee Y. I. (2005). "A study of in vitro scavenging reactions of acrylamide with glutathione using electrospray ionization tandem mass spectrometry." Bull Korean Chem Soc **26**(8): 1235-40
- Dahl, S. R., C. R. Kleiveland, M. Kassem, T. Lea, E. Lundanes and T. Greibrokk (2008). "Detecting pM concentrations of prostaglandins in cell culture supernatants by capillary SCX-LC-MS/MS." J Sep Sci **31**(14): 2627-33
- Darrall, K. G., J. A. Figgins, R. D. Brown and G. F. Phillips (1998). "Determination of benzene and associated volatile compounds in mainstream cigarette smoke." Analyst **123**(5): 1095-101
- Davidson, N. E., P. A. Egner and T. W. Kensler (1990). "Transcriptional control of glutathione S-transferase gene expression by the chemoprotective agent 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiole-3-thione (oltipraz) in rat liver." Cancer Res **50**(8): 2251-5
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.(DGE) Bonn, Ernährungsbericht 2004
- Devanesan, P. D., P. Cremonesi, J. E. Nunnally, E. G. Rogan and E. L. Cavalieri (1990). "Metabolism and mutagenicity of dibenzo[*a,e*]pyrene and the very potent environmental carcinogen dibenzo[*a,l*]pyrene." Chem Res Toxicol **3**(6): 580-6
- Dieckhaus, C. M., C. L. Fernandez-Metzler, R. King, P. H. Krolkowski and T. A. Baillie (2005). "Negative ion tandem mass spectrometry for the detection of glutathione conjugates." Chem Res Toxicol **18**(4): 630-8
- Ding, Y. S., B. C. Blount, L. Valentin-Blasini, H. S. Applewhite, Y. Xia, C. H. Watson and D. L. Ashley (2009). "Simultaneous determination of six mercapturic acid metabolites of volatile organic compounds in human urine." Chem Res Toxicol **22**(6): 1018-25
- Drewe J. and St. Krähenbühl (2000). "Klinische Pharmakologie: Proteine für den Transport von Arzneistoffen." Schweiz Med Wochenschr **130**: Nr 20, 727-31
- Ebert, B., A. Seidel and A. Lampen (2005a). "Identification of BCRP as transporter of benzo[*a*]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists." Carcinogenesis **26**(10): 1754-63
- Ebert, B., A. Seidel and A. Lampen (2005b). "Induction of phase-1 metabolizing enzymes by oltipraz, flavone and indole-3-carbinol enhance the formation and transport of benzo[*a*]pyrene sulfate conjugates in intestinal Caco-2 cells." Toxicol Lett **158**(2): 140-51

- Ebert, B., A. Seidel and A. Lampen (2007). "Phytochemicals induce breast cancer resistance protein in Caco-2 cells and enhance the transport of benzo[*a*]pyrene-3-sulfate." Toxicol Sci **96**(2): 227-36
- FDA, Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation (2001)
- Fenn, J. B. (2003). "Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture)." Angew Chem Int Ed Engl **42**(33): 3871-94
- Fogh, J., J. M. Fogh and T. Orfeo (1977). "One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice." J Natl Cancer Inst **59**(1): 221-6
- Funk, M. (1992). Dissertation: "Synthese diastereomerer Glutathionkonjugate von Bay- und Fjord-Region-Dihydrodiolepiden des Benzo[*a*]pyrens, Chrysens, Benzo[*c*]phenanthrens und Dibenz[*a,h*]anthracens und Untersuchungen zur Stereoselektivität ihrer enzymatischen Bildung", Universität Mainz
- Funk, M., Frank, H., Platt, K. L., Oesch, F. and A. Seidel (1993). "Synthesis and characterization of glutathione conjugates of diastereomeric bay- and fjord-region dihydrodiol epoxides". In: Polycyclic Aromatic Compounds: Synthesis, Properties, Analytical Measurements, Occurrence and Biological Effects (P. Garrigues and M. Lamotte, eds.) Gordon and Breach Science Publishers, Yverdon (Switzerland) pp 207-214
- Funk, M., I. Gath, A. Seidel, F. Oesch and K. L. Platt (1995). "Conjugation of anti-dihydrodiol epoxides of benzo[*a*]pyrene, chrysene, benzo[*c*]phenanthrene and dibenz[*a,h*]anthracene with glutathione catalyzed by cytosol and by the Mu-class glutathione transferase HTP II from rat liver." Chem Biol Interact **95**(1-2): 189-201
- Fustinoni, S., M. Buratti, L. Campo, A. Colombi, D. Consonni, A. C. Pesatori, M. Bonzini, P. Farmer, S. Garte, F. Valerio, D. F. Merlo and P. A. Bertazzi (2005). "Urinary t,t-muconic acid, S-phenylmercapturic acid and benzene as biomarkers of low benzene exposure." Chem Biol Interact **153-154**: 253-6
- Gentilini, M., B. Duflo, D. Richard-Lenoble, G. Brucker, M. Danis, G. Niel and Y. Meunier (1980). "Assessment of 35972 RP (oltipraz) a new antischistosomal drug against Schistosoma haematobium, Schistosoma mansoni, and Schistosoma intercalatum." Acta Trop **37**(3): 271-4
- Glatt, H., A. Piee, K. Pauly, T. Steinbrecher, R. Schrode, F. Oesch and A. Seidel (1991). "Fjord- and bay-region diol-epoxides investigated for stability, SOS induction in Escherichia coli, and mutagenicity in Salmonella typhimurium and mammalian cells." Cancer Res **51**(6): 1659-67
- Guengerich, F. P. (2004). "Cytochrome P450: what have we learned and what are the future issues?" Drug Metab Rev **36**(2): 159-97
- Hecht, S. S., P. W. Villalta and J. B. Hochalter (2008). "Analysis of phenanthrene diol epoxide mercapturic acid detoxification products in human urine: relevance to molecular epidemiology studies of glutathione S-transferase polymorphisms." Carcinogenesis **29**(5): 937-43

- Hengstler, J. G. (2008). "Toxikologie für Chemiker, Teil 1." Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund
- Hertog, M. G., E. J. Feskens, P. C. Hollman, M. B. Katan and D. Kromhout (1993). "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study." Lancet **342**(8878): 1007-11
- Hidalgo I. J., T. J. Raub and R. T. Borchardt (1989): Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. Gastroenterology **96** (3), 736-749
- Hinchman, C. A. and N. Ballatori (1994). "Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process." J Toxicol Environ Health **41**(4): 387-409
- Hirohashi, T., H. Suzuki, X. Y. Chu, I. Tamai, A. Tsuji and Y. Sugiyama (2000). "Function and expression of multidrug resistance-associated protein family in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2)." J Pharmacol Exp Ther **292**(1): 265-70
- Hunter, J., B. H. Hirst and N. L. Simmons (1993). "Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers." Pharm Res **10**(5): 743-9
- IARC Monographs (2008): Overall evaluations of carcinogenicity to humans. (Volumes 1-99)
- IARC Monographs (1987): Evaluation of carcinogenic risks to humans, Supplement 7
- Inoue, O., E. Kanno, K. Kasai, H. Ukai, S. Okamoto and M. Ikeda (2004). "Benzylmercapturic acid is superior to hippuric acid and o-cresol as a urinary marker of occupational exposure to toluene." Toxicol Lett **147**(2): 177-86
- Ittah, Y., D. R. Thakker, W. Levin, M. Croisy-Delcey, D. E. Ryan, P. E. Thomas, A. H. Conney and D. M. Jerina (1983). "Metabolism of benzo[*c*]phenanthrene by rat liver microsomes and by a purified monooxygenase system reconstituted with different isozymes of cytochrome P-450." Chem Biol Interact **45**(1): 15-28
- Jacob J., G. Raab, V.J. Soballa, A. Luch, G. Grimmer, H. Greim, J. Doehmer, H.G. Morrisson, J.J. Stegeman and A. Seidel (1999). "Species-dependent metabolism of benzo[*c*]phenanthrene and dibenzo[*a,l*]pyrene by various cyp450 isoforms." Polycyclic Aromatic Compounds **16**: 191-203
- Jemal, M., A. Schuster and D. B. Whigan (2003). "Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable isotope analog internal standard." Rapid Commun Mass Spectrom **17**(15): 1723-34
- Jones, A. D., C. K. Winter, M. H. Buonarati and H. J. Segall (1993). "Analysis of mercapturic acid conjugates of xenobiotic compounds using negative ionization and tandem mass spectrometry." Biol Mass Spectrom **22**(1): 68-76

- Juliano, R. L. and V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-62
- Kautenburger, T., G. Beyer-Sehlmeyer, G. Festag, N. Haag, S. Kuhler, A. Kuchler, A. Weise, B. Marian, W. H. Peters, T. Liehr, U. Claussen and B. L. Pool-Zobel (2005). "The gut fermentation product butyrate, a chemopreventive agent, suppresses glutathione S-transferase theta (hGSTT1) and cell growth more in human colon adenoma (LT97) than tumor (HT29) cells." J Cancer Res Clin Oncol **131**(10): 692-700
- Kensler, T. W., P. A. Egner, P. M. Dolan, J. D. Groopman and B. D. Roebuck (1987). "Mechanism of protection against aflatoxin tumorigenicity in rats fed 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione (oltipraz) and related 1,2-dithiol-3-thiones and 1,2-dithiol-3-ones." Cancer Res **47**(16): 4271-7
- King, R., R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein and T. Olah (2000). "Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization." J Am Soc Mass Spectrom **11**(11): 942-50
- Knekt, P., R. Jarvinen, R. Seppanen, M. Helleovaara, L. Teppo, E. Pukkala and A. Aromaa (1997). "Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms." Am J Epidemiol **146**(3): 223-30
- Lafaye, A., C. Junot, B. Ramounet-Le Gall, P. Fritsch, E. Ezan and J. C. Tabet (2004). "Profiling of sulfoconjugates in urine by using precursor ion and neutral loss scans in tandem mass spectrometry. Application to the investigation of heavy metal toxicity in rats." J Mass Spectrom **39**(6): 655-64
- Lampen A., B. Ebert, L. Stumkat, J. Jacob and A. Seidel (2004). "Induction of gene expression of xenobiotic metabolism enzymes and ABC-transport proteins by PAH and a reconstituted PAH mixture in human Caco-2 cells." Biochim Biophys Acta **1681**(1):38-46
- Le Ferrec, E., D. Lagadic-Gossmann, C. Rauch, C. Bardiau, K. Maheo, F. Massiere, M. Le Vee, A. Guillouzo and F. Morel (2002). "Transcriptional induction of CYP1A1 by oltipraz in human Caco-2 cells is aryl hydrocarbon receptor- and calcium-dependent." J Biol Chem **277**(27): 24780-7
- Levin W., Wood A. W., Chang R. L., Ittah Y., Croisy-Delcey M., Yagi H., Jerina D. M. and A. H. Conney (1980). "Exceptionally high tumor-initiating activity of benzo[c]phenanthrene bay-region diol-epoxides on mouse skin." Cancer Res **40**(11):3910-4
- Lin, J. H., M. Chiba and T. A. Baillie (1999). "Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized?" Pharmacol Rev **51**(2): 135-58
- Luch, A. (2009). "On the impact of the molecule structure in chemical carcinogenesis." Exs **99**: 151-79

- Lutz, U., N. Bittner, R. W. Lutz and W. K. Lutz (2008). "Metabolite profiling in human urine by LC-MS/MS: method optimization and application for glucuronides from dextromethorphan metabolism." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **871**(2): 349-56
- Lutz, U., R. W. Lutz and W. K. Lutz (2006). "Metabolic profiling of glucuronides in human urine by LC-MS/MS and partial least-squares discriminant analysis for classification and prediction of gender." Anal Chem **78**(13): 4564-71
- Maestri L., S. Ghittori and M. Imbriani (1997). "Determination of specific mercapturic acids as an index of exposure to environmental benzene, toluene, and styrene." Ind Health **35**(4):489-501
- Mahajan, M. K. and C. A. Evans (2008). "Dual negative precursor ion scan approach for rapid detection of glutathione conjugates using liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **22**(7): 1032-40
- Mallet, C. R., J. R. Mazzeo and U. Neue (2001). "Evaluation of several solid phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry on-line configurations for high-throughput analysis of acidic and basic drugs in rat plasma." Rapid Commun Mass Spectrom **15**(13): 1075-83
- Manini, P., R. Andreoli, E. Bergamaschi, G. De Palma, A. Mutti and W. M. Niessen (2000). "A new method for the analysis of styrene mercapturic acids by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **14**(21): 2055-60
- Manini, P., R. Andreoli and A. Mutti (2006). "Application of liquid chromatography-mass spectrometry to biomonitoring of exposure to industrial chemicals." Toxicol Lett **162**(2-3): 202-10
- Matuszewski, B. K., M. L. Constanzer and C. M. Chavez-Eng (1998). "Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations." Anal Chem **70**(5): 882-9
- Meisenhelder, J. and K. Semba (2001). "Safe use of radioisotopes." Curr Protoc Cell Biol **Appendix 1**: Appendix 1D
- Monks, T. J., M. W. Anders, W. Dekant, J. L. Stevens, S. S. Lau and P. J. van Bladeren (1990). "Glutathione conjugate mediated toxicities." Toxicol Appl Pharmacol **106**(1): 1-19
- Monks, T. J. and S. S. Lau (1990). "Glutathione, gamma-glutamyl transpeptidase, and the mercapturic acid pathway as modulators of 2-bromohydroquinone oxidation." Toxicol Appl Pharmacol **103**(3): 557-63

- Muller, C., P. Schafer, M. Stortzel, S. Vogt and W. Weinmann (2002). "Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **773**(1): 47-52
- Munzel, P. A., S. Schmohl, H. Heel, K. Kalberer, B. S. Bock-Hennig and K. W. Bock (1999). "Induction of human UDP glucuronosyltransferases (UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7) by t-butylhydroquinone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Caco-2 cells." Drug Metab Dispos **27**(5): 569-73
- Nau H., Steinberg P., Kietzmann M. (2003). "Lebensmitteltoxikologie", Parey Buchverlag
- Nelson D. R. (2009) "The cytochrome p450 homepage." Hum Genomics **4**(1): 59-65
- Nguyen, T., P. J. Sherratt and C. B. Pickett (2003). "Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element." Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**: 233-60
- Niessen, W. M. (1999). "State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry." J Chromatogr A **856**(1-2): 179-97
- Paci, E., D. Pignini, A. M. Cialdella, P. Faranda and G. Tranfo (2007). "Determination of free and total S-phenylmercapturic acid by HPLC/MS/MS in the biological monitoring of benzene exposure." Biomarkers **12**(2): 111-22
- Pakenham G., J. Lango, M. Buonarati, D. Morin and A. Buckpitt (2002). "Urinary naphthalene mercapturates as biomarkers of exposure and stereoselectivity of naphthalene epoxidation." Drug Metab Dispos **30**(3):247-53
- Perez, S., M. Farkas, D. Barcelo and D. S. Aga (2007). "Characterization of glutathione conjugates of chloroacetanilide pesticides using ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and liquid chromatography/ion trap mass spectrometry." Rapid Commun Mass Spectrom **21**(24): 4017-22
- Peters, W. H. and H. M. Roelofs (1989). "Time-dependent activity and expression of glutathione S-transferases in the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2." Biochem J **264**(2): 613-6
- Pool-Zobel, B. L., V. Selvaraju, J. Sauer, T. Kautenburger, J. Kiefer, K. K. Richter, M. Soom and S. Wolfli (2005). "Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics." Carcinogenesis **26**(6): 1064-76
- Rao, C. V., K. Tokomo, G. Kelloff and B. S. Reddy (1991). "Inhibition by dietary oltipraz of experimental intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in male F344 rats." Carcinogenesis **12**(6): 1051-5

- Rinne, S., C. Ramstad Kleiveland, M. Kassem, T. Lea, E. Lundanes and T. Greibrokk (2007). "Fast and simple online sample preparation coupled with capillary LC-MS/MS for determination of prostaglandins in cell culture supernatants." J Sep Sci **30**(12): 1860-9
- Scharlau, D., A. Borowicki, N. Habermann, T. Hofmann, S. Klenow, C. Miene, U. Munjal, K. Stein and M. Gleis (2009). "Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre." Mutat Res
- Schettgen, T., A. Musiol, A. Alt and T. Kraus (2008). "Fast determination of urinary *S*-phenylmercapturic acid (*S*-PMA) and *S*-benzylmercapturic acid (*S*-BMA) by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **863**(2): 283-92
- Schmiedlin-Ren, P., K. E. Thummel, J. M. Fisher, M. F. Paine, K. S. Lown and P. B. Watkins (1997). "Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃." Mol Pharmacol **51**(5): 741-54
- Schmoldt A., J. Jacob and G. Grimmer (1981). "Dose-dependent induction of rat liver microsomal aryl hydrocarbon monooxygenase by benzo[*k*]fluoranthene." Cancer Lett **16**(3): 297-306
- Schnatter, A. R., K. Rosamilia and N. C. Wojcik (2005). "Review of the literature on benzene exposure and leukemia subtypes." Chem Biol Interact **153-154**: 9-21
- Scholz, K., W. Dekant, W. Volkel and A. Pahler (2005). "Rapid detection and identification of N-acetyl-L-cysteine thioethers using constant neutral loss and theoretical multiple reaction monitoring combined with enhanced product-ion scans on a linear ion trap mass spectrometer." J Am Soc Mass Spectrom **16**(12): 1976-84
- Seidel A., V.J. Soballa, G. Raab, H. Frank, H. Greim, G. Grimmer, J. Jacob and J. Doehmer (1998). "Regio- and stereoselectivity in the metabolism of benzo[*c*]phenanthrene mediated by genetically engineered V79 Chinese hamster cells expressing rat and human cytochromes P450." Environmental Toxicology and Pharmacology **5**: 179-196
- Selkirk, J. K., R. G. Croy and H. V. Gelboin (1976). "High-pressure liquid chromatographic separation of 10 benzo(*a*)pyrene phenols and the identification of 1-phenol and 7-phenol as new metabolites." Cancer Res **36**(3): 922-6
- Sims, P., P. L. Grover, A. Swaisland, K. Pal and A. Hewer (1974). "Metabolic activation of benzo(*a*)pyrene proceeds by a diol-epoxide." Nature **252**(5481): 326-8
- Slaga, T. J., W. J. Bracken, G. Gleason, W. Levin, H. Yagi, D. M. Jerina and A. H. Conney (1979). "Marked differences in the skin tumor-initiating activities of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo(*a*)pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides." Cancer Res **39**(1): 67-71
- Smith, C. A., G. O'Maille, E. J. Want, C. Qin, S. A. Trauger, T. R. Brandon, D. E. Custodio, R. Abagyan and G. Siuzdak (2005). "METLIN: a metabolite mass spectral database." Ther Drug Monit **27**(6): 747-51

- Spink, D. C., S. J. Wu, B. C. Spink, M. M. Hussain, D. D. Vakharia, B. T. Pentecost and L. S. Kaminsky (2008). "Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(*k*)fluoranthene and benzo(*a*)pyrene in T-47D human breast cancer cells: roles of PAH interactions and PAH metabolites." Toxicol Appl Pharmacol **226**(3): 213-24
- Srivastava, S. K., S. C. Watkins, E. Schuetz and S. V. Singh (2002). "Role of glutathione conjugate efflux in cellular protection against benzo[*a*]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-induced DNA damage." Mol Carcinog **33**(3): 156-62
- Sundberg, K., A. S. Johansson, G. Stenberg, M. Widersten, A. Seidel, B. Mannervik and B. Jernström (1998). "Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons." Carcinogenesis **19**(3):433-6
- Surh, Y. J. (2003). "Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals." Nat Rev Cancer **3**(10): 768-80
- Taipalensuu, J., H. Tornblom, G. Lindberg, C. Einarsson, F. Sjoqvist, H. Melhus, P. Garberg, B. Sjoström, B. Lundgren and P. Artursson (2001). "Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers." J Pharmacol Exp Ther **299**(1): 164-70
- Tamura, H. O., K. Taniguchi, E. Hayashi, Y. Hiyoshi and F. Nagai (2001). "Expression profiling of sulfotransferases in human cell lines derived from extra-hepatic tissues." Biol Pharm Bull **24**(11): 1258-62
- Tanigawa, S., M. Fujii and D. X. Hou (2007). "Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin." Free Radic Biol Med **42**(11): 1690-703
- Tareke, E., P. Rydberg, P. Karlsson, S. Eriksson and M. Tornqvist (2002). "Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs." J Agric Food Chem **50**(17): 4998-5006
- Thakker, D. R., H. Yagi, H. Akagi, M. Koreeda, A. H. Lu, W. Levin, A. W. Wood, A. H. Conney and D. M. Jerina (1977). "Metabolism of benzo[*a*]pyrene. VI. Stereoselective metabolism of benzo[*a*]pyrene and benzo[*a*]pyrene 7,8-dihydrodiol to diol epoxides." Chem Biol Interact **16**(3): 281-300
- ThermoQuest TSQ/SSQ Hardware Manual: Mass Spectrometer, Revision A 70001-97104, 1999
- Verhoef, J., A. Prins, H. D. Veldhuis and A. Witter (1982). "H-Pro-[3H]Leu-Gly-NH₂: plasma profile and brain uptake following subcutaneous injection in the rat." J Neurochem **38**(4): 1135-8
- Verordnung (EG) Nr. 208/2005 der Kommission vom 4. Februar 2005 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 im Hinblick auf polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

- Wagner S., K. Scholz, M. Donegan, L. Burton, J. Wingate and W. Völkel (2006). "Metabonomics and biomarker discovery: LC-MS metabolic profiling and constant neutral loss scanning combined with multivariate data analysis for mercapturic acid analysis." Anal Chem **78**(4):1296-305
- Wattenberg, L. W. and E. Bueding (1986). "Inhibitory effects of 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione (Oltipraz) on carcinogenesis induced by benzo[a]pyrene, diethylnitrosamine and uracil mustard." Carcinogenesis **7**(8): 1379-81
- Watzl B. and G. Rechkemmer (2001). "Flavonoide." Ernährungs-Umschau 48, Heft 12: 498-502
- Weiss, J., D. Theile, N. Ketabi-Kiyanvash, H. Lindenmaier and W. E. Haefeli (2007). "Inhibition of MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, and MRP3/ABCC3 by nucleoside, nucleotide, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors." Drug Metab Dispos **35**(3): 340-4
- Wen, B., L. Ma, S. D. Nelson and M. Zhu (2008). "High-throughput screening and characterization of reactive metabolites using polarity switching of hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry." Anal Chem **80**(5): 1788-99
- Werner, M., G. Birner and W. Dekant (1996). "Sulfoxidation of mercapturic acids derived from tri- and tetrachloroethene by cytochromes P450 3A: a bioactivation reaction in addition to deacetylation and cysteine conjugate beta-lyase mediated cleavage." Chem Res Toxicol **9**(1): 41-9
- Willoughby R., Sheehan E. and Mitrovich S. (1998). "A global view of LC/MS", Global View Publishing, Pittsburgh, Pennsylvania.
- Wilms, L. C., P. C. Hollman, A. W. Boots and J. C. Kleinjans (2005). "Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes." Mutat Res **582**(1-2): 155-62
- World Cancer Research Fund /American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington, DC: AICR, 2007
- Zaman, G. J., J. Lankelma, O. van Tellingen, J. Beijnen, H. Dekker, C. Paulusma, R. P. Oude Elferink, F. Baas and P. Borst (1995). "Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7690-4

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus der chemischen Kanzerogenese	2
Abbildung 2: Strukturformeln der PAK B[a]P, DB[a,l]P und B[c]Phe.....	4
Abbildung 3: Metabolisierungswege des B[a]P.....	5
Abbildung 4: Ausgewählte Metabolisierungswege von Benzol und Toluol.....	6
Abbildung 5: GSH-Konjugation und Mercaptursäurebildung	8
Abbildung 6: Transwell TM -System.....	12
Abbildung 7: Aufbau und Funktionsweise eines Massenpektrometers	13
Abbildung 8: MS-Spektrum von Glutathion bei negativer Ionisierung.....	14
Abbildung 9: Scan-Modi LC-MS/MS.....	16
Abbildung 10: Quercetin, Oltipraz, Butyrat und Benzo[k]fluoranthen.....	25
Abbildung 11: Ko143, MK571	25
Abbildung 12: (7R,8S,9S,10S)-BPD-SG, (7S,8R,9R,10R)-BPD-SG, 1-MP-SG.....	27
Abbildung 13: 7,8-Diol-B[a]P, BPDE	28
Abbildung 14: Probenvorbereitung (<i>Clean-Up</i>) BPD-SG	28
Abbildung 15: (11R,12S,13S,14S)-DBPD-SG, (11S,12R,13R,14R)-DBPD-SG.....	30
Abbildung 16: DB[a,l]P-11,12-diol, DBPDE	30
Abbildung 17: (1S,2S,3S,4R)-BcPheD-SG, (1R,2R,3R,4S)-BcPheD-SG	32
Abbildung 18: 3,4-Diol-B[c]Phe, BcPheDE	32
Abbildung 19: DB[a,l]P-Metaboliten	34
Abbildung 20: Probenvorbereitung (<i>Clean-Up</i>) DB[a,l]P.....	35
Abbildung 21: B[a]P-Metaboliten	36
Abbildung 22: B[c]Phe-Metaboliten.....	38
Abbildung 23: Mercaptursäuren.....	40
Abbildung 24: Probenvorbereitung (<i>Clean-Up</i>) Mercaptursäuren	41
Abbildung 25: Charakteristische m/z der Fragmente des Glutathions.....	43
Abbildung 26: Fragmentierungsschema von Glutathion (ESI-negativ).....	44
Abbildung 27: Bildung von Glutathionkonjugaten des BPDE ausgehend vom B[a]P.....	45
Abbildung 28: MS-Spektrum des BPD-SG (ESI-negativ, DAU-Modus).....	46
Abbildung 29: BPD-SG-Kalibrierlösung und BPD-SG-Mediumprobe im SIM-Modus	47
Abbildung 30: BPD-SG-Proben, Medium- <i>Blank</i> -Kontrolle und BPD-SG-Kalibrierlösung ...	48
Abbildung 31: MS-Spektrum des BPD-SG einer Mediumprobe.....	49
Abbildung 32: GSH-Fragment m/z 272 (ESI-negativ)	49
Abbildung 33: MS-Spektrum des 1-MP-SG (ESI-negativ, DAU-Modus)	50
Abbildung 34: Chromatogramm-Ausschnitte einer BPD-SG-Mediumprobe (SRM-Modus) .	51
Abbildung 35: Beispielchromatogramm einer BPD-SG-Kalibrierlösung	52
Abbildung 36: Beispielchromatogramm einer BPD-SG-Kalibrierlösung (Ausschnitte).....	53
Abbildung 37: Beispielchromatogramme Mediumprobe und Zellextraktprobe	54
Abbildung 38: BPD-SG-Konjugate im Zellextrakt.....	55
Abbildung 39: BPD-SG-Konjugate im Medium.....	56
Abbildung 40: BPD-SG-Konjugate: Oltipraz-, Butyrat- und Quercetin-Einfluss	58
Abbildung 41: BPD-SG-Konjugate: Ko143- und MK571-Einfluss	60
Abbildung 42: BPD-SG-Konjugate nach Inkubation mit BPDE	61
Abbildung 43: HPLC-FL-Chromatogramm der B[a]P-Metaboliten	62
Abbildung 44: B[a]P-Metabolitenprofil im Zellextrakt und im Medium	63
Abbildung 45: B[a]P-Metaboliten: Oltipraz-, Quercetin-, Butyrat- und B[k]F-Einfluss.....	65

Abbildung 46: MS-Spektrum des DBPD-SG (ESI-negativ, DAU-Modus).....	66
Abbildung 47: Beispielchromatogramm einer DBPD-SG-Kalibrierlösung.....	67
Abbildung 48: Beispielchromatogramme DBPD-SG-Kalibrierlösung und Mediumprobe	68
Abbildung 49: DBPD-SG-Chromatogramme unterschiedlicher Inkubationsansätze	69
Abbildung 50: DBPD-SG-Konjugate im Zellextrakt und im Medium	70
Abbildung 51: DBPD-SG-Konjugate im Transwell TM -System.	72
Abbildung 52: HPLC-Chromatogramm der DB[<i>a,l</i>]P-Metaboliten	73
Abbildung 53: HPLC-Chromatogramm einer Mediumprobe	74
Abbildung 54: DB[<i>a,l</i>]P-Metaboliten im Zellextrakt.....	76
Abbildung 55: DB[<i>a,l</i>]P-Metaboliten: Oltipraz-, Quercetin-, Butyrat- und B[<i>k</i>]F-Einfluss....	77
Abbildung 56: DB[<i>a,l</i>]P-Metaboliten: Ko143- und MK571-Einfluss	78
Abbildung 57: Chromatogramm einer DB[<i>a,l</i>]P-Mediumprobe und MS-Spektrum	79
Abbildung 58: MS-Spektrum des BcPheD-SG (ESI-negativ, DAU-Modus)	80
Abbildung 59: MS-Spektrum des L-Glutathions (ESI-positiv, DAU-Modus)	81
Abbildung 60: Fragmentierungsschema von Glutathion (ESI-positiv).....	82
Abbildung 61: MS-Spektrum des BcPheD-SG einer Mediumprobe (ESI-positiv)	83
Abbildung 62: MS-Spektrum des BcPheD-SG (ESI-positiv, PAR-Modus).....	84
Abbildung 63: MS-Spektrum des 1-MP-SG (ESI-positiv, DAU- und PAR-Modus).....	85
Abbildung 64: Beispielchromatogramm einer BcPheD-SG Kalibrierlösung	86
Abbildung 65: Beispielchromatogramme BcPheD-SG-Kalibrierlösung und Mediumprobe ..	87
Abbildung 66: Chromatogramme BcPheD-SG, Dotierung einer Probelösung.....	88
Abbildung 67: BcPheD-SG-Konjugate im Medium	89
Abbildung 68: BcPheD-SG-Konjugate im Medium und im Zellextrakt	90
Abbildung 69: HPLC-Chromatogramm der B[<i>c</i>]Phe-Metaboliten	91
Abbildung 70: B[<i>c</i>]Phe-Metabolitenprofil im Zellextrakt und im Medium	92
Abbildung 71: Chromatogramm einer B[<i>c</i>]Phe-Mediumprobe und MS-Spektrum.....	94
Abbildung 72: MS-Spektren <i>S</i> -PMA, <i>S</i> -PMA- <i>d</i> ₅ , <i>S</i> -BMA und <i>S</i> -NMA.....	95
Abbildung 73: Beispielchromatogramm Mercaptursäure-Kalibrierlösung.....	96
Abbildung 74: Beispielchromatogramme Mercaptursäure-Kalibrierlösung und Urinprobe ...	97
Abbildung 75: <i>S</i> -PMA-Konzentrationen im Urin	99
Abbildung 76: <i>S</i> -BMA-Konzentrationen im Urin	100
Abbildung 77: Bildung und Transport der BPD-SG-Konjugate im Transwell TM -System.....	108
Abbildung 78: Bildung von (11 <i>R</i> ,12 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)- und (11 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i>)-DBPD-SG.....	111
Abbildung 79: Säure-katalysierte Umsetzung der prä- <i>S</i> -PMA zur <i>S</i> -PMA.....	117
Abbildung 80: BPD-SG-Peaks zur Optimierung der Kollisionsenergie	139
Abbildung 81: MS-Spektren des BPD-SG bei verschiedenen Kollisionsenergien	140
Abbildung 82: Abhängigkeit des <i>m/z</i> 272 (BPD-SG) von der Kollisionsenergie	141
Abbildung 83: DBPD-SG-Peaks zur Optimierung der Kollisionsenergie	144
Abbildung 84: MS-Spektren des DBPD-SG bei verschiedenen Kollisionsenergien.....	145
Abbildung 85: Abhängigkeit des <i>m/z</i> 272 (DBPD-SG) von der Kollisionsenergie	146
Abbildung 86: UV-Spektren DB[<i>a,l</i>]P-Metaboliten	150
Abbildung 87: UV-Spektren B[<i>c</i>]Phe-Metaboliten.....	154
Abbildung 88: Qualitativer Nachweis weiterer Mercaptursäuren.....	158

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HPLC-Bedingungen BPD-SG.....	29
Tabelle 2: HPLC-Bedingungen DBPD-SG.....	31
Tabelle 3: HPLC-Bedingungen BcPhe-SG.....	33
Tabelle 4: HPLC-Bedingungen DB[a,l]P-Metaboliten.....	35
Tabelle 5: HPLC-Bedingungen B[a]P-Metaboliten.....	37
Tabelle 6: HPLC-Bedingungen B[c]Phe-Metaboliten.....	39
Tabelle 7: HPLC-Bedingungen Mercaptursäuren.....	41
Tabelle 8: Wiederfindungsraten für BPD-SG.....	143
Tabelle 9: Wiederholbarkeiten für BPD-SG.....	143
Tabelle 10: Wiederfindungsraten für DBPD-SG.....	147
Tabelle 11: Wiederholbarkeiten für DBPD-SG.....	148
Tabelle 12: Wiederfindungsraten für BcPheD-SG.....	149
Tabelle 13: Wiederholbarkeiten für BcPheD-SG.....	149
Tabelle 14: NG und BG der DB[a,l]P-Metaboliten.....	151
Tabelle 15: Wiederfindungsraten für die DB[a,l]P-Metaboliten.....	151
Tabelle 16: Wiederholbarkeiten für die DB[a,l]P-Metaboliten.....	151
Tabelle 17: NG und BG der B[a]P-Metaboliten.....	152
Tabelle 18: Wiederfindungsraten für die B[a]P-Metaboliten.....	152
Tabelle 19: Wiederholbarkeiten für die B[a]P-Metaboliten.....	153
Tabelle 20: NG und BG der B[c]Phe-Metaboliten.....	154
Tabelle 21: Wiederfindungsraten für die B[c]Phe-Metaboliten.....	155
Tabelle 22: Wiederholbarkeiten für die B[c]Phe-Metaboliten.....	155
Tabelle 23: Wiederfindungsraten für Mercaptursäuren.....	156
Tabelle 24: Wiederholbarkeiten für Mercaptursäuren.....	157

10 Anhang

10.1	Validierungsexperimente	139
10.1.1	BPD-SG.....	139
10.1.1.1	Optimierung der Kollisionsenergie am Massenspektrometer	139
10.1.1.2	Abschätzung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NG und BG) ..	142
10.1.1.3	NG und BG bei Mediumproben	142
10.1.1.4	NG und BG bei Zellextraktproben	142
10.1.1.5	NG und BG bei Transwell TM -Mediumproben.....	142
10.1.1.6	Bestimmung der Wiederfindung	143
10.1.1.7	Bestimmung der Wiederholbarkeit	143
10.1.2	DBPD-SG.....	144
10.1.2.1	Optimierung der Kollisionsenergie am Massenspektrometer	144
10.1.2.2	Abschätzung der NG und BG.....	147
10.1.2.3	Bestimmung der Wiederfindung	147
10.1.2.4	Bestimmung der Wiederholbarkeit	147
10.1.3	BcPheD-SG	148
10.1.3.1	Optimierung der Kollisionsenergie am Massenspektrometer	148
10.1.3.2	Abschätzung der NG und BG.....	148
10.1.3.3	Bestimmung der Wiederfindung	149
10.1.3.4	Bestimmung der Wiederholbarkeit	149
10.1.4	DB[a,l]P-Metaboliten.....	150
10.1.4.1	UV-Spektren.....	150
10.1.4.2	Abschätzung der NG und BG.....	150
10.1.4.3	Bestimmung der Wiederfindung	151
10.1.4.4	Bestimmung der Wiederholbarkeit	151
10.1.5	B[a]P-Metaboliten.....	152
10.1.5.1	Abschätzung der NG und BG.....	152
10.1.5.2	Bestimmung der Wiederfindung	152
10.1.5.3	Bestimmung der Wiederholbarkeit	153
10.1.6	B[c]Phe-Metaboliten	153
10.1.6.1	UV-Spektren.....	153
10.1.6.2	Abschätzung der NG und BG.....	154
10.1.6.3	Bestimmung der Wiederfindung	155
10.1.6.4	Bestimmung der Wiederholbarkeit	155
10.1.7	Mercaptursäuren.....	156
10.1.7.1	Abschätzung der NG und BG.....	156
10.1.7.2	Bestimmung der Wiederfindung	156
10.1.7.3	Bestimmung der Wiederholbarkeit	157
10.1.8	Selektivität.....	157
10.2	Qualitativer Nachweis weiterer Mercaptursäuren.....	158
10.3	Publikationen.....	159
10.4	Curriculum Vitae.....	161
10.5	Danksagung.....	162
10.6	Erklärung zur Dissertation	163

10.1 Validierungsexperimente

10.1.1 BPD-SG

10.1.1.1 Optimierung der Kollisionsenergie am Massenspektrometer

Um eine hohe Detektionsempfindlichkeit der Analyten zu erzielen, wurde eine BPD-SG-Lösung mehrmals mit unterschiedlich gewählten Kollisionsenergien im MS/MS-DAU-Modus sowie im MS/MS-SRM-Modus an der LC-MS vermessen.

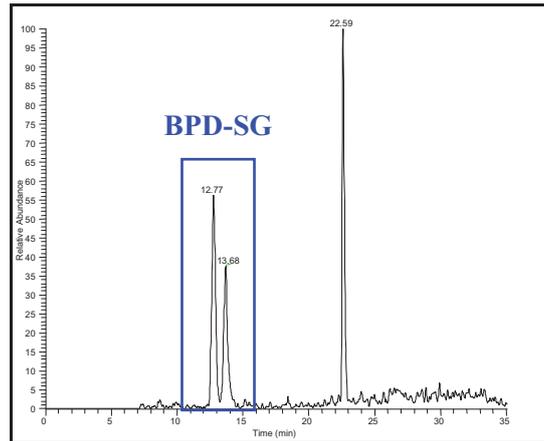
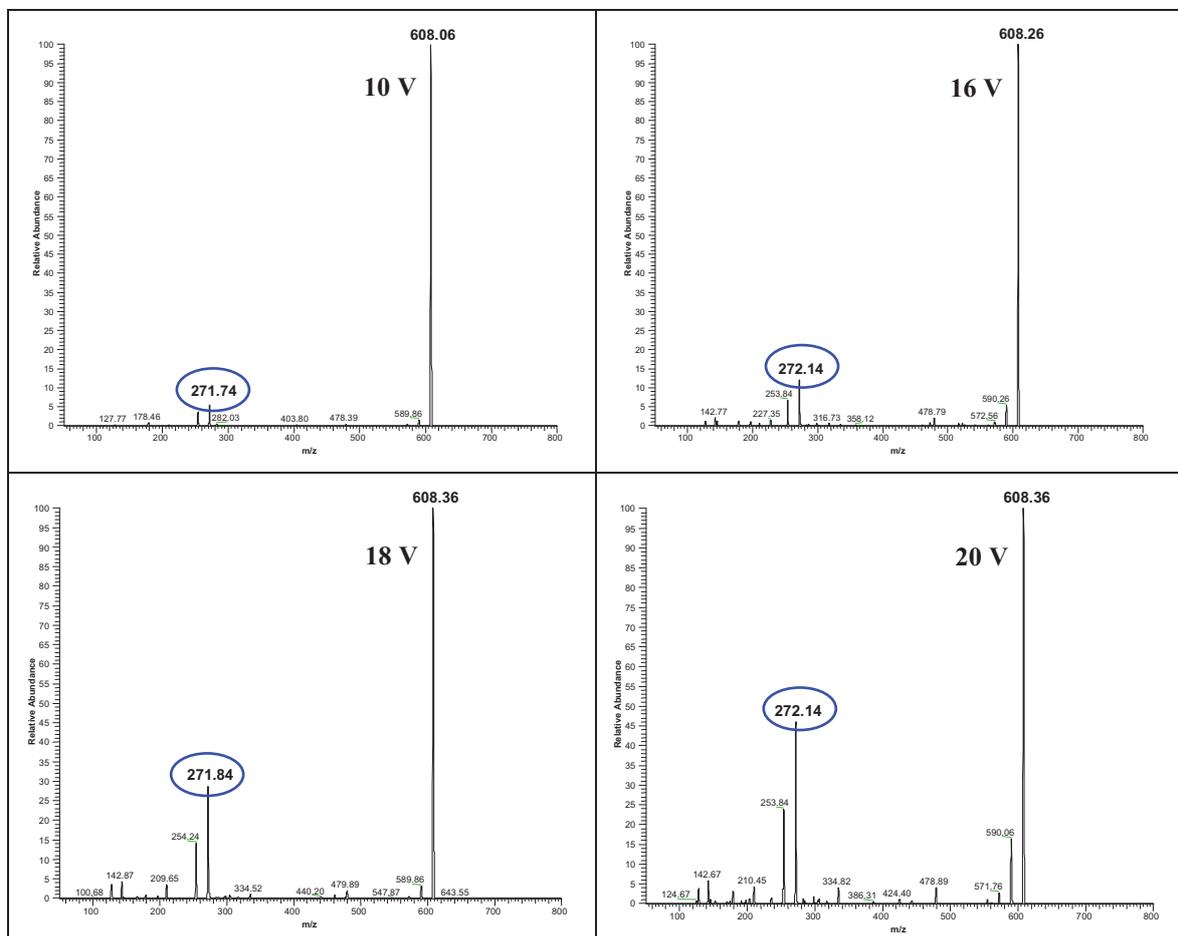


Abbildung 80: Untersuchte BPD-SG-Peaks einer Kalibrierlösung zur Optimierung der Kollisionsenergie



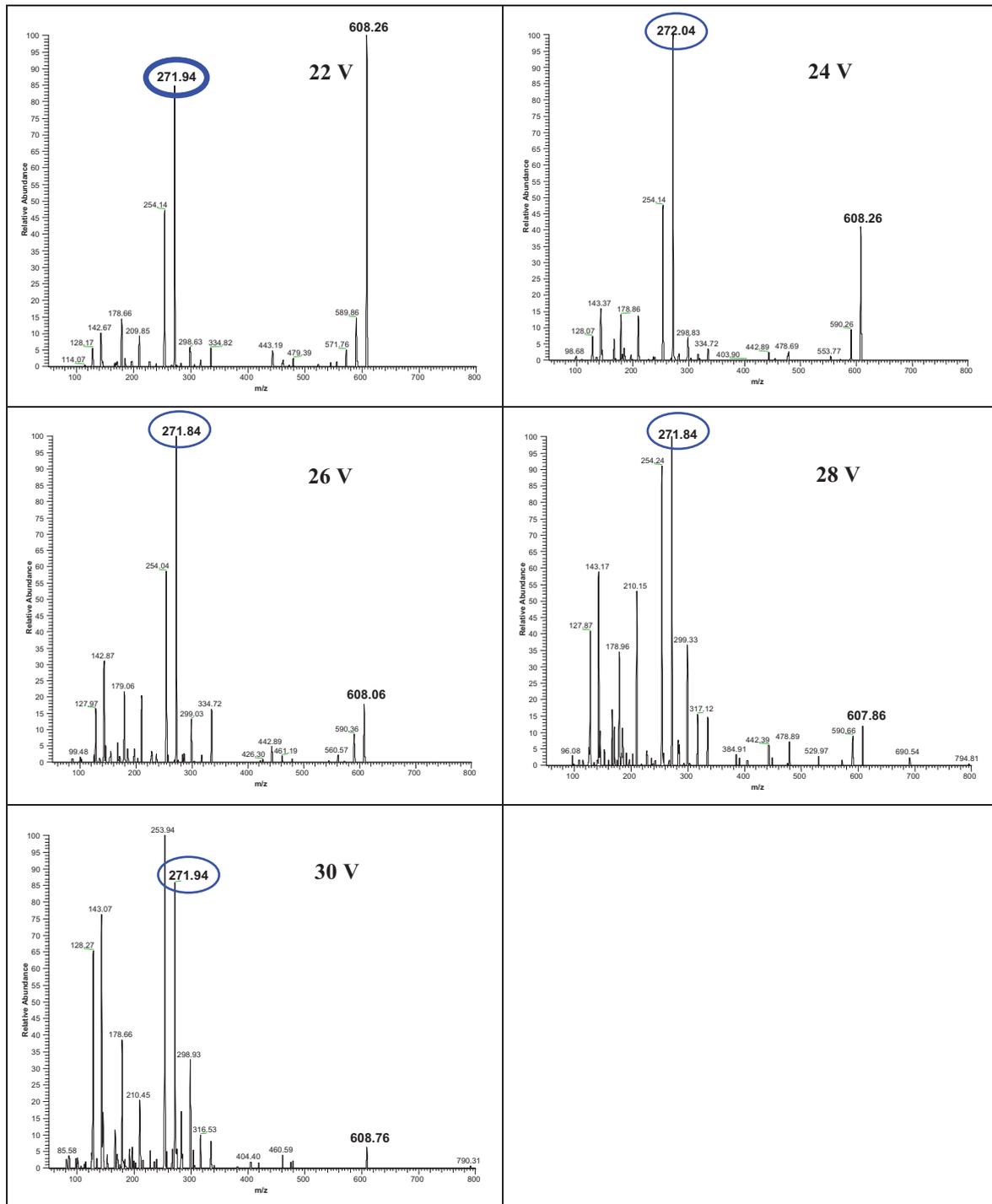


Abbildung 81: MS-Spektren des BPD-SG bei verschiedenen Kollisionsenergien (*Collision cell offset voltage*, Coff) im DAU-Modus. Um eine möglichst hohe Empfindlichkeit bezüglich der Detektion der Analyten zu erzielen, wurde eine BPD-SG-Lösung mehrmals mit jeweils unterschiedlich gewählten Kollisionsenergien im MS/MS-DAU-Modus an der LC-MS vermessen.

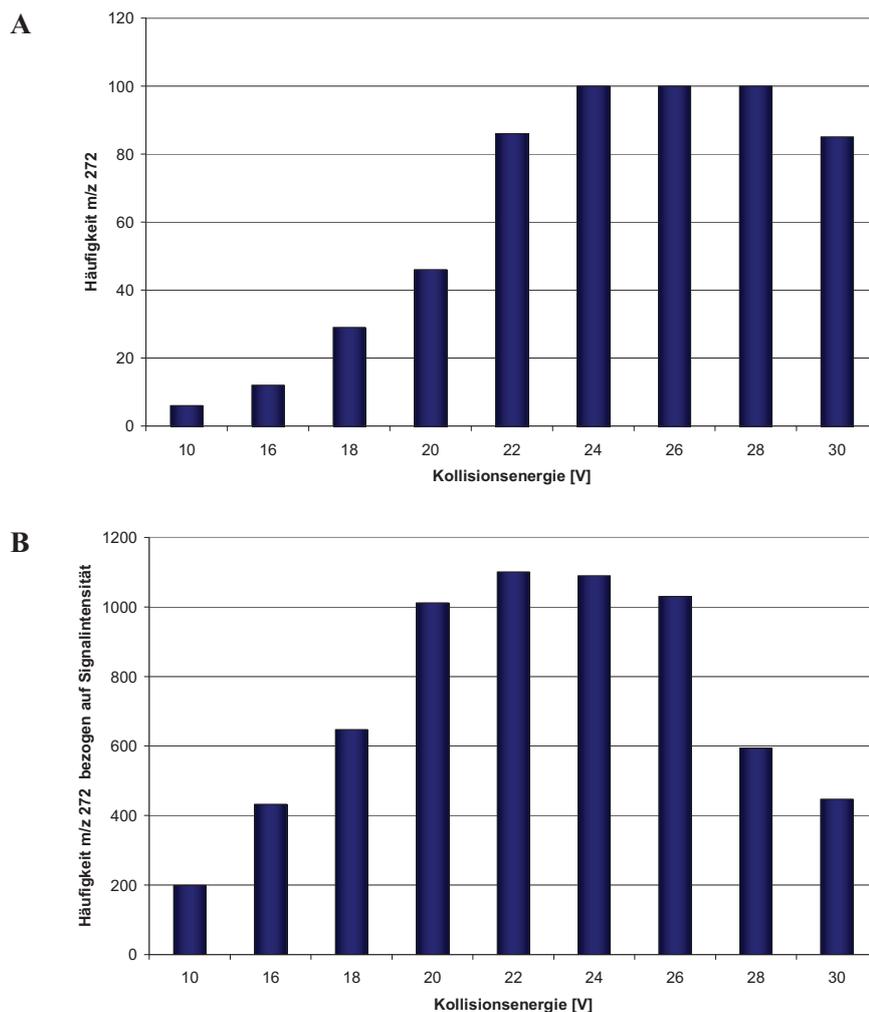


Abbildung 82: (A) Abhängigkeit der Bildung des Fragments m/z 272 von der Kollisionsenergie. Aus den im DAU-Modus aufgenommenen MS-Spektren ergaben sich die aufgeführten Abhängigkeiten des Fragments m/z 272 von der eingestellten Kollisionsenergie, (B) Abhängigkeit der Signalintensität des Fragments m/z 272 von der Kollisionsenergie.

Im MS/MS-DAU-Modus lässt sich die relative Menge des Fragments m/z 272 in Abhängigkeit von der Kollisionsenergie (*Collision cell offset voltage*, Coff) darstellen. Bei geringer Kollisionsenergie war fast ausschließlich das Molekül-Ion (m/z 608) vorhanden, bei steigender Energie nahm der Anteil des Fragments m/z 272 zu und bei zu hoher Energie sank die Intensität des Fragments m/z 272 aufgrund der Entstehung kleinerer Fragmente.

In Abbildung 82 (A) wird deutlich, dass bei einer Kollisionsenergie von 24 bis 28 V das prozentuale Auftreten für m/z 272 am höchsten war. Unter Einbeziehung der absoluten Intensitäten in der MS-Anzeige, das heißt der Empfindlichkeit, ergab sich jedoch ein anderes Bild. Dieses zeigt Abbildung 82 (B), wobei eine Kollisionsenergie von 22 V für die Fragmenthäufigkeit von m/z 272 bezogen auf die absolute Signalintensität den höchsten Wert erzielte. Daher wurde für die Bestimmung der BPD-SG-Konjugate die Einstellung m/z 608 → 272 (22 V) für die SRM-Methode gewählt. Die unter gleichen Bedingungen aufgenommenen LC-MS/MS-SRM-Läufe, ebenfalls mit unterschiedlichen Kollisionsenergien,

bestätigten zusätzlich die höchste Signalintensität für den Analyten bei einer Energie von 22 V.

Für die optimalen Einstellungen des Fragments m/z 272 bei der Fragmentierung des internen Standards 1-MP-SG wurde analog dem BPD-SG verfahren.

10.1.1.2 Abschätzung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NG und BG)

Die Determination der NG und BG erfolgte durch Aufarbeitung eines mit BPD-SG und internem Standard dotierten *Blank*-Mediums beziehungsweise eines dotierten *Blank*-Zellextraktes. Der Aufarbeitungsrückstand wurde in einem definierten Volumen eines Methanol/Wasser-Gemisches (40:60, v/v) aufgenommen. Von dieser Lösung wurden Verdünnungen angesetzt, die anschließend an der LC-MS vermessen wurden. Ein etwa 3-faches Signal/Rausch (S/N)-Verhältnis wurde für die NG vorgesehen, ein etwa 10-faches S/N-Verhältnis entsprach der BG.

Je nach Probenvolumen ergab sich durch die Aufarbeitung ein in die Berechnungen einbezogener Aufkonzentrierungsfaktor der Analyten, der bei steigender Volumengröße empfindlichere NG und BG zur Folge hatte.

10.1.1.3 NG und BG bei Mediumproben

Von der dotierten Mediumprobe (Probenvolumen 1 l) wurden im Anschluss an das *Clean-Up* Lösungen unterschiedlicher Verdünnungsstufen hergestellt, die zu folgenden NG und BG führten:

(7R,8S,9S,10S)-BPD-SG: NG 0,004 ng/ml und BG 0,008 ng/ml

(7S,8R,9R,10R)-BPD-SG: NG 0,003 ng/ml und BG 0,006 ng/ml

10.1.1.4 NG und BG bei Zellextraktproben

Von dem dotierten Zellextrakt (Probenvolumen 4 ml) wurden nach der Aufarbeitung Lösungen unterschiedlicher Verdünnungsstufen hergestellt, die folgende NG und BG ergaben:

(7R,8S,9S,10S)-BPD-SG: NG 0,026 ng/ml und BG 0,041 ng/ml

(7S,8R,9R,10R)-BPD-SG: NG 0,020 ng/ml und BG 0,041 ng/ml

10.1.1.5 NG und BG bei TranswellTM-Mediumproben

Vom dotierten TranswellTM-Medium (Probenvolumen 2 ml) wurden nach dem *Clean-Up* unterschiedlich stark verdünnte Lösungen hergestellt, die zu folgenden NG und BG führten:

(7R,8S,9S,10S)-BPD-SG: NG 0,016 ng/ml und BG 0,039 ng/ml

(7S,8R,9R,10R)-BPD-SG: NG 0,013 ng/ml und BG 0,038 ng/ml

10.1.1.6 Bestimmung der Wiederfindung

Die Ermittlung der Wiederfindung wurde mittels sechsfacher SPE-Aufarbeitung eines mit BPD-SG und internem Standard dotierten *Blank*-Mediums durchgeführt. Der ermittelte BPD-SG-Gehalt wurde jeweils mit dem Soll-Wert verglichen. Dabei zeigten sich die in der Tabelle 8 aufgeführten Ergebnisse.

Tabelle 8: Wiederfindungsraten für BPD-SG

[ng/ml]	(7R,8S,9S,10S)-BPD-SG			(7S,8R,9R,10R)-BPD-SG		
	IST	SOLL	%	IST	SOLL	%
Aufarbeitung 1	10,51	10,51	100,0	7,97	8,10	98,4
Aufarbeitung 2	10,77	10,51	102,5	8,34	8,10	103,0
Aufarbeitung 3	10,76	10,51	102,4	8,24	8,10	101,7
Aufarbeitung 4	10,45	10,51	99,4	8,09	8,10	99,9
Aufarbeitung 5	10,81	10,51	102,9	8,44	8,10	104,2
Aufarbeitung 6	10,41	10,51	99,0	8,07	8,10	99,6
MW			101,2			101,7

Die Wiederfindungen betragen für (7R,8S,9S,10S)-BPD-SG 101,2 % sowie für (7S,8R,9R,10R)-BPD-SG 101,7 %.

10.1.1.7 Bestimmung der Wiederholbarkeit

Zur Ermittlung der Wiederholbarkeit diente ebenfalls die sechsfache SPE-Aufarbeitung eines mit BPD-SG und internem Standard dotierten *Blank*-Mediums (Tab. 9).

Tabelle 9: Wiederholbarkeiten für BPD-SG

[ng/ml]	(7R,8S,9S,10S)-BPD-SG	(7S,8R,9R,10R)-BPD-SG
Aufarbeitung 1	10,51	7,97
Aufarbeitung 2	10,77	8,34
Aufarbeitung 3	10,76	8,24
Aufarbeitung 4	10,45	8,09
Aufarbeitung 5	10,81	8,44
Aufarbeitung 6	10,41	8,07
MW	10,62	8,19
SD	0,18	0,18
VK [%]	1,70	2,19

Die hieraus bestimmten Mittelwerte gaben Auskunft über die Qualität der Wiederholbarkeit für diese Analysenmethode. Die Wiederholbarkeit der vorliegenden Methode repräsentierte mit Variationskoeffizienten von 1,70 % für (7R,8S,9S,10S)-BPD-SG und 2,19 % für (7S,8R,9R,10R)-BPD-SG ein robustes Verfahren.

10.1.2 DBPD-SG

10.1.2.1 Optimierung der Kollisionsenergie am Massenspektrometer

Zur Erzielung einer hohen Empfindlichkeit hinsichtlich der Detektion der Analyten wurde eine DBPD-SG-Lösung mehrmals mit unterschiedlich gewählten Kollisionsenergien im MS/MS-DAU-Modus sowie im MS/MS-SRM-Modus an der LC-MS vermessen.

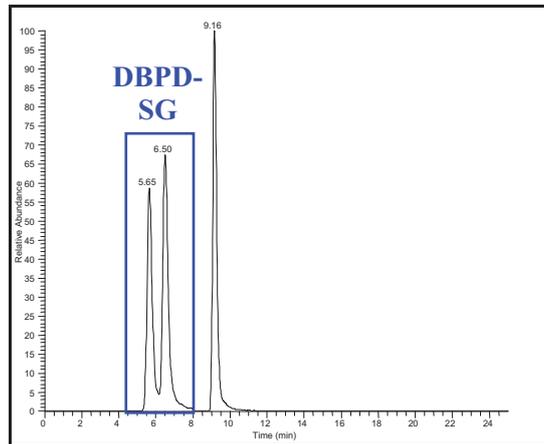
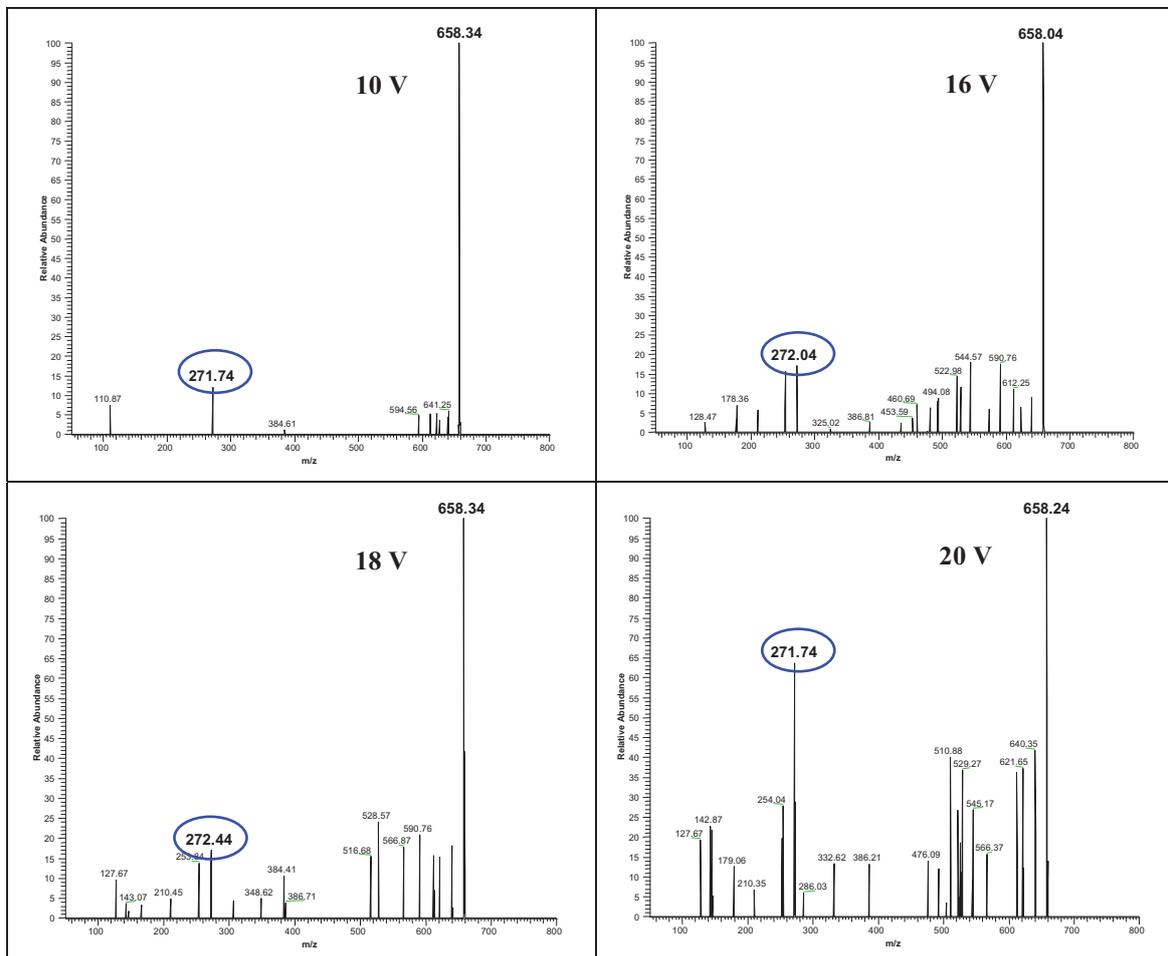


Abbildung 83: Für die Optimierung der Kollisionsenergie untersuchte DBPD-SG-Peaks einer DBPD-SG-Kalibrierlösung



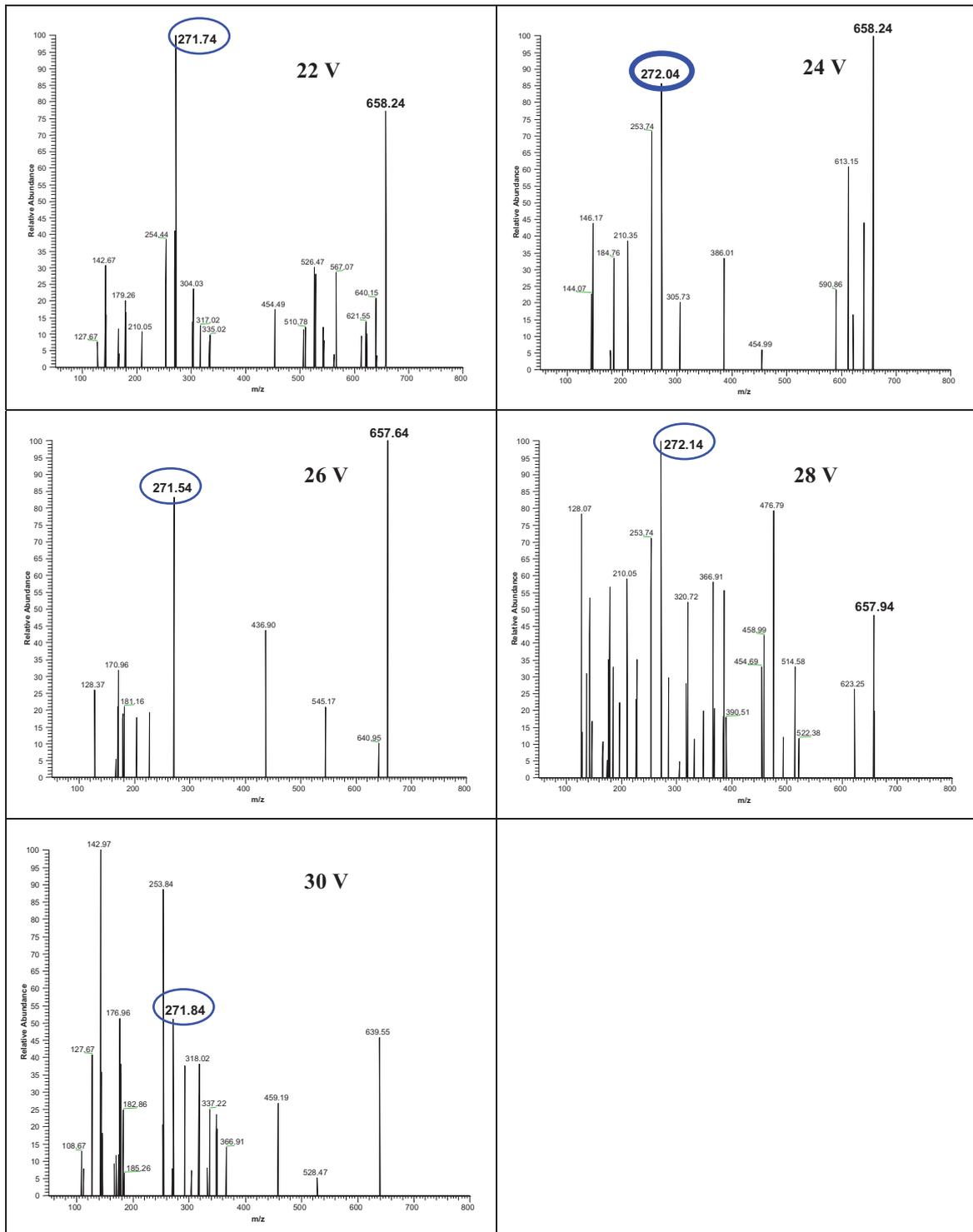


Abbildung 84: MS-Spektren des DBPD-SG bei verschiedenen Kollisionsenergien (*Collision cell offset voltage, Coff*) im DAU-Modus

Die in Abbildung 84 gezeigten MS-Spektren gaben Aufschluss über die Abhängigkeit der Bildung des Fragments m/z 272 von der Kollisionsenergie.

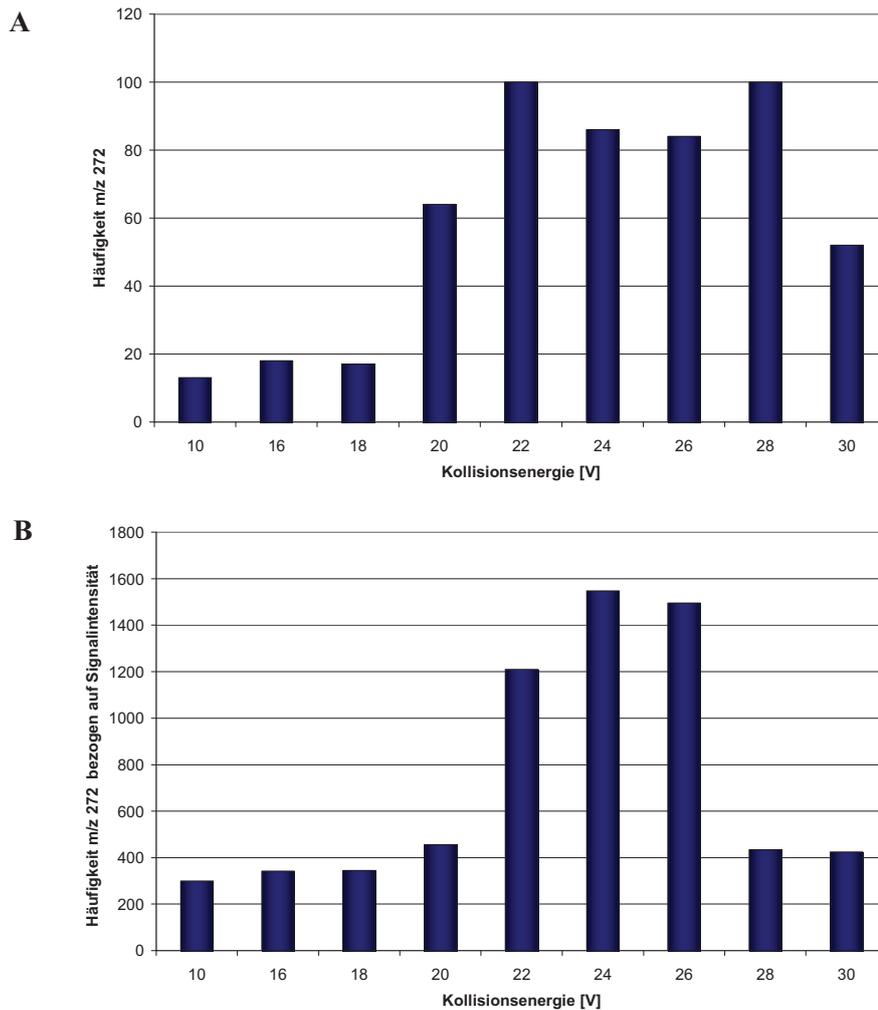


Abbildung 85: (A) Abhängigkeit der Bildung des Fragments m/z 272 von der Kollisionsenergie, (B) Abhängigkeit der Signalintensität des Fragments m/z 272 von der Kollisionsenergie

Die relative Menge des Fragments m/z 272 in Abhängigkeit von der Kollisionsenergie (*Collision cell offset voltage, Coff*) lässt sich im MS/MS-DAU-Modus darstellen. Bei geringer Kollisionsenergie war fast ausschließlich das Molekül-Ion m/z 658 vorhanden, bei höherer Energie stieg der Anteil des Fragments m/z 272 an und bei zu starker Energie nahm die Intensität des Fragments m/z 272 zugunsten der Entstehung kleinerer Fragmente wieder ab.

Abbildung 85 (A) verdeutlicht, dass bei einer Kollisionsenergie von 22 bis 28 V das prozentuale Auftreten für m/z 272 am höchsten war. Unter Berücksichtigung der absoluten Intensitäten in der MS-Anzeige, das heißt der Empfindlichkeit, ergab sich die in Abbildung 85 (B) gezeigte Graphik. Hierbei resultierte bei einer Kollisionsenergie von 24 V für die Fragmenthäufigkeit von m/z 272 bezogen auf die absolute Signalintensität der höchste Wert. Folglich wurde für die Analytik der DBPD-SG-Konjugate die Einstellung m/z 658 → 272 (24 V) für die SRM-Methode gewählt. Die unter gleichen Bedingungen aufgenommenen LC-MS/MS-SRM-Läufe, ebenfalls mit unterschiedlichen Kollisionsenergien,

bestätigten zusätzlich die höchste Signalintensität für den Analyten bei einer Energie von 24 V.

10.1.2.2 Abschätzung der NG und BG

Die Bestimmung der NG und BG erfolgte durch Aufarbeitung eines mit DBPD-SG und internem Standard dotierten *Blank*-Mediums (Probenvolumen 2 ml). Der Aufarbeitungsrückstand wurde in einem definierten Volumen eines Methanol/Wasser-Gemisches (40:60, v/v) gelöst. Von dieser Lösung wurden Verdünnungen angesetzt, die an der LC-MS vermessen wurden und zu folgenden NG und BG führten:

(11R,12S,13S,14S)-DBPD-SG: NG 0,022 ng/ml und BG 0,055 ng/ml

(11S,12R,13R,14R)-DBPD-SG: NG 0,024 ng/ml und BG 0,050 ng/ml

10.1.2.3 Bestimmung der Wiederfindung

Die Ermittlung der Wiederfindung erfolgte mittels sechsfacher SPE-Aufarbeitung eines mit DBPD-SG und internem Standard dotierten *Blank*-Mediums. Der resultierende DBPD-SG-Gehalt wurde jeweils mit dem Soll-Wert verglichen. Dabei ergaben sich die in der Tabelle 10 aufgeführten Ergebnisse.

Tabelle 10: Wiederfindungsraten für DBPD-SG

[ng/ml]	(11R,12S,13S,14S)-DBPD-SG			(11S,12R,13R,14R)-DBPD-SG		
	IST	SOLL	%	IST	SOLL	%
Aufarbeitung 1	5,70	5,54	102,9	6,28	6,03	104,1
Aufarbeitung 2	5,63	5,54	101,7	6,12	6,03	101,5
Aufarbeitung 3	5,46	5,54	98,5	6,02	6,03	99,8
Aufarbeitung 4	5,77	5,54	104,1	6,25	6,03	103,7
Aufarbeitung 5	5,78	5,54	104,3	5,95	6,03	98,6
Aufarbeitung 6	5,67	5,54	102,4	6,32	6,03	104,8
MW			102,3			102,1

Die Wiederfindungen betragen für (11R,12S,13S,14S)-DBPD-SG 102,3 % sowie für (11S,12R,13R,14R)-DBPD-SG 102,1 %.

10.1.2.4 Bestimmung der Wiederholbarkeit

Zur Ermittlung der Wiederholbarkeit diente ebenfalls die sechsfache SPE-Aufarbeitung eines mit DBPD-SG und internem Standard dotierten *Blank*-Mediums (Tab. 11).

Tabelle 11: Wiederholbarkeiten für DBPD-SG

[ng/ml]	(11 <i>R</i> ,12 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-DBPD-SG	(11 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i>)-DBPD-SG
Aufarbeitung 1	5,70	6,28
Aufarbeitung 2	5,63	6,12
Aufarbeitung 3	5,46	6,02
Aufarbeitung 4	5,77	6,25
Aufarbeitung 5	5,78	5,95
Aufarbeitung 6	5,67	6,32
MW	5,67	6,16
SD	0,12	0,15
VK [%]	2,07	2,45

Die Qualität der Wiederholbarkeit für diese Analysenmethode ergab sich aus den erhaltenen Mittelwerten. Die Wiederholbarkeit der vorliegenden Methode zeigte mit Variationskoeffizienten von 2,07 % für (11*R*,12*S*,13*S*,14*S*)-DBPD-SG und 2,45 % für (11*S*,12*R*,13*R*,14*R*)-DBPD-SG ein robustes Verfahren.

10.1.3 BcPheD-SG

10.1.3.1 Optimierung der Kollisionsenergie am Massenspektrometer

Um eine hohe Detektionsempfindlichkeit der Analyten zu erreichen, wurde eine BcPheD-SG-Lösung analog zum BPD-SG und DBPD-SG mehrmals mit unterschiedlich gewählten Kollisionsenergien im MS/MS-DAU sowie im MS/MS-SRM-Modus bei positivem ESI-Ionisierungsmodus an der LC-MS vermessen. Dabei ergab sich die höchste Signalintensität für die Analyten bei einer Kollisionsenergie (*Collision cell offset voltage*, Coff) von -20 V, für den internen Standard 1-MP-SG betrug diese Energie -25 V.

10.1.3.2 Abschätzung der NG und BG

Die Bestimmung der NG und BG erfolgte durch Aufarbeitung eines mit BcPheD-SG und 1-MP-SG dotierten *Blank*-Mediums (Probenvolumen 19 ml). Der Aufarbeitungsrückstand wurde in einem definierten Volumen eines Methanol/Wasser-Gemisches (40:60, v/v) gelöst und an der LC-MS vermessen. Es ergaben sich folgende NG und BG:

(1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)-BcPheD-SG: NG circa 2,0 ng/ml und BG circa 4,0 ng/ml

(1*R*,2*R*,3*R*,4*S*)-BcPheD-SG: NG circa 2,0 ng/ml und BG circa 4,0 ng/ml

Aufgrund der fehlenden Basislinientrennung der beiden Peaks sowie der relativ breiten Peakformen waren beim BcPheD-SG keine empfindlicheren Werte für NG und BG erzielbar.

10.1.3.3 Bestimmung der Wiederfindung

Die Ermittlung der Wiederfindung erfolgte mittels sechsfacher SPE-Aufarbeitung eines mit BcPheD-SG und internem Standard dotierten *Blank*-Mediums. Der ermittelte BcPheD-SG-Gehalt wurde jeweils mit dem Soll-Wert verglichen. Dabei zeigten sich die in der Tabelle 12 aufgeführten Ergebnisse.

Tabelle 12: Wiederfindungsraten für BcPheD-SG

[ng/ml]	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-BcPheD-SG			(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-BcPheD-SG		
	IST	SOLL	%	IST	SOLL	%
Aufarbeitung 1	7,96	9,00	88,7	12,08	13,10	92,2
Aufarbeitung 2	8,52	9,00	94,7	11,85	13,10	90,5
Aufarbeitung 3	9,20	9,00	102,2	13,33	13,10	101,8
Aufarbeitung 4	8,71	9,00	96,8	12,76	13,10	97,4
Aufarbeitung 5	8,95	9,00	99,4	13,02	13,10	99,4
Aufarbeitung 6	8,22	9,00	91,3	12,24	13,10	93,4
MW			95,5			95,8

Die Wiederfindungen betragen für (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)-BcPheD-SG 95,5 % sowie für (1*R*,2*R*,3*R*,4*S*)-BcPheD-SG 95,8 %.

10.1.3.4 Bestimmung der Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit wurde ebenfalls mittels der sechsfachen SPE-Aufarbeitung eines mit BcPheD-SG und internem Standard dotierten *Blank*-Mediums ermittelt (Tab. 13).

Tabelle 13: Wiederholbarkeiten für BcPheD-SG

[ng/ml]	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-BcPheD-SG	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-BcPheD-SG
Aufarbeitung 1	7,96	12,08
Aufarbeitung 2	8,52	11,85
Aufarbeitung 3	9,20	13,33
Aufarbeitung 4	8,71	12,76
Aufarbeitung 5	8,95	13,02
Aufarbeitung 6	8,22	12,24
MW	8,59	12,55
SD	0,46	0,58
VK [%]	5,34	4,62

Die im Rahmen dieser Bestimmung erhaltenen Variationskoeffizienten lagen für (1*S*,2*S*,3*S*,4*R*)-BcPheD-SG bei 5,34 % und für (1*R*,2*R*,3*R*,4*S*)-BcPheD-SG bei 4,62 %.

10.1.4 DB[a,l]P-Metaboliten

10.1.4.1 UV-Spektren

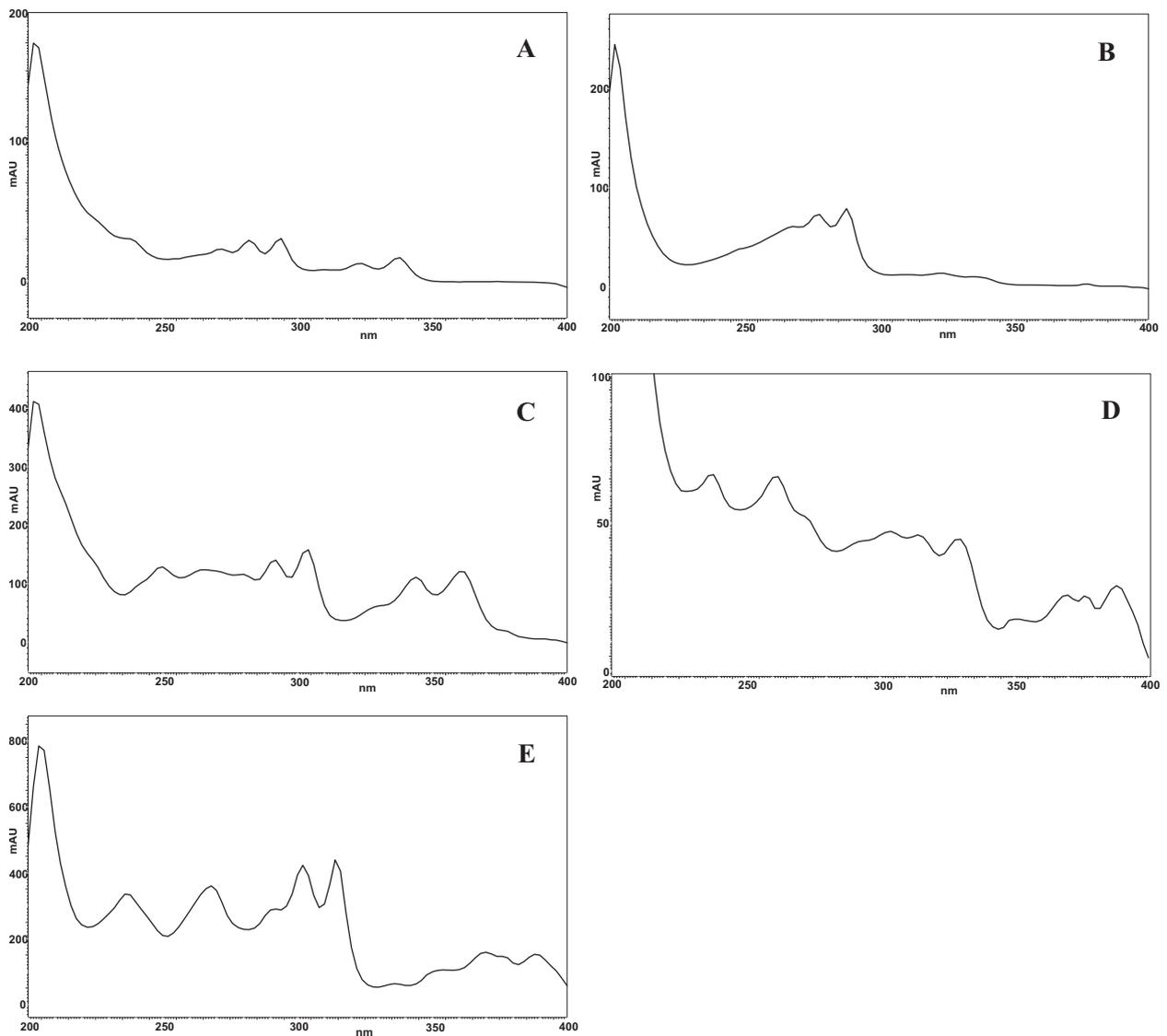


Abbildung 86: UV-Spektren von (A) Tetrol-DB[a,l]P, (B) 8,9-Diol-DB[a,l]P, (C) 11,12-Diol-DB[a,l]P, (D) 7-OH-DB[a,l]P und (E) DB[a,l]P

10.1.4.2 Abschätzung der NG und BG

Hierzu kam ein *Blank*-Medium zum Einsatz, welches mit einer DB[a,l]P-Metaboliten-Referenzlösung sowie mit internem Standard dotiert wurde. Der Aufarbeitungsrückstand wurde in einem definierten Volumen eines Methanol/Wasser-Gemisches (40:60, v/v) aufgenommen. Von dieser Lösung wurden Verdünnungen angesetzt, die anschließend an der HPLC vermessen wurden. Aus den Chromatogrammen ergaben sich die in der Tabelle 14 aufgeführten NG und BG unter Einbeziehung eines Probenvolumens von 5 ml.

Tabelle 14: NG und BG der DB[a,l]P-Metaboliten

	Tetrol- DB[a,l]P [ng/ml]	8,9-Diol- DB[a,l]P [ng/ml]	11,12-Diol- DB[a,l]P [ng/ml]	DB[a,l]P [ng/ml]
NG	0,14	0,20	0,28	0,14
BG	0,57	0,40	0,56	0,29

10.1.4.3 Bestimmung der Wiederfindung

Die Ermittlung der Wiederfindung erfolgte mittels sechsfacher SPE-Aufarbeitung eines mit den DB[a,l]P-Metaboliten und internem Standard dotierten *Blank*-Mediums. Die resultierenden DB[a,l]P-Metaboliten-Gehalte wurden jeweils mit dem Soll-Wert verglichen. Dabei ergaben sich die in der Tabelle 15 aufgeführten Ergebnisse.

Tabelle 15: Wiederfindungsraten für die DB[a,l]P-Metaboliten

WF [%]	Tetrol- DB[a,l]P	8,9-Diol- DB[a,l]P	11,12-Diol- DB[a,l]P	DB[a,l]P
Aufarbeitung 1	91,50	105,25	108,21	98,58
Aufarbeitung 2	87,12	101,39	96,14	97,15
Aufarbeitung 3	95,87	99,70	102,99	98,69
Aufarbeitung 4	84,05	102,85	107,12	99,52
Aufarbeitung 5	92,33	97,14	110,06	96,32
Aufarbeitung 6	98,84	104,96	98,54	98,89
MW	91,62	101,88	103,84	98,19

10.1.4.4 Bestimmung der Wiederholbarkeit

Zur Ermittlung der Wiederholbarkeit diente ebenfalls die sechsfache SPE-Aufarbeitung eines mit DB[a,l]P-Metaboliten und internem Standard dotierten *Blank*-Mediums (Tab. 16).

Tabelle 16: Wiederholbarkeiten für die DB[a,l]P-Metaboliten

[ng/ml]	Tetrol- DB[a,l]P	8,9-Diol- DB[a,l]P	11,12-Diol- DB[a,l]P	DB[a,l]P
Aufarbeitung 1	10,43	20,79	30,12	28,40
Aufarbeitung 2	9,93	20,02	26,75	27,99
Aufarbeitung 3	10,93	19,69	28,65	28,43
Aufarbeitung 4	9,58	20,31	29,80	28,67
Aufarbeitung 5	10,53	19,19	30,62	27,75
Aufarbeitung 6	11,27	20,73	27,41	28,49
MW	10,45	20,12	28,89	28,29
SD	0,62	0,62	1,56	0,35
VK [%]	5,96	3,08	5,40	1,22

10.1.5 B[a]P-Metaboliten

10.1.5.1 Abschätzung der NG und BG

Hierzu wurde ein *Blank*-Medium verwendet, welches mit einer B[a]P-Metaboliten-Referenzlösung sowie mit internem Standard dotiert wurde. Der Aufarbeitungsrückstand wurde in einem definierten Volumen eines Methanol/Wasser-Gemisches (40:60, v/v) gelöst. Von dieser Lösung wurden Verdünnungen hergestellt, die anschließend an der HPLC mit FL-Detektion vermessen wurden. Aus den Chromatogrammen ergaben sich die in der Tabelle 17 aufgeführten NG und BG unter Einbeziehung eines Probenvolumens von 5 ml.

Tabelle 17: NG und BG der B[a]P-Metaboliten

[ng/ml]	NG	BG
Tetrol-B[a]P	0,07	0,15
9,10-Diol-B[a]P	0,04	0,08
4,5-Diol-B[a]P	0,04	0,08
7,8-Diol-B[a]P	0,08	0,15
9-OH-B[a]P	0,03	0,08
7-OH-B[a]P	0,23	0,46
1-OH-B[a]P	0,21	0,41
3-OH-B[a]P	0,11	0,22
B[a]P	0,003	0,01

10.1.5.2 Bestimmung der Wiederfindung

Zur Ermittlung der Wiederfindung diente eine sechsfache SPE-Aufarbeitung eines mit den B[a]P-Metaboliten und internem Standard dotierten *Blank*-Mediums. Anschließend wurden die B[a]P-Metaboliten-Gehalte jeweils mit dem Soll-Wert verglichen. Dabei ergaben sich die in der Tabelle 18 aufgeführten Ergebnisse.

Tabelle 18: Wiederfindungsraten für die B[a]P-Metaboliten

(1: Tetrol-B[a]P, 2: 9,10-Diol-B[a]P, 3: 4,5-Diol-B[a]P, 4: 7,8-Diol-B[a]P, 5: 9-OH-B[a]P, 6: 7-OH-B[a]P, 7: 1-OH-B[a]P, 8: 3-OH-B[a]P, 9: B[a]P, A: Aufarbeitung)

WF [%]	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A 1	93,24	96,55	95,80	96,17	98,56	98,20	96,54	99,37	99,80
A 2	91,05	94,87	95,14	95,74	96,32	97,40	95,13	97,66	98,15
A 3	95,62	97,10	96,45	98,25	95,58	101,98	97,18	96,87	98,48
A 4	95,21	99,30	98,10	97,69	95,22	96,65	99,09	96,30	97,04
A 5	98,87	95,16	99,02	96,85	99,70	99,65	100,10	99,55	100,38
A 6	94,14	96,50	97,11	96,28	96,64	98,16	98,87	97,32	97,10
MW	94,69	96,58	96,94	96,83	97,00	98,67	97,82	97,85	98,49

10.1.5.3 Bestimmung der Wiederholbarkeit

Zur Ermittlung der Wiederholbarkeit diene ebenfalls die sechsfache SPE-Aufarbeitung eines mit B[a]P-Metaboliten und internem Standard dotierten *Blank*-Mediums (Tab. 19).

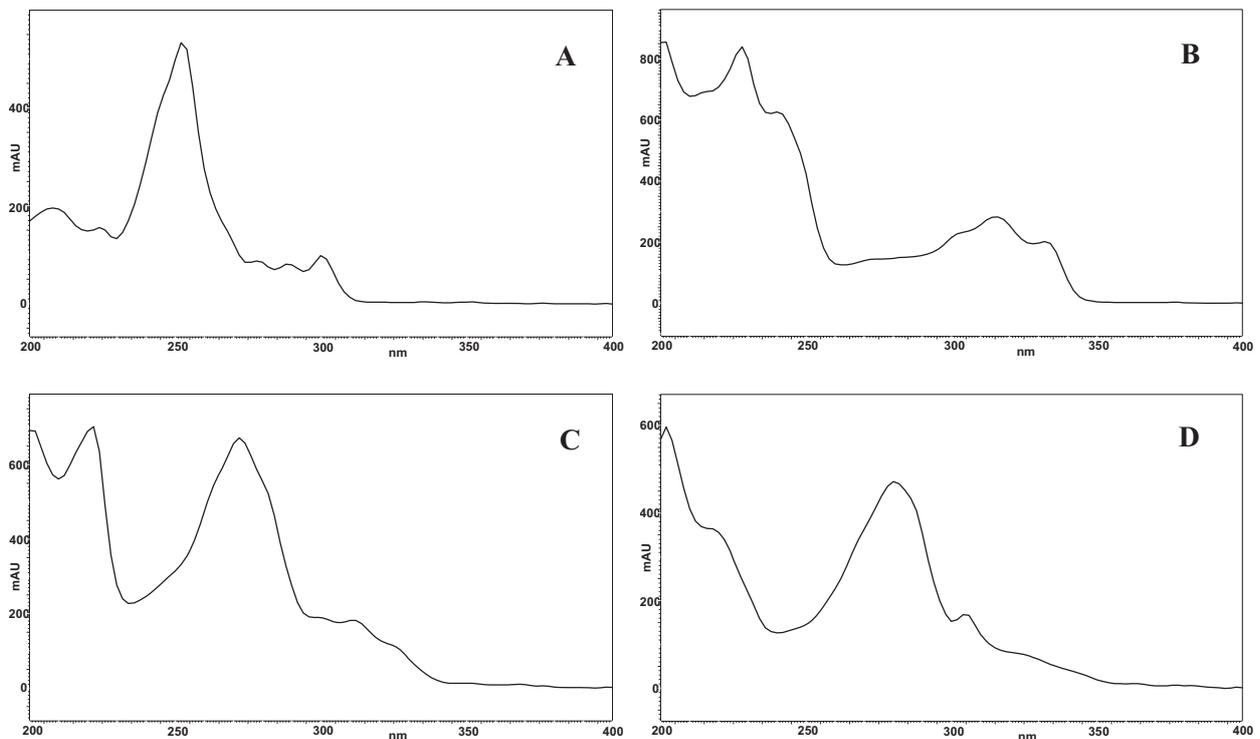
Tabelle 19: Wiederholbarkeiten für die B[a]P-Metaboliten

(1: Tetrol-B[a]P, 2: 9,10-Diol-B[a]P, 3: 4,5-Diol-B[a]P, 4: 7,8-Diol-B[a]P, 5: 9-OH-B[a]P, 6: 7-OH-B[a]P, 7: 1-OH-B[a]P, 8: 3-OH-B[a]P, 9: B[a]P, A: Aufarbeitung)

[ng/ml]	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A 1	7,11	3,85	3,76	3,83	8,30	11,80	10,42	11,66	5,61
A 2	6,95	3,79	3,73	3,81	8,11	11,71	10,26	11,46	5,52
A 3	7,30	3,87	3,78	3,91	8,05	12,26	10,49	11,36	5,53
A 4	7,26	3,96	3,85	3,89	8,02	11,62	10,69	11,30	5,45
A 5	7,54	3,80	3,88	3,85	8,40	11,98	10,80	11,68	5,64
A 6	7,18	3,85	3,81	3,83	8,14	11,80	10,67	11,42	5,46
MW	7,22	3,85	3,80	3,85	8,17	11,86	10,56	11,48	5,54
SD	0,20	0,06	0,06	0,04	0,15	0,23	0,20	0,16	0,08
VK [%]	2,75	1,58	1,48	1,01	1,83	1,93	1,90	1,37	1,39

10.1.6 B[c]Phe-Metaboliten

10.1.6.1 UV-Spektren



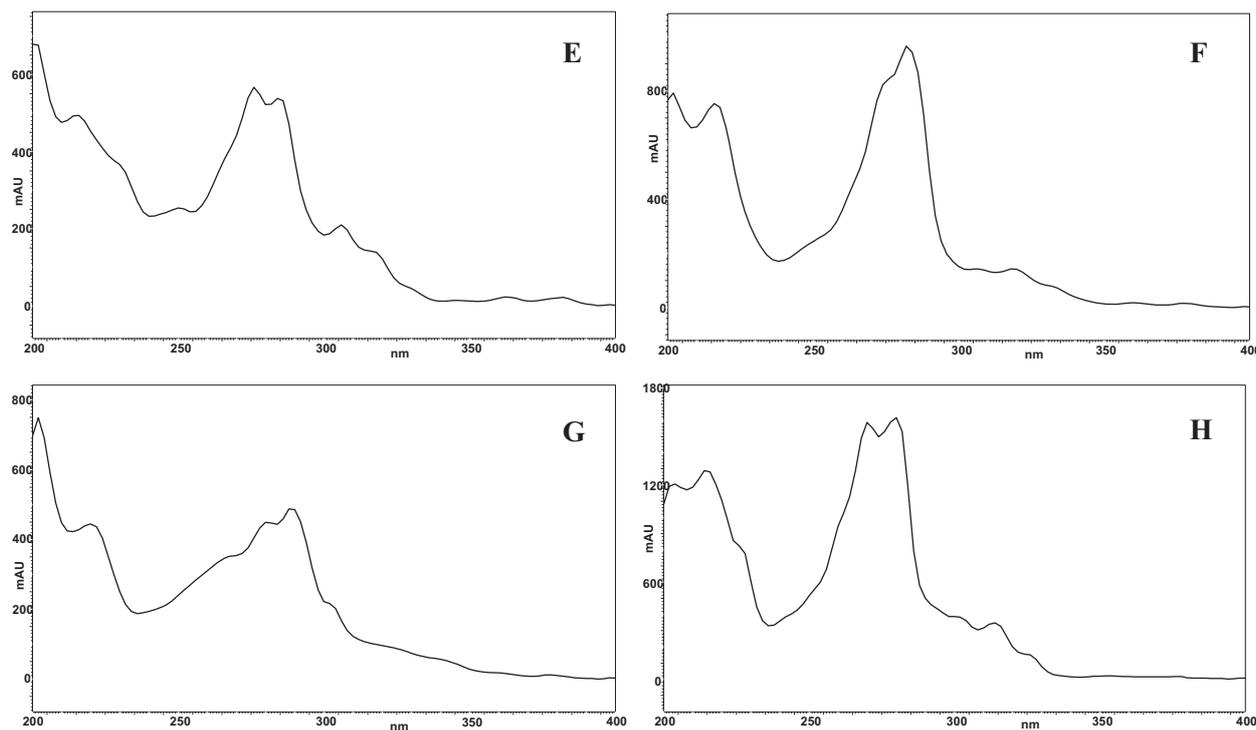


Abbildung 87: UV-Spektren von (A) Tetrol-B[c]Phe, (B) 5,6-Diol-B[c]Phe, (C) 3,4-Diol-B[c]Phe, (D) 1-OH-B[c]Phe, (E) 2-OH-B[c]Phe, (F) 3-OH-B[c]Phe, (G) 4-OH-B[c]Phe und (H) B[c]Phe

10.1.6.2 Abschätzung der NG und BG

Hierzu wurde ein *Blank*-Medium verwendet, welches mit einer B[c]Phe-Metaboliten-Referenzlösung sowie mit internem Standard dotiert wurde. Der Aufarbeitungsrückstand wurde in einem definierten Volumen eines Methanol/Wasser-Gemisches (40:60, v/v) gelöst. Von dieser Lösung wurden Verdünnungen hergestellt, die anschließend an der HPLC vermessen wurden. Aus den Chromatogrammen ergaben sich die in der Tabelle 20 aufgeführten NG und BG unter Einbeziehung eines Probenvolumens von 5 ml.

Tabelle 20: NG und BG der B[c]Phe-Metaboliten

[ng/ml]	NG	BG
Tetrol-B[c]Phe	1,97	2,63
5,6-Diol-B[c]Phe	2,13	2,84
3,4-Diol-B[c]Phe	2,14	2,86
1-OH-B[c]Phe	2,86	8,57
2-OH-B[c]Phe	2,46	7,37
3-OH-B[c]Phe	2,96	8,87
4-OH-B[c]Phe	2,93	8,79
B[c]Phe	2,99	4,49

10.1.6.3 Bestimmung der Wiederfindung

Die Ermittlung der Wiederfindung erfolgte mittels sechsfacher SPE-Aufarbeitung eines mit den B[c]Phe-Metaboliten und internem Standard dotierten *Blank*-Mediums. Die resultierenden B[c]Phe-Metaboliten-Gehalte wurden jeweils mit dem Soll-Wert verglichen. Dabei ergaben sich die in der Tabelle 21 aufgeführten Ergebnisse.

Tabelle 21: Wiederfindungsraten für die B[c]Phe-Metaboliten
(1: Tetrol-B[c]Phe, 2: 5,6-Diol-B[c]Phe, 3: 3,4-Diol-B[c]Phe, 4: 1-OH-B[c]Phe, 5: 2-OH-B[c]Phe, 6: 3-OH-B[c]Phe, 7: 4-OH-B[c]Phe, 8: B[c]Phe)

WF [%]	1	2	3	4	5	6	7	8
Aufarbeitung 1	107,00	72,22	122,60	85,93	102,55	101,99	87,07	104,01
Aufarbeitung 2	104,25	85,60	107,85	96,52	103,66	98,22	93,31	106,74
Aufarbeitung 3	98,44	97,10	101,88	89,57	97,12	104,50	96,58	101,96
Aufarbeitung 4	105,34	89,54	110,19	95,88	106,80	94,55	91,31	97,50
Aufarbeitung 5	102,82	95,55	103,52	99,64	101,59	93,87	97,32	105,50
Aufarbeitung 6	103,69	91,44	106,56	94,51	104,48	106,87	95,12	103,98
MW	103,59	88,58	108,77	93,68	102,70	100,00	93,45	103,28

10.1.6.4 Bestimmung der Wiederholbarkeit

Zur Ermittlung der Wiederholbarkeit diente ebenfalls die sechsfache SPE-Aufarbeitung eines mit B[c]Phe-Metaboliten und internem Standard dotierten *Blank*-Mediums (Tab. 22).

Tabelle 22: Wiederholbarkeiten für die B[c]Phe-Metaboliten
(1: Tetrol-B[c]Phe, 2: 5,6-Diol-B[c]Phe, 3: 3,4-Diol-B[c]Phe, 4: 1-OH-B[c]Phe, 5: 2-OH-B[c]Phe, 6: 3-OH-B[c]Phe, 7: 4-OH-B[c]Phe, 8: B[c]Phe)

[ng/ml]	1	2	3	4	5	6	7	8
Aufarbeitung 1	14,05	10,26	17,51	12,27	12,60	15,08	12,75	15,56
Aufarbeitung 2	13,69	12,16	15,40	13,78	12,74	14,53	13,66	15,97
Aufarbeitung 3	12,93	13,79	14,55	12,79	11,94	15,46	14,14	15,25
Aufarbeitung 4	13,83	12,71	15,74	13,69	13,13	13,98	13,37	14,59
Aufarbeitung 5	13,50	13,57	14,78	14,23	12,49	13,88	14,25	15,78
Aufarbeitung 6	13,61	12,98	15,22	13,50	12,84	15,81	13,93	15,56
MW	13,60	12,58	15,53	13,38	12,62	14,79	13,68	15,45
SD	0,38	1,28	1,06	0,72	0,40	0,79	0,56	0,49
VK [%]	2,81	10,18	6,81	5,36	3,18	5,33	4,08	3,15

Die Metaboliten 5,6-Diol-B[c]Phe und 3,4-Diol-B[c]Phe zeigten mit 10,18 % beziehungsweise 6,81 % höhere Variationskoeffizienten als die übrigen Metaboliten. Diese Werte lassen sich auf die fehlende Basislinientrennung der entsprechenden Peaks und die damit eingeschränkt genaue Integrierbarkeit zurückführen.

10.1.7 Mercaptursäuren

10.1.7.1 Abschätzung der NG und BG

Durch Herstellung von verdünnten Mercaptursäure-Kalibrierlösungen und anschließender Messung mittels LC-MS/MS konnten die entsprechenden NG und BG abgeschätzt werden. Da keine dotierte Realmatrix zum Einsatz kam, wurde hierbei kein Aufkonzentrierungsfaktor einbezogen. Es ergaben sich folgende NG und BG:

S-PMA: NG 0,6 ng/ml und BG 1,6 ng/ml

S-BMA: NG 0,7 ng/ml und BG 2,1 ng/ml

Bei der Aufarbeitung nativer Proben können durch den Einsatz größerer Probenmengen, eine Aufkonzentrierung mittels Festphasenextraktion und anschließende Aufnahme des eingeeengten Proberückstands in ein geringes Volumen Lösungsmittel niedrigere Bestimmungsgrenzen erreicht werden.

10.1.7.2 Bestimmung der Wiederfindung

Die Ermittlung der Wiederfindung wurde mittels sechsfacher Aufarbeitung eines mit Kalibrierlösung aufgestockten Urins durchgeführt. Zusätzlich erfolgten diese Bestimmungen sowohl mit als auch ohne vorherige Schwefelsäurebehandlung der Urinproben. Die ermittelten Mercaptursäure-Gehalte wurden jeweils mit den Soll-Werten verglichen. Die Tabelle 23 zeigt die hierbei erhaltenen Ergebnisse.

Tabelle 23: Wiederfindungsraten für Mercaptursäuren

	mit H ₂ SO ₄ -Behandlung		ohne H ₂ SO ₄ -Behandlung	
	S-PMA [%]	S-BMA [%]	S-PMA [%]	S-BMA [%]
Aufarbeitung 1	93,83	97,35	99,13	94,58
Aufarbeitung 2	96,85	110,38	95,37	96,90
Aufarbeitung 3	80,42	108,35	89,72	109,95
Aufarbeitung 4	91,23	109,48	88,93	107,89
Aufarbeitung 5	85,32	110,81	88,75	105,83
Aufarbeitung 6	90,14	116,53	92,65	101,64
MW	89,63	108,82	92,43	102,80

Die Wiederfindungen betragen mit H₂SO₄-Behandlung für S-PMA 89,6 % und für S-BMA 108,8 % beziehungsweise ohne H₂SO₄-Behandlung für S-PMA 92,4 % und für S-BMA 102,8 %.

10.1.7.3 Bestimmung der Wiederholbarkeit

Zur Ermittlung der Wiederholbarkeit diente ebenfalls die sechsfache Aufarbeitung eines mit Kalibrierlösung aufgestockten Urins. Die im Rahmen dieser Untersuchung erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle 24 wiedergegeben.

Tabelle 24: Wiederholbarkeiten für Mercaptursäuren

[ng/ml]	mit H ₂ SO ₄ -Behandlung		ohne H ₂ SO ₄ -Behandlung	
	S-PMA	S-BMA	S-PMA	S-BMA
Aufarbeitung 1	19,86	32,25	19,97	30,90
Aufarbeitung 2	20,50	36,57	19,22	31,66
Aufarbeitung 3	17,02	35,89	18,08	35,92
Aufarbeitung 4	19,31	36,27	17,92	35,25
Aufarbeitung 5	18,06	36,71	17,88	34,57
Aufarbeitung 6	19,08	38,60	18,67	33,21
MW	18,98	36,05	18,62	33,58
SD	1,26	2,09	0,84	2,01
VK [%]	6,62	5,79	4,51	6,00

Die erhaltenen Standardabweichungen zeigten die Qualität der Wiederholbarkeit für diese Analysenmethode. Die Wiederholbarkeit der vorliegenden Methode verdeutlichte mit Variationskoeffizienten von 6,62 % beziehungsweise 4,51 % für S-PMA und 5,79 % beziehungsweise 6,00 % für S-BMA die Robustheit des Verfahrens.

10.1.8 Selektivität

Während der Analytik von PAK-SG-Konjugaten und sonstigen PAK-Metaboliten wurden jeweils sechs *Blank*-Proben (*Blank*-Medien und *Blank*-Zellextrakte) untersucht. Diese zeigten keine Störpeaks bei den – je nach Methode – zu erwartenden Retentionszeiten.

Bei der Bestimmung von Mercaptursäuren erfolgten ebenfalls sechs Selektivitäts-Untersuchungen von Urin-Proben, die kaum Störpeaks bei den zu erwartenden Retentionszeiten ergaben.

10.2 Qualitativer Nachweis weiterer Mercaptursäuren

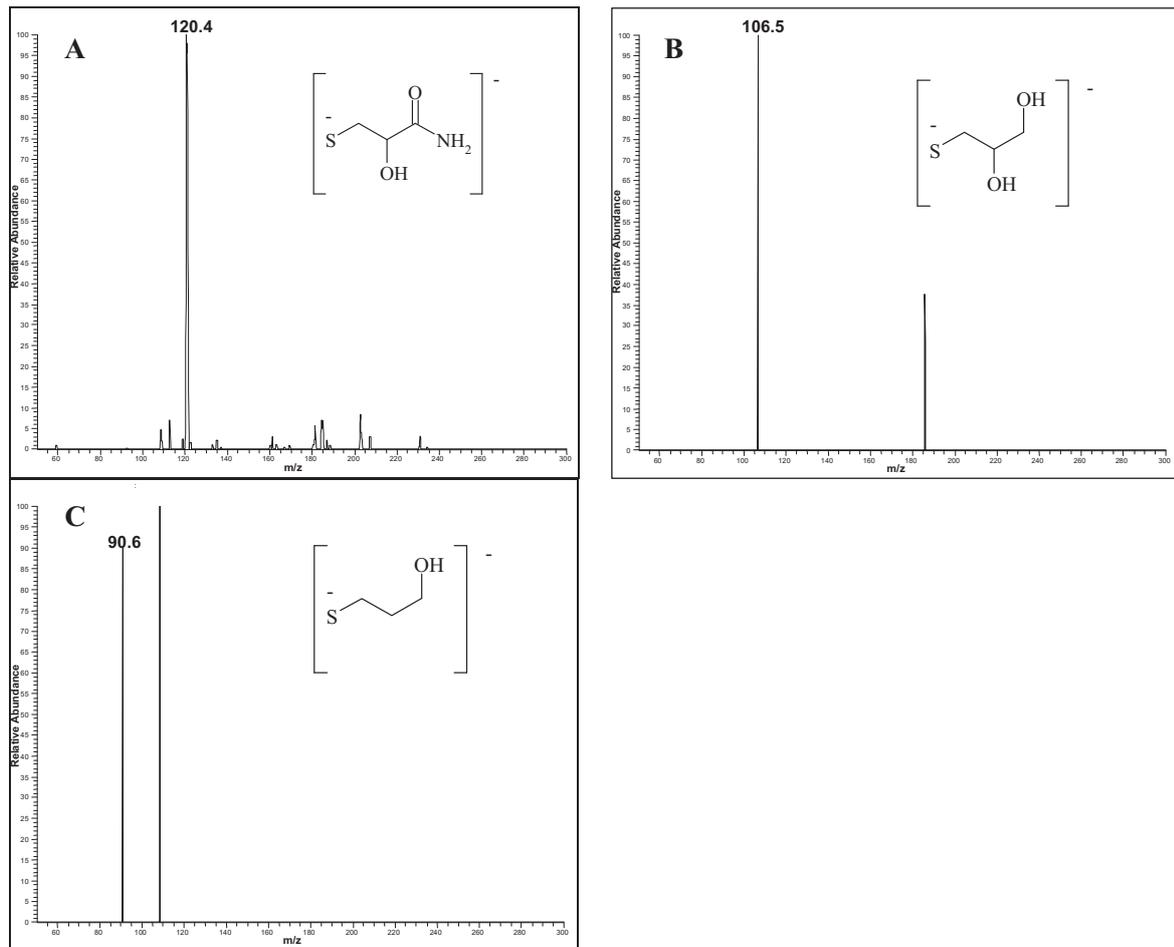


Abbildung 88: LC-MS/MS-Untersuchungen von Urin-Proben im ESI-negativ DAU-Modus, (A) MS-Spektrum aus m/z 249 \rightarrow 50-300 (Qualitativer Nachweis von 2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl-MA), (B) MS-Spektrum aus m/z 236 \rightarrow 50-300 (Qualitativer Nachweis von 2,3-Dihydroxypropyl-MA), (C) MS-Spektrum aus m/z 220 \rightarrow 50-300 (Qualitativer Nachweis von 3-Hydroxypropyl-MA). Urin-Proben von sowohl Rauchern als auch Nichtrauchern zeigten positive qualitative Nachweise dieser Mercaptursäuren.

10.3 Publikationen

Artikel in Fachzeitschriften:

S. Hessel, A. John, A. Seidel, H. Glatt und A. Lampen: Effects of Quercetin on the Detoxification of the Food Contaminant Benzo[*a*]pyrene in the Human Intestinal Caco-2 Cell Model, Risk assessment of phytochemicals in food - novel approaches, Senate Commission on Food Safety (SKLM) symposium monograph series, DFG Publication, Wiley VCH accepted, 2009

H.P. Rihs, A. John, M. Scherenberg, A. Seidel, T. Brüning: Concordance between the deduced acetylation status generated by high-speed Real-time PCR based NAT2 genotyping of seven single nucleotide polymorphisms and human NAT2 phenotypes determined by a caffeine assay. *Clinica Chimica Acta*, Volume 376, Issues 1-2, 240-243, 2007

H. Steinhart, F. Hanft, A. John, C. Scheunert, T. J. Simat: Analysis of Isocyanates from Food Contact Materials. In: T. Eklund, H. De Brabander, E. Daeseleire, I. Dirinck, W. Ooghe, Strategies for Safe Food, 391 – 394, Proceedings of EFC XII, 2003

Kongressbeiträge:

Vorträge

A. John, S. Hessel, A. Lampen, A. Seidel: Analysis of glutathione conjugates of PAHs with regard to metabolism and transport in Caco-2 cells. 4th ECNIS (Environmental Cancer Risk, Nutrition and Individual Susceptibility) Annual Meeting, März 2009, Brüssel/Leuven (Belgien)

A. Seidel, A. John, A. Behnke, J. Jacob: Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Food. International Workshop “Foods to dye for – Contaminants-sampling, analysis, legal limits”, AOAC Europe Section, International workshop, November 2006, Limassol (Zypern)

Poster

S. Hessel, A. John, A. Seidel, A. Lampen: All-*trans* retinoic acid induces breast cancer resistance protein expression in Caco-2 cells and enhances the transport of benzo[*a*]pyrene-3-sulfate, *Toxicology Letters*, Vol. 189 (Supplement 1), S228, September 2009

S. Hessel, A. John, A. Seidel, A. Lampen: MRPs, but not BCRP, transport the glutathione conjugates of the ultimate carcinogenic metabolite of Benzo[*a*]pyrene, Naunyn-Schmiedeberg's, *Archives of Pharmacology*, Vol. 379, April 2009

S. Hessel, A. John, A. Seidel, A. Lampen: Dual Effects of Quercetin on the detoxification of the food contaminant benzo[*a*]pyrene in the human intestinal Caco-2 cell model, DFG-Senate Commission on Food Safety SKLM, März/April 2009, Kaiserslautern

A. John, K. Mathijs, A. Seidel, J. van Delft: Benzo[*a*]pyrene Metabolism in HepG2 Cell Culture. 3rd ECNIS (Environmental Cancer Risk, Nutrition and Individual Susceptibility) Annual Meeting, März 2008, Barcelona (Spanien)

A. Seidel, G. Dettbarn, A. John and J. Jacob: Determination of Urinary Metabolites of PAHs in Non-smoking Cohorts from Italy, Poland and Serbia (DIEPHY-Project-Results). ECNIS (Environmental Cancer Risk, Nutrition and Individual Susceptibility) Meeting, Februar 2008, Athen (Griechenland)

A. Seidel, H. Frank, A. John, H. Glatt: Determination of Alkylated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Environmental Matrices. AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting, April 2007, Los Angeles (USA)

A. Seidel, H. Frank, H. Glatt, A. John: Bestimmung von alkylierten und methylen-überbrückten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in umweltrelevanten Matrices. DGAUM (Deutsche Gesellschaft für Arbeits- und Umweltmedizin), 47. Jahrestagung, März 2007, Mainz

10.4 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name Andrea John
Geburtsdatum 11.08.1976
Geburtsort Hamburg

Schulbildung

08/1983 - 07/1987 Grundschule Molkenbührstraße, Hamburg
08/1987 - 06/1996 Albrecht-Thaer-Gymnasium, Hamburg
Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

04/1997 - 03/2002 Studium der Lebensmittelchemie, Universität Hamburg
Abschluss: 1. Staatsexamen und Diplom in Lebensmittelchemie
03/2001 - 11/2001 Diplomarbeit unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Steinhart zum Thema: „Screening auf isocyanathaltige Substanzen in Lebensmittelverpackungen“

Berufliche Tätigkeiten

09/1996 - 02/1997 Praktikum an der Ecole Maternelle Albert Schweitzer (Vorschule), Bordeaux/Frankreich
05/2002 - 10/2002 Praktikum in der Taste & Flavour Science Area von Unilever Research im Rahmen der praktischen Ausbildung für Lebensmittelchemiker, Vlaardingen/Niederlande
Projekt: „Study of flavour release under static and dynamic conditions and correlation with sensory analysis“
11/2002 – 07/2003 Praktikum am Institut für Hygiene und Umwelt Hamburg im Rahmen der praktischen Ausbildung für Lebensmittelchemiker
Abschluss: 2. Staatsexamen in Lebensmittelchemie
seit 07/2003 Tätigkeit als Lebensmittelchemikerin am Biochemischen Institut für Umweltcarcinogene, Prof. Dr. Gernot Grimmer-Stiftung, in Großhansdorf;
seit 12/2005 zusätzliche Dissertationsarbeit zum Thema: „Biomarker lebensmittel- und umweltrelevanter Xenobiotika – Analytik von Glutathionkonjugaten und Mercaptursäuren“

10.5 Danksagung

Allen Personen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich hiermit ganz herzlich danken:

Herrn PD Dr. Albrecht Seidel für die Möglichkeit, diese Dissertation neben meiner eigentlichen beruflichen Tätigkeit im Biochemischen Institut für Umweltcarcinogene anfertigen zu können sowie für die wissenschaftliche Betreuung mit vielen Inspirationen und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Pablo Steinberg, ehemaliger Leiter des Lehrstuhls für Ernährungstoxikologie der Universität Potsdam und jetziger Leiter des Instituts für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover und Herrn Prof. Dr. Burkhard Kleuser, jetziger Leiter des Lehrstuhls für Ernährungstoxikologie der Universität Potsdam, für die externe Betreuung.

Unseren Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen und Frau Stefanie Hessel vom Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin für die Inkubationen der Caco-2-Zellen und für die gute Zusammenarbeit mit vielen anregenden Diskussionen.

Herrn PD Dr. Thomas Schulz vom Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin für das Kooperationsprojekt zum Biomonitoring bei Wasserpfeifen-Rauchern.

Dem gesamten Team des Biochemischen Instituts für Umweltcarcinogene für die stets hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit sowie für die angenehme Arbeitsatmosphäre:

Herrn Andreas Behnke, Herrn Gerhard Dettbarn, Herrn Dr. Heinrich Frank, Frau Karina Hansen, Herrn Prof. Dr. Jürgen Jacob, Frau Dr. Barbara Merkt und Herrn Dietmar Schneider.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Lebensgefährten Rainhard Gottschalk sowie meinen Eltern Christiane und Klaus John und meiner Schwester Meike John für die großartige Motivierung und Unterstützung.

10.6 Erklärung zur Dissertation

Diese Arbeit entstand am Biochemischen Institut für Umweltcarcinogene, Prof. Dr. Gernot Grimmer-Stiftung, in Großhansdorf unter der dortigen Leitung von Herrn PD Dr. Albrecht Seidel sowie unter der externen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Burkhard Kleuser vom Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie der Universität Potsdam.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich mit den aufgeführten Mitteln angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht.

Potsdam, 07. Januar 2010

Andrea John

