

2. Material und Methode

2.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die Tierversuche wurden in den etablierten Forschungseinrichtungen des Mount Sinai-Research-Centers, Providenzia, Entre Rios, Argentinien durchgeführt. Es handelt sich um eine private Forschungseinrichtung, in der auf verschiedensten Forschungsgebieten gearbeitet wird, wodurch sich eine kostengünstige und unbürokratische Möglichkeit der Versuchsdurchführung bot. Meine Aufgabe war es nun, die dort gewonnenen und nach Deutschland importierten Proben von 18 Minipigs in Zusammenarbeit mit dem Institut NAFU (Berlin) in Berlin aufzuarbeiten und auf ihren Lindangehalt zu überprüfen. Für meine Arbeit selbst wurden insgesamt 10 Minipigs verwendet, die Daten der Minipigs 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15 und 16 wurden für die Habilitationsarbeit von Frau Dr. med. G. Kirchhoff mit dem Titel: „Experimentelle Untersuchungen zur Kumulation von γ -Hexachlorcyclohexan in verschiedenen Organen bei dermalen und oraler Applikation - Konsequenzen für die arbeitsmedizinische Prävention und Begutachtung“ benötigt.

2.2 Materialien bei Tierversuchen und Organaufbereitung

2.2.1 Versuchsmedikament

Als Versuchsmedikament wurde Jacutin ® Emulsion, Hersteller Hermal GmbH & Co, 21465 Reinbeck, benutzt. Dieses wird sonst zur Behandlung der Skabies (Krätze) verwendet.

Zusammensetzung:

10 g entsprechen 9,9 ml Emulsion und enthalten 30 mg Lindan. Nach Herstellerangaben liegt der γ -HCH Gehalt dabei bei 99,9 % (Hermal GmbH & Co; Rote Liste, 2007).

Sonstige Bestandteile:

Methyl-4-hydroxybenzoat, Natriumsalz (Konservierungsmittel), Benzylbenzoat, Methylcellulose, alpha-Dodecyl-omega-hydroxymacrogol-4, Natriumhydrogensulfat, Methanol, 2 – Octyl – 1 – Dodecanol, gereinigtes Wasser.

Das Medikament wurde aus Packungen mit einem Inhalt von 200 ml entnommen.

Bei Überempfindlichkeit gegen Paraben (Alkyl-4-Hydroxybenzoaten) sollte das Medikament nicht angewandt werden. Des Weiteren besteht eine Anwendungsbeschränkung für Patienten mit zentralnervösen Erkrankungen, wie Epilepsien, schwer vorgeschädigter Haut oder anderen Begleiterkrankungen.

Während der Schwangerschaft und Stillzeit sollte das Medikament nicht angewendet werden (Hermal GmbH & Co; Rote Liste, 2007).

Als Nebenwirkung sind bekannt:

Unruhe, Diarrhoe, Benommenheit, Kopfschmerzen, Übererregbarkeit, Zittern, Tachykardie, Übelkeit, Erbrechen, Schwindelgefühl, Miosis, Zyanose, Bewusstlosigkeit und allergische Hautreaktionen wie Juckreiz und Rötung (Hermal GmbH & Co; Rote Liste, 2007).

2.2.2 Labormaterialien

Zur Aufbereitung der organischen Proben wurden folgende Chemikalien verwendet:

Bezeichnung	Menge	Verwendung	Hersteller	Bezug von
n-Hexan	10 l	zur Analyse	Merck	Charité Laborbedarf
Aceton	5 l	zur Analyse	Merck	Charité Laborbedarf
Natriumsulfat, wasserfrei	3 kg	zur Analyse	Merck	Charité Laborbedarf
Schwefelsäure 99 %	200 ml		Merck	Charité Laborbedarf
Aqua bidest				Charité Laborbedarf

Tabelle 5: Labormaterial

2.2.3 Laborgeräte

An Gerätschaften wurden benutzt:

Bezeichnung	Hersteller	Sonstiges
Tischabzug	Laborbau Syke	
Rüttler	Janke und Kunkel	IKA VIBRAX VXR Typ VX8
Feinwaage	Sartorius	research
Mörser abriebfest	Apotheke	5 cm Durchmesser
Klarglasgläschen	Supelco 15 ml	Phenolharzdeckel mit Teflondichtung
Makropipette	Eppendorf	Multipipette
Feinpipette	Eppendorf	Reference 1000 ml

Tabelle 6: Laborgeräte

Des Weiteren wurden benötigt:

Kühlschrank Westinghouse mit Tiefkühlabteilung -23° Celsius (Westinghouse, Chicago, USA), Tischwaage Punto mit Edelstahlplatte und Skalierung 0,1 g (General electric, Cordoba, Argentinien) sowie diverse Metallspatel und Plastikspatel, chirurgische Pinzetten, Einmalskalpelle, Reagenzgläser 10 ml aus Glas mit Verschlussstopfen Teflon (Supelco), Einmalspritzen der Größe 10 ml und 20 ml mit Skalierung.

2.2.4 Versuchstiere

Die Tierexperimente fanden in den Forschungseinrichtungen des Mount Sinai-Research-Centers, Providenzia, Entre Rios, Argentinien statt. Die 18 Minipigs stammten aus einer Zucht von einem Züchter und wurden von diesem als „cerdos de Andes“ bezeichnet. Die Rasse ist eine Kreuzung aus dem dort üblichen Hausschwein und einer Rasse aus den Anden. Das Gewicht der ausgewachsenen Schweine beträgt ca. 60 kg. Die Färbung war meist hellbraun bzw. gescheckt und könnte von einer Einkreuzung europäischer Minischweine, zum Beispiel des Münchner Minipigs stammen. Durch eine artgerechte Haltung war die Gesundheit der Tiere garantiert und wurde veterinärmedizinisch überprüft.

Die verwendeten Minipigs wogen anfänglich im Durchschnitt zwischen 4 und 4,5 kg und waren drei Wochen alt. Die Geschlechtsverteilung war männlich zu weiblich eins zu eins.

2.2.5 Extraktionslösung

Um eine vollständige Extraktion aus dem organischen Material zu erreichen, wurde eine Lösung aus n-Hexan und Azeton hergestellt. Der wasserlösliche Anteil der Proben wurde durch das Azeton ausgewaschen. Beide Chemikalien wurden im Verhältnis 5:1 gemischt und das Gemisch im Abzug aufbewahrt.

Im Bereich der Lebensmittelchemie wird dieses Verfahren angewandt und hat sich bewährt.

2.2.6 Wiederfindungsstandard

Zur Wiederfindung des γ -HCH wurde ein Standard mit der gleichen Lipophilie benötigt, hierzu eignete sich $d_6\alpha$ -HCH. Durch diesen Umstand wurde eine hohe Löslichkeit in n-Hexan erreicht. Das $d_6\alpha$ -HCH wurde im Labor der NAFU, Berlin hergestellt und zum Vergleich der Referenzwerte zur Verfügung gestellt.

2.3 Material für die Organextraktmessung

2.3.1 Labormaterial

Als Labormaterial wurde verwendet:

Bezeichnung	Hersteller	Reinheit
n-Hexan	Promochem	picograde
Petrolether (30 - 60° C)	Promochem	picograde
Dichlormethan	Promochem	picograde
Florisil® (60-100 mesh)	Macherey & Nagel	aktiv, mit 0 % H ₂ O

Tabelle 7: Labormaterial

2.3.2 Laborgeräte für die Organextraktmessung

Hier wurden folgende Geräte eingesetzt:

Gerät	Typ	Hersteller
Gaschromatograph	5890 II	Hewlett Packard
Quadrupol-MS-System	MSD 5972	Hewlett Packard
Controller für Autosampler	7673	Hewlett Packard
Autosampler	HP 6890	Hewlett Packard
Injektor inclusive Controller	KAS 3	Gerstel
Ionization-Gauge Controller	59822 B	Hewlett Packard
High-Vacuum-Pump (Vorpumpe)	E2M2	Edwards

Tabelle 8: Laborgeräte

2.4 Methode

2.4.1 Versuchsablauf

Nach veterinärmedizinischer Untersuchung wurden alle Tiere zur gleichen Zeit in die Ställe verbracht. Die Versuchsreihe begann somit für alle Minipigs gleichzeitig. Alle Tiere wurden so gekennzeichnet, dass sowohl am Tier als auch am Stall zu erkennen war, um welches Tier es sich handelte. Gemäß den gängigen Vorschriften eines Versuchsprotokolls wurden die Tiere mit unterschiedlichen Mengen an Versuchsmedikament belastet (siehe Tabelle 9.)

Datum	Schwein	Schwein	Schwein	Schwein	Schwein
	1 + 2	3 + 4	5 + 6	17 + 18	11 + 12
20.02.2003	keine Applikation	keine Applikation	keine Applikation	keine Applikation	5 ml oral über 31 Tage;
21.02.2003	keine Applikation	keine Applikation	keine Applikation	keine Applikation	
22.02.2003	keine Applikation	keine Applikation	keine Applikation	keine Applikation	
23.02.2003	keine Applikation	keine Applikation	keine Applikation	keine Applikation	
24.02.2003	keine Applikation	keine Applikation	keine Applikation	keine Applikation	
25.02.2003	keine Applikation	keine Applikation	keine Applikation	keine Applikation	120 Tage keine Applikation;
26.02.2003	keine Applikation	66 ml oral	8 ml oral	66 ml kutan	Tötung nach 120 Tagen
27.02.2003	keine Applikation	66 ml oral	8 ml oral	66 ml kutan	
28.02.2003	keine Applikation	66 ml oral	8 ml oral	66 ml kutan	
01.03.2003	Tötung	Tötung	Tötung	Tötung	

Tabelle 9: Versuchsablauf

Die Schweine Eins und Zwei erhielten zehn Tage das im Versuch übliche Futter und wurden, ohne das Medikament erhalten zu haben, am zehnten Tag nach der morgendlichen Fütterung getötet.

Die Schweine Drei und Vier erhielten sechs Tage das übliche Futter. An den Tagen sieben bis neun wurde das handelsübliche Jacutin mit einer Dosierung von 66 ml zugesetzt. Dies entspricht einer täglichen Menge von 199,99 mg und einer Gesamtmenge von 600 mg γ -HCH.

Die Schweine Fünf und Sechs erhielten ebenfalls sechs Tage das übliche Futter. An den Tagen sieben bis neun wurde das übliche Jacutin mit einer Dosierung von 8 ml zugesetzt. Dies entspricht einer täglichen Menge von 24,24 mg γ -HCH.

Daraus resultiert eine Gesamtmenge von 72,72 mg γ -HCH.

Auch die Tiere Drei bis Sechs wurden am zehnten Tag getötet.

Die Schweine 17 und 18 wurden sechs Tage lang auf die übliche Art und Weise gefüttert und erhielten am siebten, achten und neunten Tag die tägliche Menge von 66 ml, entspricht 199,9 mg HCH, der handelsüblichen Jacutin Emulsion auf Rücken- und Flankenhaut sowie auf die angrenzende Bauchhaut. Daraus resultiert für die Schweine 17 und 18 eine Gesamtmenge von 600 mg Lindan.

Die Tötung erfolgte am zehnten Tag.

Die Schweine Elf und Zwölf wurden insgesamt über 30 Tage mit täglich 5 ml handelsüblicher Jacutin Emulsion oral gefüttert, dies entspricht einer täglichen Dosis von 15,15 mg und einer Gesamtdosis von 454,5 mg γ -HCH.

Am 31. Tag wurde die Medikamentenzufuhr beendet, die Schweine in getrennter Haltung weitergefüttert.

Nach 120 Tagen wurden sie nach der beschriebenen Methode getötet.

2.4.2 Haltung der Versuchstiere

Die Tiere wurden getrennt in Einzelställen mit einer Bodenfläche von 1,5 m² gehalten.

Eine gute Entsorgung der Abluft war durch die Lokalisation der Ställe an den Flanken eines offenen Tierstalles gewährleistet. Zweimal täglich erfolgte die Fütterung der Minipigs.

Grundsätzlich entsprach die Haltung den üblichen Methoden der Schweinehaltung.

Die verabreichte Futtermischung bestand aus Maisschrot, Weizenschrot und Frischmilch. Sie war allerdings gegenüber der normalen Mastfütterung um 30 % reduziert. Das verwendete Getreide stammte aus ökologischem Anbau aus der näheren Umgebung. Es wurde sichergestellt, dass dem Futter keine Chemikalien oder Pestizide zugesetzt werden konnten, auch bei der Produktion wurden keine Fertilisanten oder Pflanzenschutzmittel zugesetzt.

Die Futtermenge war bei allen Tieren gleich, freier Zugang zu Trinkwasser war gewährleistet.

Die Ställe wurden täglich sechs Mal von Hand von Abfällen und Exkrementen gereinigt, außerdem wurde die Anlage mit einem Wasserstrahl ausgespritzt.

Das dabei entstandene Spülwasser, sowie Abfälle und Exkremente wurden vorübergehend in einer abgeschlossenen Deponie eingelagert.

2.4.3 Applikation des Versuchsmedikamentes

Täglich zwischen acht und neun Uhr wurde das Medikament verabreicht.

Hierzu wurde aus einem Becherglas die entsprechende Menge mit einer Einmalspritze aufgezogen.

Für die orale Applikation wurde anschließend das Medikament mithilfe zweier Tierpfleger so gegeben, dass es vollständig vom Tier verschluckt wurde.

Zur kutanen Applikation wurde das Medikament in gleicher Weise vorbereitet wie zur oralen Applikation. Mittels Elektrorasierer wurde die Rücken-, Flanken- und Bauchhaut der Tiere rasiert. In diesen Bereichen wurde dann das Versuchsmittel mit einem Plastikspatel aufgetragen und so verrieben, dass es sich gleichmäßig verteilte. Durch eine anschließende Fütterung wurde erreicht, dass sich die Tiere beruhigten und nicht hinlegten. So wurde ein Abreiben des Versuchsmedikamentes verhindert.

2.4.4 Organprobengewinnung

Die letzte Fütterung erhielten die Tiere am Tag der Schlachtung um 9:00 Uhr. Zwischen 14:00 und 15:00 Uhr erfolgte die fachgerechte Tötung. Dabei wurden die Tiere dem Stall entnommen und dann durch einen Bolzenschuss betäubt. Im Anschluss wurden Aorta und Arteria pulmonales durch einen sogenannten Herzstich eröffnet. Anteile des herausfließenden Blutes wurden in einem Reagenzglas aufgefangen und aufbewahrt. Danach erfolgte die Obduktion des Tieres.

Mittels eines Messers wurden Thorax und Abdomen auf dem Labortisch eröffnet. Die inneren Organe wurden entnommen und auf eine Sektionsplatte aufgelegt. Durch eine saubere Organpräparation konnte erreicht werden, dass den Organproben keine Beimengungen von Bindegewebe oder Fett vorlagen. Hierzu wurden eine chirurgische Pinzette und ein Einmalskalpell benutzt. Auch diese Proben wurden in Reagenzgläser verpackt. Der Schädel des jeweiligen Tieres wurde sowohl längs, als

auch quer gespalten. Dadurch wurde eine problemlose Entnahme von Gehirngewebe und Nervus opticus möglich.

Um Knochenmaterial zu gewinnen, erfolgte eine Aufsägung des Femurknochens. So konnte ausreichend Knochenmark gewonnen werden.

Proben des Rückenmarks wurden durch eine Heraustrennung von 10 cm im Bereich der Brustwirbelsäule und eine anschließende Längsspaltung entnommen.

Da sich die Interkostalnerven der Tiere leicht und sauber präparieren ließen, wurden diese zur Gewinnung peripherer Nerven benutzt.

Die Haut als Organprobe wurde sorgfältig vom Unterhautgewebe abpräpariert.

Der Musculus psoas diente zur Gewinnung von Skelettmuskulatur.

Alle Organproben wurden in gekennzeichnete Reagenzgläser gelegt.

Folgende Proben wurden bei jedem Tier entnommen: Blut, Leber, Lunge, Haut, Niere, Herz, Skelettmuskulatur, Knochen, Knochenmark, Unterhautfettgewebe, Bauchfett, Gehirnschicht weiß, Gehirnschicht grau, Rückenmark, peripherer Nerv, Magenwand, Haare, und Nervus opticus.

Das Gewicht der Probe lag je nach Organ zwischen 0,5 und 10 g. Unmittelbar nach ihrer Gewinnung wurden die Proben tiefgefroren.

2.5 Verarbeitung der Proben

2.5.1 Gewebsaufbereitung

Auf dem Luftweg wurden die tiefgefrorenen und in Trockeneis gelagerten Proben von Prof. Dr. med. R. Kirchhoff nach Deutschland eingeführt und hier direkt in eine Gefriertruhe mit einer Aufbewahrungstemperatur von -71 °C verbracht.

Zur Bearbeitung wurden die Proben dann fraktioniert aufgetaut. Von jeder Probe wurde mittels eines Metallspatels und Einmalskalpells eine maximale Menge von einem Gramm abgetrennt und auf einer Elektrofeinwaage eingewogen. Bei verschiedenen Geweben war dies nicht möglich, da nur eine zu kleine Menge zur Verfügung stand (zum Beispiel Nervus opticus oder Haare). Die Einwaage erfolgte auf einem Uhrglas bzw. Reagenzgläsern mit einem Durchmesser von ca. 5 cm. Von allen Proben wurde das Gewicht protokolliert.

Nach dem Abwiegen wurden alle Gerätschaften mit n-Hexan aus- bzw. abgespült, die mit der jeweiligen Probe in Berührung kamen. So konnte eine Verschleppung des Lindans vermieden werden.

Die weitere Aufarbeitung erfolgte unter einem Laborabzug.

2.5.2 Das Kaltextraktionsverfahren

Nachdem die Gewebeprobe in den Steinmörser verbracht wurde, wurden 500 µl hochkonzentrierte Schwefelsäure zugesetzt und die Probe 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Wiederfindungsstandard in einer Menge von 10 bzw. 20 µl zugesetzt. Außerdem wurden der Probe zur Trocknung 5 g wasserfreies Natriumsulfat zugesetzt.

Um einen homogenen Gewebsbrei zu erhalten, wurde die Probe nun im Mörser manuell mit dem Pistill fein zerrieben.

Es erfolgte eine erneute Inkubation von 30 Minuten. In dieser Zeit verfärbte sich das organische Material ins Bräunliche. Um einen weiteren Zellaufschluss zu erreichen, wurde das Substrat noch einmal manuell gemörsert.

Das so entstandene Material wurde nun mittels eines Glastrichters in ein Extraktionsgefäß überführt. Der Mörser wurde mit 3 ml der Extraktionslösung von 8 ml (n-Hexan und Aceton im Verhältnis 4:1; 4 Teile n-Hexan, 1 Teil Aceton) gespült und diese Lösung wurde ebenfalls in das Gefäß überführt. Hierbei war ein schnelles Arbeiten wichtig, da sich das Extraktionsgemisch schnell verflüchtigt. Das Extraktionsgefäß wurde mit der Menge von 2 ml an Extraktionslösung aufgefüllt und einmal manuell geschüttelt, um zu gewährleisten, dass die gesamte Menge an Gewebsbrei angefeuchtet wurde, wobei die Bildung von Klumpen vermieden wurde.

Mithilfe eines elektronischen Rüttlers wurden die Gläschen über einen definierten Zeitraum gerüttelt. So konnte das Gemisch inkubieren und extrahieren.

Die Extraktion erfolgte stufenweise. Dabei wurde nach einem definierten Zeitpunkt der Überstand im Extraktionsröhrchen abpipettiert und durch restliche Extraktionslösung ersetzt. Dieser Vorgang wurde 1- bis 2-mal wiederholt.

Während des Rüttelns wurde darauf geachtet, dass sich keine festen Bestandteile im Röhrchen bilden konnten. Aus diesem Grund wurden die Röhrchen mehrmals gewendet und auch auf den Kopf gestellt.

Das in diesem Prozess entstandene Extraktionsprodukt wurde im Anschluss im Labor der NAFU weiter aufgearbeitet.

2.6 Differenzierung der Aufbereitungsverfahren

Durch mehrere Versuche konnten wir das Aufbereitungsverfahren dahin gehend evaluieren, inwieweit sich bei der Wiederfindung des Standards Unterschiede durch die Aufbereitungsart ergeben würden.

So wurde eine mögliche Beeinflussung der Stabilität des in den Proben vorhandenen γ -HCH und der Durchflussrate des Extraktes in der Florisilsäule durch die Schwefelsäule ausgeschlossen, indem einige Proben einmal mit Schwefelsäure bearbeitet wurden und einmal ohne.

Hierbei lagen die Wiederfindungsstandards bei 98 %.

Des Weiteren wurde der Standard zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Aufarbeitung, jedoch immer vor der Extraktion, zugegeben. Die Zugabe erfolgte einmal mit der Schwefelsäure, einmal nach Inkubation mit Schwefelsäure und einmal nach der Zugabe von wasserfreiem Natriumsulfat. So konnte ausgeschlossen werden, dass sich der Wiederfindungsstandard im porösen Material des Mörsers und des Pistills ablagert und sich so die Rate vermindert. Die Wiederfindungswerte dieser Versuche zeigten keine signifikanten Unterschiede.

In einem weiteren Versuch wurden die Zeiten, sowie die Positionen der Glasampullen auf dem elektrischen Rüttler variiert. Zum einen wurde hier eine Stunde extrahiert, wobei nach einer halben Stunde abpipettiert wurde und erneut mit Extraktionslösung aufgefüllt wurde. Zum anderen wurden drei Stunden extrahiert, wobei jeweils nach einer Stunde nachextrahiert wurde.

Um eine Verschleppung des Standards zu verhindern, wurde der Mörser und das Pistill mit Extraktionslösung nachgespült und diese Lösung mit in das Gläschen überführt.

Aufbereitung nach der Methode wie vorstehend:

Organproben mit der Nummer:

Schwein 1 (Proben 011 bis 017 und 0111 bis 0118)

Schwein 2 (Proben 11 bis 17 und 111 bis 118)

Schwein 3 (Proben 021 bis 027 und 029 bis 0218)

Schwein 4 (Proben 21 bis 27 und 29 bis 218)

Schwein 5 (Proben 031 bis 037 und 039 bis 0318)

Schwein 6 (Proben 31 bis 37 und 39 bis 318)

Schwein 12 (Proben 62 bis 67 und 69 bis 618)

Diese Proben wurden zusammenfassend wie folgt aufgearbeitet:

1. Abwiegen der Probe auf ca. 1 g
2. Überführung der Probe in einen abriebfesten Mörser
3. Zugabe von 0,5 ml konzentrierter Schwefelsäure
4. Zugabe von 10 µl des Standards
5. Zugabe von 5,5 g Natriumsulfat
6. Homogenisierung durch manuelles Mörsern und anschließendes ruhen lassen für eine Stunde
7. Überführung des entstandenen Materials in verschließbare Gläschen
8. Zusatz von 2 ml Aceton und 4 ml n-Hexan
9. Ausschütteln und Extrahieren des Lindans über 30 Minuten auf dem Rüttler
10. Abpipettieren des entstandenen Überstandes
11. Zusatz von 5 ml n-Hexan und erneutes Ausschütteln und Extrahieren über 30 Minuten auf dem Rüttler
12. Abpipettieren des Überstandes
13. Weiterverarbeitung durch das Labor NAFU

Die Organproben mit der Nummer:

Schwein elf (Proben 061 bis 0619),

Schwein 17 (Proben 091, 094 bis 098 und 0910 bis 0913, 0916),

sowie die Proben 91, 92 des Schweines 18 und die Proben 018, 019, 18, 19, 110, 028, 0219, 28, 219, 038 und die Proben 38, 61 und 68 wurden wie folgt aufgearbeitet:

1. Ansetzen einer Mischung aus Aceton und n-Hexan im Verhältnis 1:5
2. Abwiegen der Probe auf circa 1 g
3. Zugabe von 0,5 ml konzentrierter Schwefelsäure
4. Zugabe von 20 µl des Standards
5. Zugabe von 5,5 g Natriumsulfat
6. Homogenisierung durch manuelles Mörsern und anschließendes Ruhen lassen für eine Stunde
7. Überführung des entstandenen Materials in verschließbare Gläschen
8. Ausspülen des Mörsers mit 5 ml des Gemischs
9. Überführung der 5 ml aus dem Mörser zu der Probe ins Gläschen
10. Auffüllen des Gläschens mit weiteren 4 ml des Extraktionsgemisches
11. eine Stunde extrahieren auf dem Rüttler
12. Abpipettieren des Überstandes und erneutes Auffüllen mit 5 ml Extraktionsgemisch
13. weitere zehn min auf dem Rüttler extrahieren
14. erneutes Abpipettieren des Überstandes und Wiederauffüllen mit 3 ml Extraktionsgemisch
15. weitere zehn Minuten auf dem Rüttler
16. Überstand abpipettieren

Die Proben 93, 94, 95, 96, 97, 99, 914, 915, 916, 918, 092, 093, 099, 0914, 0915, 0917 und 0918 wurden bis zum Schritt sieben der ersten Methode aufgearbeitet. Hier wurden die Gläschen allerdings mit 8 ml Hexan und 2 ml Aceton aufgefüllt und anschließend eine volle Stunde auf dem Rüttler extrahiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert.

2.7 Bestimmung von Lindan in der Extraktionslösung

2.7.1 Beschreibung des Verfahrens

Dieses Verfahren basiert auf der Methode des NAFU-Labors in Berlin (50). Die bestimmbare Verbindung war hierbei Lindan. Das Clean-up erfolgte durch eine Absorptionschromatographie über Florisil. Gemessen wurde mittels eines Gaschromatographen und Massenspektrografie.

2.7.2 Auswertung

Mittels der ChemStationSoftware der Firma Hewlett-Packard erfolgte auf einem PC die Auswertung des Chromatogramms. Die Quantifizierung konnte mittels eines internen Standards erfolgen. Die ermittelten Gehalte wurden über die Wiederfindung von vor der Extraktion zugegebenem d_6 -HCH korrigiert (NAFU).

Herstellung des internen Standards:

Zur Beurteilung der Verluste beim Einengen und des Reinigungsprozesses wurde Isodrin – Hexachlorohexahydroendo, endodimethanophthalene (C₁₂H₈Cl₆) zugesetzt.

Isodrin wurde einer Stammlösung entnommen und in n-Hexan so verdünnt, dass die gleiche Konzentration, z. Z. 824 ng/ml, wie in den Kalibrierstandards vorliegt.

2.7.3 Bestimmung des Wiederfindungsstandards

In einer Menge von 10 oder 20 µl wurde der Wiederfindungsstandard gleichzeitig mit der Schwefelsäure zu den eingewogenen Organproben in den Mörser zugegeben.

Bei dem Teil der Proben, die ab dem 14.11.2003 verarbeitet wurden, es handelte sich um die Kurzzeitversuche mit hohen oralen Fütterungsmengen, wurde statt 10 ml 20 ml, also die doppelte Menge, an Standard hinzugesetzt, da die Spreizung in der Kalibrierung sonst zu groß geworden wäre und somit die Messgenauigkeit gelitten hätte.

Aus diesem Grund musste zusätzlich eine Verdünnung auf ein Zehntel des Extraktes erfolgen.

2.7.4 Herstellung des Kalibrierungsstandards

Es war erforderlich zwölf Kalibrierungslösungen in n-Hexan herzustellen. Diese enthielten den Wiederfindungsstandard in geometrischer Reihe im angegebenen Konzentrationsbereich.

Isodrin (der interne Standard) ist in konstanter Konzentration enthalten (z. Z. 824 ng/ml). Der Analyt ist Lindan mit einer Konzentration von 10 – 50000 ng/ml.

d₆-HCH diente als Wiederfindungsstandard in einer Konzentration von 10 – 500 ng/ml.

2.7.5 Herstellung des Eluationsgemisches

Dichlormethan und Petrolether (30-60°C) wurden in einem Verhältnis von 80:20 (v:v) gemischt.

2.7.6 Vorbereitung der Florisilsäule

Das Florisil (60-100 mesh) wurde 16 Stunden bei einer Temperatur von 150 °C getrocknet und anschließend in einem verschlossenen Gefäß bis zum Gebrauch aufbewahrt. Durch diese Art der Aufbewahrung konnte die Wiederaufnahme von Luftfeuchtigkeit verhindert werden. Ansonsten wäre der Reinigungsvorgang der Extraktionslösung erheblich behindert worden.

Zur Vorbereitung der Glassäulen wurden sie mit je 5 g getrocknetem Florisil® luftblasenfrei eingeschlämmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Eluationsmittel bis zur Säulenoberfläche abgelassen wurde. Diese Säulen hatten einen Durchmesser von ca. 1 cm und 25 cm Länge und waren mit Fritte und Teflonhahn ausgestattet.

2.7.7 Aufbereitung

Die weitere Aufarbeitung der Organprobe erfolgte im Rotationsverdampfer. Hierzu wurde der Extrakt oder ein Aliquot in einen Spitzkolben überführt und danach im Rotationsdampfer schonend bis zur Trockne eingengt.

Mittels Eluationsgemisch wurde der entstandene Rückstand auf die vorbereitete Florisilsäule überführt. Dann wurde das Gemisch mit insgesamt 30 ml Eluationsgemisch eluiert. Dieses Eluat wurde erneut im Rotationsdampfer fast bis zur Trockne eingengt. Am Stickstoffstrom wurden Lösungsmittelreste abgeblasen.

Der Rückstand wurde dann in 0,5 ml interner Standardlösung gelöst und in Ampulfläschen überführt.

Diese wurden dann in eine Aufnahmebatterie des Gaschromatographen bzw. des Massenspektrometers eingestellt, der Inhalt eingespritzt und gemessen.

2.8 Gaschromatographische Bedingungen

Säule: Kapillarsäule ZB-5 (ca. 45 m; 0,25 mm i. d. 0,25 µm Film) Zebron

Injektion: splitlos; 1 µl bei 70° C; 12 K/min auf 350 °C, 6 min bei 350 °C

Temperaturprogramm:

Rate	Temperatur	Zeit
	60 °C	1,0 min
35 K/min.	200 °C	0,0 min
3 K/min.	218 °C	0,0 min
35 K/min.	288 °C	3,0 min

Druckprogramm:

Rate	Druck	Zeit
	100 kPa	1,0 min
13 kPa/min	152 kPa	0,0 min
1 kPa/min	158 kPa	0,0 min
16 kPa/min	190 kPa	3,0 min

Gesamtanalysezeit: 16,00 min
 Transferlinetemperatur: 320 °C
 Interner Methodenname: M2HCH1.M

Tabelle 10

2.9 Massenspektrometrische Bedingungen

GC/MS-Kopplung: direkt
 Ionisierung: Elektronenstossionisation (EI)
 Ionisierungsenergie: 70 eV
 Quelltemperatur: 190 °C
 Scanbereich: SIM (interne Methode: M2HCH1.M)
 Scanzeit: ca. 2 Zyklen/s

Detektionsmassen im Single-Ion-Modus

Interner Standard	Ion 1	Ion 2	Ion 3
Isodrin	263	193	195
Wiederfindungsstandard			
d ₆ γ-HCH	224	222	--
Analyt Lindan	219	217	254

Tabelle 11

2.10 Statistik

Nach Beratung durch einen zuständigen Statistiker des Instituts für medizinische Statistik und Datenverarbeitung des Klinikums Großhadern der Ludwig–Maximilians–Universität München, erfolgte die Auswertung der ermittelten Versuchsergebnisse. Es wurde SPSS 11.5 für Windows (SPSS Inc., USA) verwendet.

2.10.1 Organkonzentration als arithmetisches Mittel

Die Gewebekonzentrationen in den einzelnen Organen wurden wegen der geringen Fallzahl als arithmetischer Mittelwert berechnet. Die Ergebnisse der Bestimmung der organspezifischen γ - HCH Anreicherung wurden mittels One Way ANOVA gegenüber den übrigen Therapiegruppen bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$ verglichen. Anschließend wurden die Therapiegruppen mittels Student-Neumann-Keuls-Test paarweise bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$ analysiert.

2.10.2 Standardabweichung

Die Standardabweichung (SD) eines gegebenen Datensatzes wird abgeleitet von der Varianz (VAR), also dem arithmetischen Mittelwert aller quadrierten Abweichungen der Daten von ihrem arithmetischem Mittelwert:

$$\text{VAR} := \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x}_{\text{ari}})^2$$

Die Standardabweichung ist nun als die Quadratwurzel aus der Varianz definiert:

$$\text{SD} := \sqrt{\text{VAR}}$$

2.10.3 „Standard Error of the Mean“

Die Fallzahl einer Gruppe betrug zwei, von daher wurde aus der Standardabweichung der „Standard Error of the Mean“ nach der folgenden Formel berechnet: $\delta = \delta / \sqrt{N}$.

Der aus dieser Formel errechnete Wert wurde nun anstelle der Standardabweichung für die Streuung zugrunde gelegt. Dabei ist δ die Standardabweichung und N steht für die Probenzahl.

Die Normalverteilung wird durch diese Formel nicht dargestellt, allerdings zeigt diese Formel aber, dass der „Standard Error of the Mean“ umso kleiner wird, je kleiner die Probenzahl ist. Daraus folgt, dass diese Formel für kleine Probenmengen geeignet ist, da die Verteilung nicht so breit gestreut wird.

2.10.4 Korrelation der Anreicherungsraten

Zur Berechnung der Korrelation der organspezifischen γ -HCH Anreicherungsraten wurde eine Multiple-Linear-Regression Analyse bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$ durchgeführt. Die Normalverteilung sowie die Varianz wurden bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,1$ bzw. $p \leq 0,6$ getestet.