



## Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay

### Dr. Bertram Kuch

Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft  
der Universität Stuttgart  
Abteilung Hydrochemie/Hydrobiologie  
Bandtäle 2  
D-70569 Stuttgart  
Tel.: 0711 685 65443 / Fax: 0711 685 7809  
E-Mail: Bertram.Kuch@iswa.uni-stuttgart.de



## Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay

- Hintergründe
- Kenntnisstand
- Vergleich von Vorgehensweisen
- Vergleich von Ergebnissen



Hormonelle Aktivität in Mineralwasser

Montag, 22. Februar 2010

Schlagzeile

**SPIEGEL ONLINE WISSENSCHAFT**

Mineralwasser mit Östrogenen belastet

**Beunruhigender Fund im Mineralwasser: Frankfurter Forscher haben herausgefunden, dass insbesondere das Wasser aus Kunststoffflaschen oft mit Umwelthormonen belastet ist. In dieser Hinsicht sei es nicht besser als Wasser aus Kläranlagen.**

Frankfurt am Main - Es ist nach wie vor das Lieblingsgetränk der Deutschen: 138 Liter Mineralwasser trinkt der durchschnittliche Bundesbürger pro Jahr, glaubt man den Zahlen des Verbands Deutscher Mineralbrunnen (VDM). Umso beunruhigender ist das, was Frankfurter Toxikologen jetzt melden: Mineralwasser in Flaschen sei häufig mit Umwelthormonen belastet.

<http://www.spiegel.de/wissenschaft/mensch/0,1518,613063,00.html>

B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay  
AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010



Hormonelle Aktivität in Mineralwasser

**sueddeutsche.de**

Unser tägliches Östrogen

12.03.2009, 15:21

**Erst Uran, jetzt Hormone - die Qualität von Mineralwasser kann mehr als unappetitlich sein. Wasser aus PET-Flaschen ist häufig mit dem Sexualhormon Östrogen belastet.**



Mineralwasser in Flaschen ist nach einer Studie der Universität Frankfurt am Main häufig mit Umwelthormonen belastet. Wie die Biologen Jörg Oehlman und Martin Wagner am Donnerstag mitteilten, konnten sie in zwölf von 20 untersuchten Mineralwässern Chemikalien nachweisen, die menschlichen

<http://www.sueddeutsche.de/gesundheit/860/461486/text/>

B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay  
AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010





## Hormonelle Aktivität in Mineralwasser

## ÄRZTE ZEITUNG.DE

Ärzte Zeitung online, 13.03.2009

Kommentare (0) ★★★★★



## Mineralwasser mit Östrogen-ähnlichen Hormonen belastet

**FRANKFURT (eb).** Deutsches Mineralwasser ist mit Hormonen belastet, die dem Sexualhormon Östrogen ähneln. Das haben Biologen der Goethe-Universität Frankfurt herausgefunden. Die Stoffe stammen den Wissenschaftlern zufolge zumindest teilweise aus den Plastikflaschen. Ob davon ein Gesundheitsrisiko ausgeht, wissen die Forscher bislang nicht.

"Wir wussten, dass Lebensmittel mit bestimmten Umwelthormonen kontaminiert sein können," erklärt Professor Jörg Oehlmann, der das Projekt leitet. Ein prominentes Beispiel sei die Plastikkomponente Bisphenol A, eine östrogenartig wirkende Chemikalie, die aus Polycarbonat-Flaschen austreten kann. "Allerdings haben wir es in der Realität nicht nur mit einer einzelnen Chemikalie, sondern mit einer Vielzahl von Umwelthormonen zu tun," so Oehlmann weiter. Um diese sogenannten Cocktaileffekte einzubeziehen, haben sich die Wissenschaftler nicht auf eine einzelne Substanz konzentriert, sondern haben die gesamte Hormonaktivität von Mineralwasser gemessen.

<http://www.aerztezeitung.de/medizin/krankheiten/hormonstoerungen/article/537477/mineralwasser-Oestrogen-aehnlichen-hormonen-belastet.html>

B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay

AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010



5



## Hormonelle Aktivität in Mineralwasser

[familien-organizer.de](http://familien-organizer.de) – Familie einfach leben.

**Tipps für Eltern: Schwangerschaft, Geburt, Baby, Kinder, Kindergarten, Schule, Versicherungen, Reisen, Spielzeug**

### Hormonskandal: Östrogen in Mineralwasser – Auswirkungen auf Spermien bekannt

By Redaktion | März 13, 2009

Wie die Wissenschaftler Jörg Oehlman und Martin Wagner von der Frankfurter Goethe-Universität herausfanden, sind viele Mineralwässer mit großen Mengen des Sexualhormons Östrogen belastet. Laut Doktorand Martin Wagner ist die Qualität der untersuchten Proben von der Hormonbelastung her mit dem Abwasser von Kläranlagen zu vergleichen. Die Ergebnisse sind in der Fachzeitschrift "Environmental Science and Pollution Research" publiziert und beunruhigen. Die

<http://www.familien-organizer.de/kinder-baby/6-hormonskandal-ostrogen-in-mineralwasser-auswirkungen-auf-spermien-bekannt.html>

B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay

AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010



6



## Hormonelle Aktivität in Mineralwasser

Environ Sci Pollut Res (2009) 16:278–286  
DOI 10.1007/s11356-009-0107-7

Published online: 10 March 2009

AREA 6 • PERSISTANT ORGANIC POLLUTANTS • RESEARCH ARTICLE

### Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles

Martin Wagner • Jörg Oehlmann

Hefezell-Assay (YES-Assay) zur Bestimmung der estrogenen Aktivität  
Reproduktionstest mit neuseeländischen Wasserschnecken

Untersuchung von 20 Mineralwässern (14 Marken):  
Abfüllungen in PET, Glas und Getränkekarton

B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay  
AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010



7



## Ergebnisse der Untersuchungen von Wagner und Oehlmann

12 von 20 natürlichen Mineralwässern erwiesen sich im YES-Assay als positiv:  
**Konzentrationen 2,65 ng/L bis zu > 75 ng/L (EEQ)**

### Schneckentest:

Erhöhung der Embryonenzahl bei Exemplaren, die in PET-Flaschen gehältert wurden

### Erklärungsansatz:

Die festgestellte estrogenen Aktivität wird durch hormonartig wirkende Substanzen verursacht, die aus Verpackungsmaterialien in die Mineralwässer gelangen können. Aussagen über die Art der Substanzen können derzeit nicht getroffen werden.

B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay  
AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010



8



**Stellungnahme des Bundesinstitutes für Risikobewertung (25.03.2009):**

„Die Proben zeigten keinen signifikanten Unterschied im Vorkommen von hormonellen Wirkungen in Glas- oder in PET-Flaschen; ein deutlicher Unterschied war vielmehr zwischen verschiedenen Mineralwassermarken zu erkennen.“

„Beide Tests erlauben keine Rückschlüsse auf die Substanzen, die die hormonartige Wirkung im Wasser verursachen.“

„ Aus Sicht des BfR müssen Verbraucher aufgrund der Studienergebnisse der Goethe Universität Frankfurt nicht auf Mineralwasser aus PET-Flaschen verzichten.“

Dem BfR sind keine bei der PET-Herstellung eingesetzten Substanzen mit entsprechender hormoneller Wirkung bekannt, die in das Mineralwasser übergehen könnten.“

„Die Ergebnisse werfen vor allem die Frage nach den Substanzen und ihrem Eintrittspfad auf“.

[http://www.bfr.bund.de/cm/208/bfr\\_bewertet\\_untersuchungsergebnisse\\_zu\\_mineralwasserproben\\_mit\\_hormonaehnlicher\\_wirkung.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/208/bfr_bewertet_untersuchungsergebnisse_zu_mineralwasserproben_mit_hormonaehnlicher_wirkung.pdf)

B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay

AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010



**Stellungnahme des Bundesinstitutes für Risikobewertung (25.03.2009):**

„Grundsätzlich hält das BfR östrogenartige Wirkungen durch Mineralwässer für problematisch.“

„ Aus Sicht des BfR ist eine Bestätigung der vorliegenden Testergebnisse allerdings erforderlich.“

„Für eine rationale Bewertung der beobachteten Effekte wäre darüber hinaus jedoch vor allem die Identifizierung der verantwortlichen Kontaminanten und die Bestimmung der vorhandenen Konzentrationen von vorrangiger Bedeutung.“

B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay

AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010





Literaturstellen und Hinweise zur Thematik „Hormonelle Aktivität in Mineralwässern“

**Einsatz eines biologischen Testsystems (E-Screen) in der amtlichen Lebensmittelüberwachung zum Nachweis estrogen wirksamer Substanzen**

G. Böhmeler, R. Kohnen, U. Borowski und A. Rühle

Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) – Lebensmittelinstitut Braunschweig

J. Verbr. Lebensm. 1 (2008): 325-331  
1661-5751(08)040325-7  
DOI10.1007/s00003-008-0055-9  
© Birkhäuser Verlag, Basel, 2008

„Alle untersuchten Trinkwässer zeigen ein negatives Ergebnis“.

„Von den 37 Mineral- und Tafelwässern wurden 8 Proben als estrogen wirksam eingestuft.“

„...es zeigte sich, dass teilweise schon die Quellwässer einen positiven Befund im E-Screen aufwiesen, sodass ein Übergang estrogen wirksamer Substanzen von der Verpackung in das Wasser eher unwahrscheinlich ist.“

„In weiterführenden physikalisch-chemischen Untersuchungen muss geklärt werden, welche Substanzen für die estrogene Wirksamkeit der Wässer verantwortlich sind.“

B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay

AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010



Literaturstellen und Hinweise zur Thematik „Hormonelle Aktivität in Mineralwässern“

**Screening of estrogen-like activity of mineral water stored in PET bottles**

Barbara Pinto\*, Daniela Reali

Department of Experimental Pathology, Medical Biotechnology, Infectiology and Epidemiology, University of Pisa,  
37 Via San Zeno, 56127 Pisa, Italy

Received 21 February 2008; received in revised form 24 June 2008; accepted 24 June 2008

Int. J. Hyg. Environ. Health  
212 (2009) 228–232

**Untersuchung von 30 in PET-Flaschen abgefüllten Mineralwässern von 9 italienischen Herstellern mit dem YES-Assay (Hefezelltest).**

**Bei 10 % der untersuchten Probenextrakte konnte eine Aktivität festgestellt werden.**

**Höchste Aktivität in Mineralwasser 23,1 ng/L EEQ.**

**Erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Mineralwassermarken.**

**Für Leitungswasser aus Quellen, Grundwasser und Oberflächengewässern wurden estrogene Aktivitäten von 0,46 ng/L bis zu 17,2 ng/L (EEQ) ermittelt.**

B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay

AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010





### Mögliche Ursachen für estrogene Aktivitäten in Mineralwasser

Eintrag von natürlichen und synthetischen Sexualhormonen nicht sehr wahrscheinlich.

**Eintrag von Xenoestrogenen über Verpackungsmaterialien, Schläuche, Verbindungen und Dichtungen aus Kunststoffen in das Mineralwasser.**

Kontaminationen, die schon in der Quelle auftreten können (wie dies auch bei anderen, nicht estrogen aktiven Substanzen der Fall sein kann).

Möglicherweise Eintrag von Phytoestrogenen



### Mögliche Ursachen für estrogene Aktivitäten in Mineralwasser

Während der Aufarbeitung oder durch die biologischen Testsysteme werden natürliche Verbindungen wie z.B. Huminstoffe zu estrogen aktiven Substanzen abgebaut bzw. metabolisiert.

Proben werden bei der Probennahme, bei der Aufarbeitung oder während der Messungen mit Xenoestrogenen kontaminiert.

Bei den Ergebnissen handelt es sich um Messartefakte, die von natürlichen Inhaltsstoffen der Mineralwässer (Mineralstoffe, Kohlendioxidgehalt u.ä.) verursacht werden.

### Mit welchen biologischen Testsystemen lassen sich estrogenere Aktivitäten bestimmen?

#### In vitro-Testsysteme

Hefezell-Assay: Reporter-Gen-Test  
 E-Screen-Assay: Proliferationstest  
 Forellenhepatozyten: Vitellogenin-Synthese  
 CALUX-ER: Reporter-Gen-Test  
 Usw.

- Mineralwasser (Wagner et al., Pinto et al.)
- Mineralwasser (Böhmler et al.)
- Mineralwasser (nicht veröffentl.)

#### In vivo-Testsysteme

Reproduktionstest (Amphibien, Mollusken)  
 Säugetiere (z.B. Uterusgewicht)  
 Usw.)

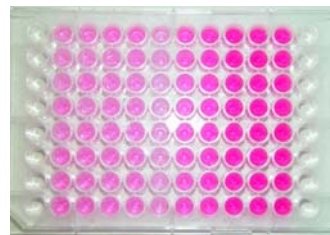
- Mineralwasser (Wagner et al.)

B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay  
 AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010

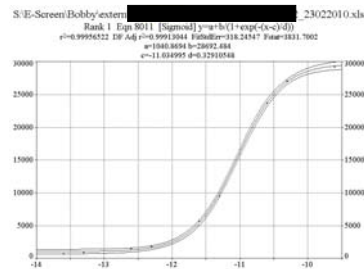


### Bestimmung der estrogenen Aktivität - Bsp. E-Screen-Assay

Konzentrationsreihe einer Substanz wird auf menschl. Brustkrebszellen gegeben  
 Nach mehrtägiger Inkubation wird als Endpunkt das Zellwachstum im Vergleich zu einer Negativkontrolle bestimmt.



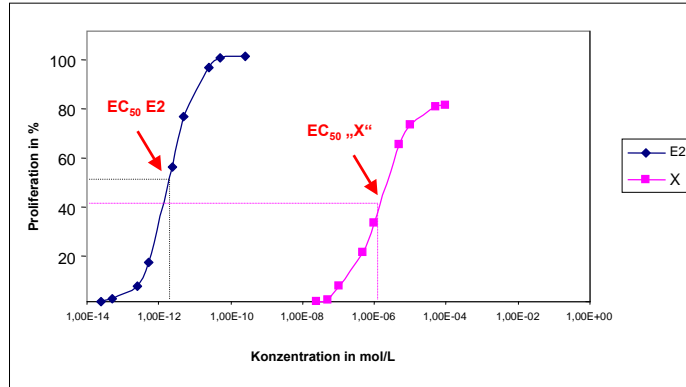
Erhalten wird eine Dosis-Wirkungsfunktion:  
 Zellzahl als Funktion der Konzentration des untersuchten Analyten



B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay  
 AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010



Einzelsubstanz-Analytik – Bestimmung der estrogenen Aktivität



17β-Estradiol-Äquivalentfaktor



$$EEF = \frac{EC_{50} (E2)}{EC_{50} (Testsubstanz)}$$

B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay  
AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010



EEF = 17β-Estradiol-Äquivalentfaktor

Vergleichbar mit TEF von PCDD/DF; Bezugssubstanz hier 2,3,7,8-TCDD

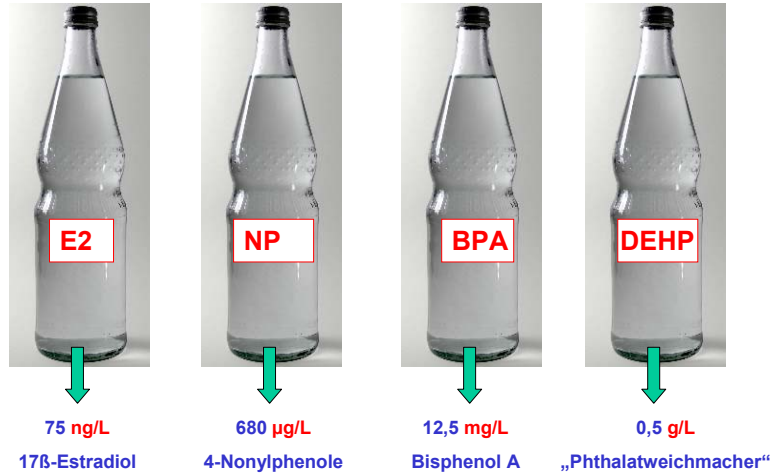
	EEF-Werte	
Natürliche Estrogene und Abbauprodukte	17β-Estradiol (E2)	1
	Estron	1,7E-02
	Estratriol	2,1E-01
Synthetische Hormone	17α-Ethinylestradiol	9,8E-01
Phytoestrogene	Genistein	2,9E-04
	Coumestrol	1,7E-03
Xenoestrogene	Techn. 4-Nonylphenole	1,1E-04
	Bisphenol A	6,0E-05
	2-Hydroxybiphenyl	1,5E-06
	3-t-Butyl-4-hydroxyanisol (BHA)	2,4E-06
	Phthalatweichmacher/Parabene	Ca. E-06 – E-07

B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay  
AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010



### Konzentrationsabschätzungen über EEF-Werte

Rechenbeispiel: Estrogene Gesamtaktivität 75 ng/L

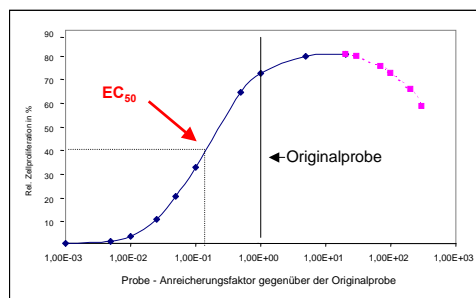


B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay  
 AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010

### Proben mit unbekannten Inhaltsstoffen

#### Untersuchung von Verdünnungs- (bzw. Anreicherungs)-Reihen eines Probenextraktes

- Probe**
- Anreicherung (SPE, FL/fl.)
- Probenextrakt**
- Verdünnungs-/Anreicherungsreihe in Medium
- E-Screen-Assay**



- ➔ Dosis-Wirkungsfunktion eines Probenextraktes: EC<sub>50</sub> wird in der Beispielfunktion bei einem Verdünnungsfaktor von ca. 1:10 erreicht.
- ➔ Die estrogenaktiven Inhaltsstoffe, die in 100 mL Probe enthalten sind, verursachen eine halbmaximale Proliferation.

B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay  
 AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010

### Berechnung der estrogenen Aktivität in einer Probe mit unbekanntem Inhaltsstoffen

Aus der Dosis-Wirkungsfunktion der Bezugssubstanz 17 $\beta$ -Estradiol wird ein EC<sub>50</sub>-Wert in mol/L erhalten.

Aus der Dosis-Wirkungsfunktion der Verdünnungsreihe eines Probenextraktes wird ein EC<sub>50</sub>-Wert in Verdünnungs-/Anreicherungsfaktoren erhalten.

➔ 17 $\beta$ -Estradiol-Äquivalentkonzentration = EEQ

$$EEQ = \frac{EC_{50} (E2) [mol/L] \times \text{Molekulargewicht E2 [g/mol]}}{\text{Anreicherungs-/Verdünnungsfaktor}}$$

= Estrogene Aktivität in Konzentrationseinheiten der Bezugssubstanz 17 $\beta$ -Estradiol

Die Gesamtkaktivität einer Probe setzt sich aus der Summe der Aktivitäten aller in einer Probe enthaltenen Substanzen zusammen (proliferierende, adverse und toxische Effekte)

➔ Aussagen über die Art der Substanzen können über den EEQ nicht getroffen werden.

### Untersuchung von Mineralwässern am ISWA

**Auftragsanalytik:** Bestimmung der estrogenen Gesamtkaktivität in natürlichen Mineralwässern mit dem E-Screen-Assay

**Probenherkunft:** Süddeutschland

**Probenart:** Abfüllungen in Glasflaschen, PET-Flaschen und Proben, die von den Auftraggebern direkt an den Brunnen genommen wurden.

**Probenanzahl:** > 150

Vorgehensweise: Doppelbestimmung, Festphasenanreicherung, 9 Anreicherungs-/Verdünnungsbereiche (=16fach-Bestimmung jeder Konzentrationsstufe)

**Ergebnis:**

In keiner der untersuchten Proben konnte eine estrogenen Gesamtkaktivität oberhalb der Bestimmungsgrenze des Testsystems von ca. 0,1 ng/L EEQ gefunden werden.

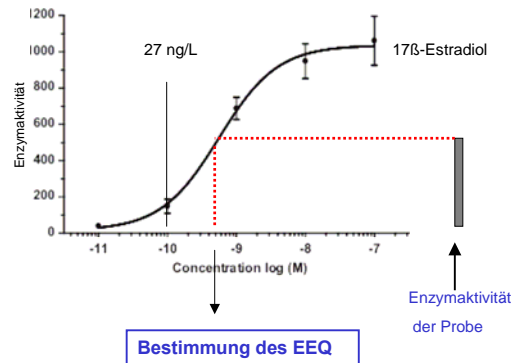
Vergleich von Untersuchungsergebnissen - I

YES-Assay (Hefezelltest) Reportergen-Test:

Pinto et al.	EEQ in Mineralwasser bis zu 23 ng/L	Probenanreicherung Faktor 100 und 200
Wagner et al.	EEQ in Mineralwasser bis zu 75 ng/L	Keine Probenanreicherung

Eine Verdünnungs- bzw. Anreicherungsreihe der Probe wird nicht erstellt  
Keine Dosis-Wirkungsfunktion des Probenextraktes

Quantifizierung:  
Einpunktbestimmung des eingesetzten Konzentrationsniveaus  
Abgleich mit Dosis-Wirkungsfunktion der Bezugssubstanz 17β-Estradiol



B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay  
AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010



Vergleich von Untersuchungsergebnissen - II

E-Screen-Assay (Zellproliferationstest)

Böhmler et al.	Festphasenanreicherung Vier fixierte Anreicherungsstufen der Probenextrakte (2, 4, 10, 20) Abgleich mit der Dosis-Wirkungsfunktion von 17β-Estradiol
----------------	--

**Aber:**

**Keine Konzentration für die „Estrogene Aktivität“ bestimmt. Angabe einer „Aktivität“ erfolgte über den Relativen Proliferationseffekt (RPE).**

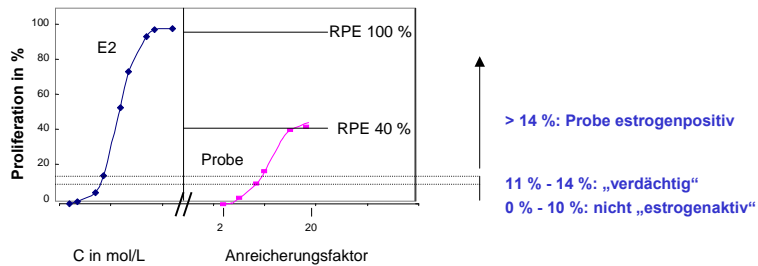
$$RPE = \frac{\text{Maximal durch eine Probe induzierbare Zellproliferation} \times 100}{\text{Maximal durch 17}\beta\text{-Estradiol induzierbare Zellproliferation}}$$

➔ Der RPE erlaubt keine Aussagen zur Konzentration der estrogenen Aktivität

B. Kuch, Hormonelle Aktivität in Mineralwasser – Untersuchungen mit dem E-Screen-Assay  
AQS-Jahrestagung 2009/2010, 03.03.2010



### Vorgehensweise zur Angabe einer „Aktivität“ über den relativen Proliferationseffekt (RPE)



**Hinweis auf das Vorkommen estrogenaktiver Substanzen;  
keine für eine Bewertung notwendige Konzentrationsangabe**

Unter ausschließlicher Berücksichtigung der RPE-Werte wären >30 % der am ISWA untersuchten Proben als estrogen positiv zu bewerten.

### Zusammenfassung und Bewertung

Untersuchungen zur estrogenen Aktivität von natürlichen Mineralwässern führen zu gegensätzlichen Ergebnissen.

Grund:

- Einsatz von unterschiedlichen biologischen Testsystemen
- Unterschiedliche Vorgehensweise bei der Aufarbeitung der Probenextrakte
- Unterschiedliches Vorgehen bei der Auswertung und der Definition der Aktivität

Bewertung der Datenlage:

Zum Teil in Mineralwässern gefundene estrogene Aktivitäten scheinen unrealistisch hoch zu sein.

Plausibilitätsbetrachtungen unter Berücksichtigung des Vorkommens aktiver Substanzen würden zu instrumentell einfach bestimmbar Konzentrationen führen.



## Zusammenfassung und Bewertung

### E-Screen-Ergebnisse werden als belastbar angesehen:

Das Testsystem hat sich bei der Bestimmung der estrogenen Gesamtaktivität in verschiedenen Proben (Abwasser, Oberflächengewässer) bewährt.

Abgleich mit parallel durchgeführter instrumenteller Analytik führte zu guten Übereinstimmungen

- ➔ Estrogene Aktivität in den untersuchten Mineralwässern  $< 0,1$  ng/L
- ➔ Hinweise auf das Vorkommen estrogen aktiver Verbindungen in äußerst geringen Konzentrationen
- ➔ Bei den Untersuchungen wurden frisch abgefüllte Mineralwässer eingesetzt; Aussagen über die estrogene Aktivität in länger oder u.U. unsachgemäß gelagerten Proben können nicht getroffen werden



## Zum Schluss:

Biologische Testsysteme können Wirkungen als Summenparameter erfassen, sind damit empfindlicher als instrumentelle Analysensysteme und günstiger.

### Aber:

- ➔ Validierung und Abgleich der Testsysteme unbedingt erforderlich.
- ➔ Absicherung von Befunden durch instrumentelle Analytik notwendig.



**Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit !**