

**Analyse chiraler PCB und ihrer
Methylsulfonyl-Metaboliten in Biotaprobe[n]en mit Hilfe
enantioselektiver Gas- und Flüssigkeitschromatographie unter
Verwendung von Cyclodextrinderivaten**

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg**

vorgelegt von

Thomas Ellerichmann

aus Waltrop/Westfalen

Hamburg 2000

Berichte aus der Chemie

Thomas Ellerichmann

**Analyse chiraler PCB und ihrer Methylsulfonyl-
Metaboliten in Biotaprobe mit Hilfe enantioselektiver
Gas- und Flüssigkeitschromatographie unter
Verwendung von Cyclodextrinderivaten**

Shaker Verlag
Aachen 2000

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Ellerichmann, Thomas:

Analyse chiraler PCB und ihrer Methylsulfonyl-Metaboliten in Biotaprobren mit Hilfe enantioselektiver Gas- und Flüssigkeitschromatographie unter Verwendung von Cyclodextrinderivaten/Thomas Ellerichmann.

Aachen: Shaker, 2000

(Berichte aus der Chemie)

Zugl.: Hamburg, Univ., Diss., 2000

ISBN 3-8265-7596-2

Copyright Shaker Verlag 2000

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8265-7596-2

ISSN 0945-070X

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

"How would you like to live in Looking-glass House, Kitty? I wonder if they'd give you milk, there? Perhaps Looking-glass milk isn't good to drink..."

Lewis Carroll: Alice zu ihrer Katze in "Alice hinter den Spiegeln"

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hühnerfuss danke ich für die Überlassung des herausfordernden Themas, die allzeit offene Tür während des Verlaufs der Arbeit und das in mich gesetzte Vertrauen während der ganzen Zeit.

Allen gegenwärtigen und früheren Mitgliedern des Arbeitskreises Hühnerfuss sei gedankt für eine spannende Zusammenarbeit, ein meist angenehmes Arbeitsklima, vielfältige Aktivitäten und nicht zuletzt natürlich die geleistete Vorarbeit: Kai Bester, Bianca Bethan, Scarlett Biselli, Heike Dannhauer, Jörn Faller, Arne Gericke, Hagen Hintze, Frank Hoffmann, Roland Kallenborn, Philipp Lange, Volker Neumann, Nils Peters, Bernd Pfaffenberger, Ninja Reineke, Johannes Simon-Kutscher und Stefan Weigel. Den einen oder anderen Beitrag zu dieser Arbeit hat jeder von ihnen geleistet.

Ohne die tatkräftige und fachlich herausragende Mitarbeit von Helmut Dittmann, Klaus Scharwächter und Prof. W.A. König wäre diese Arbeit ebenfalls nicht in dieser Form entstanden.

Bei Stefan Franke, der die gesamten massenspektrometrischen Untersuchungen durchgeführt und begleitet hat, habe ich in einer selten anzutreffenden Weise eine begeisternde und qualitätsbewusste chemische Forschung kennengelernt, die meine Art zu arbeiten erheblich beeinflusst hat.

Ake Bergman und Christina Larsson von der Universität Stockholm haben diese Arbeit durch ihre Beiträge, die Lieferung der Standardsubstanzen in größeren Mengen und die sonstige enge Zusammenarbeit erst möglich gemacht. Dafür und die herzliche Aufnahme bei meinen Aufenthalten in Schweden bin ich ebenfalls sehr dankbar.

Herrn Prof. Püschel vom Institut für Gerichtsmedizin der Universität Hamburg danke ich für die Überlassung der Humanproben.

Peter Brandhofer, der mir während der Erstellung der Doktorarbeit einen Einblick in das Berufsleben eines Chemikers gab, der schliesslich zur Gründung der Firma mit ihm zusammen führte, die mir jetzt Lohn und Brot beschert, habe ich eine gewisse Gelassenheit bezüglich meiner Zukunft als Chemiker zu verdanken und einen realistischen Blick auf die Mühen einer Dissertation.

Meine Partnerin Eike schließlich, die mir während des Schreibens dieser Arbeit mit viel Liebe und Geduld zur Seite gestanden hat, sei hier noch einmal ganz besonders erwähnt.

In dieser Danksagung konnten sicher nicht alle Menschen erwähnt werden, die einen Anteil an dieser Arbeit hatten. Ihnen sei versichert, daß dies nicht aus Unwillen oder Undankbarkeit geschehen ist, sondern schlicht an meiner Vergesslichkeit liegt.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einführung	1
1.1 Polychlorierte Biphenyle in der Umwelt.....	1
1.2 Metaboliten der PCB	6
1.3 Stereochemische und toxikologische Eigenschaften der PCB	10
1.4 Stereochemische und toxikologische Eigenschaften der MeSO ₂ - Metaboliten der PCB	16
1.4.1 Verteilung der MeSO ₂ -Metaboliten der PCB in Organismen	18
1.5 Chiralität	19
1.6 Chirale Problemstoffe in der Umwelt.....	21
1.7 Enantioselektive Analyse	23
1.7.1 Einführung	23
1.7.2 Cyclodextrine	24
1.7.3 Cyclodextrinphasen in der Gaschromatographie.....	25
1.7.4 Enantioselektive Gaschromatographie mit Umweltproben	26
1.7.5 Cyclodextrinphasen in der HPLC.....	27
2. Problemstellung.....	29
3. Methoden	31
3.1 GC/MS	31
3.2 HPLC.....	32
4. Ergebnisse	33
4.1 Gaschromatographische Trennung chiraler MeSO ₂ -PCB in ihre Enantiomere.....	33
4.2 Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von 3-MeSO ₂ -132 und 3- MeSO ₂ -149 in Humanproben.....	42
4.3 Bestimmung der Konzentrations- und Enantiomerenverhältnisse von chiralen MeSO ₂ -PCB in verschiedenen Organen von mit PCB gefütterten Ratten.....	46
4.3.1 Konzentrationen der chiralen MeSO ₂ -PCB in Lebern, Fett und Lungen der untersuchten Ratten	46

4.3.2 Enantiomerenverhältnisse in Leber, Fett und Lungen der untersuchten Ratten	49
4.3.3 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Untersuchungen	56
4.4 Gaschromatographische Trennung chiraler PCB in ihre Enantiomere	58
4.5 Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse atropisomerer PCB in Humanproben	62
4.6 Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse atropisomerer PCB in Walfett und in Robbenleber und –fett.....	63
4.7 Andere schwefelhaltige chlorierte Kohlenwasserstoffe in Biotaprobe.....	65
4.8 Präparative HPLC-Trennung von PCB 149 und verschiedenen MeSO ₂ -PCB in ihre Enantiomere.....	67
4.8.1 Polarimetrische Untersuchung der Enantiomere von 3-MeSO ₂ -149.....	73
5. Diskussion	75
6. Zusammenfassung.....	83
7. Summary	85
8. Ausblick	87
9. Experimenteller Teil.....	89
9.1 Chemikalien	89
9.2 Geräte	89
9.3 Biotaprobe.....	92
9.3.1 Aufarbeitung der Biotaprobe.....	95
9.3.2 Kalibrierung und Quantifizierung	97
9.3.3 Wiederfindungsraten und Blindwerte für die PCB	98
9.3.4 Wiederfindungsraten und Blindwerte für die MeSO ₂ -PCB.....	99
10. Literatur	99
11. Anhang	99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verteilung der PCB-Kongenere auf die Homologen	3
Tabelle 2: Schmelzpunkte, Wasserlöslichkeiten, Dampfdrücke und <i>n</i> -Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten der DIN-PCB (* 298 K (25° C)).....	4
Tabelle 3: Typische Zusammensetzung in Prozent einiger technischer PCB-Gemische.....	5
Tabelle 4: Produktion von Arochlor in den USA in Prozentanteilen der technischen Gemische an der Gesamtproduktion, 1957 – 1977	5
Tabelle 5: Vorläufer-PCB und Strukturen der in Biotaprobe gefundenen Methylsulfonyl-Metaboliten (Fettgedruckte PCB und Metaboliten sind chiral). Das Präfix 3- oder 4- beschreibt die Stellung der Methylsulfonylgruppe im linksstehenden Ring, die Zahl dahinter ist die Nummer des PCBs nach der Ballschmider-Numerierung. ^[5]	9
Tabelle 6: TEF-Werte, World Health Organization (WHO)/International Programme on Chemical Safety (IPCS) (nach ^[37]).....	13
Tabelle 7: Bei Raumtemperatur gegen Racemisierung stabile PCB.....	14
Tabelle 8: Strukturformeln, Abkürzungen und CAS-Nummern chiraler MeSO ₂ -PCB.....	18
Tabelle 9: Quantifizierung der zwei in Humanleber gefundenen MeSO ₂ -PCB Kongenere 3-149 und 3-132 bezüglich Frischgewicht (f. w.) und normiert auf den Gehalt an extrahierbarer organischer Matrix (EOM).	43
Tabelle 10: Bisher gemessene Enantiomerenverhältnisse (ER) von MeSO ₂ -PCB in verschiedenen Spezies und Organen	57
Tabelle 11: Enantiomerenverhältnisse (erster Peak/zweiter Peak = a/b) von PCB 91, 95 und 136 in Humanlebern	62
Tabelle 12: Enantiomerenverhältnisse (erster Peak/zweiter Peak = a/b) von PCB 91, 95 und 136 in Walfett und in Robbenleber und -fett.....	63
Tabelle 13: Kenngrößen der enantioselektiven HPLC-Trennungen von PCB 149 sowie der PCB-Metaboliten 3-91, 4-95, 3-132, 3-149, 4-149 und 4-174	72
Tabelle 14: In den Humanleberproben nachgewiesene chirale PCB und ihre 3-MeSO ₂ -Metaboliten. Mit + gekennzeichnete PCB und 3-MeSO ₂ -PCB sind in den Probenextrakten nachgewiesen, mit – gekennzeichnete nicht. Die Abkürzung ER steht für das Enantiomerenverhältnis (erster Peak/zweiter Peak).	78
Tabelle 15: Kenngrößen der verwendeten Humanproben	93
Tabelle 16: Wiederfindungsraten der PCB nach Chlorierungsgrad.....	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeine Struktur der Polychlorierten Biphenyle	1
Abbildung 2: Strukturen der in Biotaprobe gefundenen MeSO ₂ -PCB.....	6
Abbildung 3: Glutathion-Pfad - Die Entstehung der PCB-Metaboliten	7
Abbildung 4: Strukturformel von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin.....	11
Abbildung 5: Strukturformel von 3,3',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl (PCB 169).....	12
Abbildung 6: 3-MeSO ₂ -149 als Enantiomerenpaar.....	15
Abbildung 7: Strukturformel von (-)-Thalidomid.....	20
Abbildung 8: Strukturformeln von (+)- <i>cis</i> -Chlordan, (+)- α -Hexachlorcyclohexan und Bromocyclen.....	22
Abbildung 9: Strukturformeln und Ausdehnungen von Cyclodextrin-Molekülen.....	24
Abbildung 10: Strukturformeln der in Umweltproben nachgewiesenen chiralen MeSO ₂ -Metaboliten. Das Präfix 3- oder 4- beschreibt die Stellung der Methylsulfonylgruppe im linksstehenden Ring, die Zahl dahinter ist die Nummer des PCB nach der Ballschmitter-Numerierung.....	34
Abbildung 11: GC/MS-Chromatogramm der MeSO ₂ -penta-CB 3-91, 4-91 und 4-95 (Säule 1, Detektion mit hochauflösender Massenspektrometrie im SIR-Modus) Temperaturprogramm: 343 K (70°C), 3 min isotherm, 30 K/min bis 458 K (185°C), 30 min isotherm, 30 K/min bis 468 K (195°C).....	35
Abbildung 12: GC-Chromatogramm der MeSO ₂ -hexa-CB (Säule 1, ECD-Detektion). 3-132 zeigt als einziges chirales Kongener keine Basislinien-Trennung. Temperatur-Programm wie in Abb. 11	36
Abbildung 13: GC/MS-Chromatogramm der MeSO ₂ -hexa-CB 3-149, 3-132 und 4-132 (Säule 1, Detektion mit hochauflösender Massenspektrometrie im SIR-Modus) ohne 4-149. Temperatur-Programm wie in Abb. 11	36
Abbildung 14: GC/MS-Chromatogramm der MeSO ₂ -hepta-CBs 3-174 und 4-174 (Säule 1, Detektion mit hochauflösender Massenspektrometrie im SIR-Modus), Temperatur-Programm wie in Abb. 11	37
Abbildung 15: Strukturformel der irrtümlich für Kongener 3-91 gehaltenen, chiralen Verunreinigung des Standardgemisches: 4-MeSO ₂ -2,2',3,3',6-penta-CB (4-MeSO ₂ -84).....	37
Abbildung 16: GC/MS-Chromatogramm MeSO ₂ -penta-CB 3-91, 4-95 und 4-91 (Säule 2, Detektion mit hochauflösender Massenspektrometrie im SIR-Modus) mit chiraler Verunreinigung. Temperatur-Programm: 353 K (70°C), 2 min isotherm, 30 K/min bis 403 K (130°C), 10 K/min bis 453 K (180°C), 30 min isotherm, 3 K/min bis 483 K (210°C), 20 min isotherm.....	38
Abbildung 17: GC/MS-Chromatogramm der chiralen MeSO ₂ -hexa-CB 3-149, 4-149, 3-132 und 4-132 (Säule 2, Detektion mit hochauflösender Massenspektrometrie im SIR-Modus). Temperatur-Programm wie in Abb. 16. 3-132 zeigt als einziges chirales Kongener keine Basislinien-Trennung; 3-141 und 4-141 sind achiral	39
Abbildung 18: GC-Chromatogramm der MeSO ₂ -hepta-CB 3-174 und 4-174 (Säule 2, ECD-Detektion) Temperatur-Programm wie in Abb. 16.....	40

Abbildung 19: GC/MS-Chromatogramme der MeSO ₂ -PCB 3-149 und 3-132 in Humanleberprobe 3, (Säule 2, siehe Kapitel 4.1) Temperatur-Programm wie in Abb. 16.....	44
Abbildung 20: Massenspektren von 3-MeSO ₂ -132, Standardsubstanz (unten) und Humanleber 3 (oben), Säule: BPX 5 (achiral), Temperatur-Programm: 333 K (60°C), 3 min isotherm, 10 K/min bis 493 K (220°C), 3 K/min bis 573 K (300°C).	45
Abbildung 21: Konzentrationen von 3- und 4-MeSO ₂ -91 in Rattenlebern, -fett und -lungen: Zeitlicher Trend und Vergleich der Organe	47
Abbildung 22: Konzentrationen von 3- und 4- MeSO ₂ -132 in Rattenlebern, -fett und -lungen: Zeitlicher Trend und Vergleich der Organe	47
Abbildung 23: Konzentrationen von 3- und 4-MeSO ₂ -149 in Rattenlebern, -fett und -lungen: Zeitlicher Trend und Vergleich der Organe	48
Abbildung 24: Enantiomerenverhältnisse von 4-MeSO ₂ -91, 4-MeSO ₂ -149 und 4-MeSO ₂ -132 in Rattenlebern 1, 2, 4 und 8 Wochen nach einmaliger Gabe von Clophen A 50 (25 mg/kg b.w.).....	50
Abbildung 25: GC-Chromatogramm der enantioselektiven Trennung von MeSO ₂ -penta-PCB in Rattenleber, 2 Wochen nach Gabe einer einmaligen Dosis Chlophen A50 (25 mg/kg b.w.). (Säule 1, Detektion mit hochauflösender Massenspektrometrie im SIR-Modus, Temperatur-Programm wie in Abb. 11)	50
Abbildung 26: GC-Chromatogramm der enantioselektiven Trennung von MeSO ₂ -hexa-PCB in Rattenleber, 2 Wochen nach Gabe einer einmaligen Dosis Chlophen A50 (25 mg/kg b.w.) (Säule 1, Detektion mit hochauflösender Massenspektrometrie im SIR-Modus, Temperatur-Programm wie in Abb. 11)	51
Abbildung 27: Enantiomerenverhältnisse von 4-MeSO ₂ -91, 4-MeSO ₂ -149 und 4-MeSO ₂ -132 in Rattenfett 1, 2, 4 und 8 Wochen nach einmaliger Gabe von Clophen A 50 (25 mg/kg b.w.)	52
Abbildung 28: Enantiomerenverhältnisse von 4-MeSO ₂ -91, 4-MeSO ₂ -149 und 4-MeSO ₂ -132 in Rattenlungen 1, 2, 4 und 8 Wochen nach einmaliger Gabe von Clophen A 50 (25 mg/kg b.w.).....	53
Abbildung 29: GC/MS-Chromatogramme (niedrigauflösendes MS, aufgenommen an der Universität Stockholm von Christina Larsson) je eines Rattenleber- und -lungenprobenextraktes (Säule 2, Temperatur-Programm: 343 K (70 °C), 2 min isotherm, 20 K/min bis 433 K (160 °C), 1 K/min bis 472 K (199 °C), 55 min isotherm).....	55
Abbildung 30: GC/MS-Enantiomerentrennungen des PCB 45 (Standardsubstanz). Säule: 2,3-Me-6-TBDMS-β-CD, 25 m, Detektion mit hochauflösender Massenspektrometrie im SIR-Modus, Temperatur-Programm: 353 K (80°C), 2 min isotherm, 40 K/min bis 443 K (170°C), 70 min isotherm.	59
Abbildung 31: GC- Enantiomerentrennungen der PCB 95 und 91 (Standardsubstanzen). Säule: 2,3-Me-6-TBDMS-β-CD, 25 m, Detektion mit hochauflösender Massenspektrometrie im SIR-Modus, Temperatur-Programm wie in Abb. 30.....	59
Abbildung 32: GC- Enantiomerentrennungen der PCB 136 und 132 (Standardsubstanzen). Säule: 2,3-Me-6-TBDMS-β-CD, 25 m (Chromatogramm gekürzt), Temperatur-Programm wie in Abb. 30	60

Abbildung 33: GC-Enantiomerentrennungen des PCB 149 (Standardsubstanz) mit den Chromatogrammen der Fraktionen aus der HPLC-Trennung der Enantiomere des PCB 149 (Kapitel 4.6). Säule: 2,3-Me-6-TBDMS- β -CD, 25 m, ECD-Detektion, Temperatur-Programm wie in Abb. 30	60
Abbildung 34: GC-Chromatogramm des PCB 174 (Standardsubstanz). Säule: 2,3-Me-6-TBDMS- β -CD, 25 m, Detektion mit hochauflösender Massenspektrometrie im SIR-Modus, Temperatur-Programm wie in Abb. 30	61
Abbildung 35: Massenspektrum von Bis-(4-chlorphenyl)sulfon, Humanleber 3, Säule: BPX 5 (50 m x 0,32 mm), Temperaturprogramm: 333 K (60°C), 3 min isotherm, 10 K/min bis 493 K (220 °C), 3 K/min bis 573 K (300 °C), Retentionszeit: 32,2 min	65
Abbildung 36: Strukturformel von Tetradifon	66
Abbildung 37: Massenspektrum von 3,4,6,4'-Tetrachlordiphenylsulfid (Animert), Robbenleber, Säule: BPX 5 (50 m x 0,32 mm), Temperaturprogramm: 333 K (60°C), 3 min isotherm, 10 K/min bis 493 K (220 °C), 3 K/min bis 573 K (300 °C), Retentionszeit: 66,1 min.....	66
Abbildung 38: HPLC-Enantiomerentrennung des PCB 149, Permethy- β -cyclodextrin an Aminopropyl-Kieselgel, 60 % Methanol/40 % Wasser, Flußrate 0,35 mL/min, 283 K (10°C), Konzentration 3 mg/mL Methanol, 20 μ L injiziert	68
Abbildung 39: HPLC-Enantiomerentrennung des 3-MeSO ₂ -149, Permethy- β -cyclodextrin an Aminopropyl-Kieselgel, 62 % Methanol/38 % Wasser, Flußrate 0,50 mL/min, 278 K (5°C), Konzentration ca. 1 mg/mL Methanol, 25 μ L injiziert.....	69
Abbildung 40: HPLC-Enantiomerentrennung des 4-MeSO ₂ -149, Permethy- β -cyclodextrin an Aminopropyl-Kieselgel, 60 % Methanol/40 % Wasser, Flußrate 0,50 mL/min, 283 K (10°C), Konzentration ca. 1 mg/mL Methanol, 10 μ L injiziert.....	69
Abbildung 41: HPLC-Enantiomerentrennung des 3-MeSO ₂ -132, Permethy- β -cyclodextrin an Aminopropyl-Kieselgel, 50 % Methanol/50 % Wasser, Flußrate 0,50 mL/min, 278 K (5°C), Konzentration ca. 1 mg/mL Methanol, 50 μ L injiziert.....	70
Abbildung 42: HPLC-Enantiomerentrennung des 4-MeSO ₂ -95, Permethy- β -cyclodextrin an Aminopropyl-Kieselgel, 48 % Methanol/52 % Wasser, Flußrate 0,70 mL/min, 283 K (10°C), Konzentration ca. 1 mg/mL Methanol, 30 μ L injiziert.....	70
Abbildung 43: HPLC-Enantiomerentrennung des 3-MeSO ₂ -91, Permethy- β -cyclodextrin an Aminopropyl-Kieselgel, 54 % Methanol/46 % Wasser, Flußrate 0,50 mL/min, 283 K (10°C), Konzentration ca. 1 mg/mL Methanol, 5 μ L injiziert.....	71
Abbildung 44: HPLC-Enantiomerentrennung des 4-MeSO ₂ -174, Permethy- β -cyclodextrin an Aminopropyl-Kieselgel, 54 % Methanol/46 % Wasser, Flußrate 0,50 mL/min, 278 K (5°C), Konzentration ca. 1 mg/mL Methanol, 10 μ L injiziert.....	71
Abbildung 45: Aufarbeitungsschema für die Biotproben (SOPs siehe Anhang).....	95

Abkürzungsverzeichnis

AHH	Arylhydrocarbon-hydroxylase
Ah-Rezeptor	Arylhydrocarbon-Rezeptor
b.w.	<i>body weight</i> , Körpergewicht
CD	Cyclodextrin
ECOD	Ethoxycumarin-O-deethylase
ee	Enantiomeric excess
EOM	<i>Extractable Organic Matrix</i> , Extrahierbare organische Matrix
ER	<i>Enantiomeric ratio</i> , Enantiomerenverhältnis (Peak1/Peak2)
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylase
GC	Gaschromatograph
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
HCH	Hexachlorcyclohexan
HO-PCB	Hydroxy-PCB
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
m/z	Masse geteilt durch Ladung
MeSO ₂ -PCB	Methylsulfonyl-PCB
MS	Massenspektrometer
n.n.	nicht nachweisbar
n.q.	nicht quantifiziert
PCB	Polychlorierte Biphenyle
SOP	<i>Standard operation procedure</i> , Standard-Arbeitsanweisung
TEF	<i>Toxic equivalency factor</i> , Toxizitätsäquivalentfaktor
TEQ	<i>Toxic equivalent concentration</i> , Toxizitätsäquivalentkonzentration