

# **Bericht**

## **„Ausgewählte Proteomik- und Metabolomik-Studien nach Einsatz der Power Tube QuickZap Technologie“**

Vorgelegt von Prof. Dr. Dr. Harun Parlar

Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und Chemische Lebensmitteltechnologie;  
Forschungszentrum für Brau- und Lebensmittelqualität, Technische Universität München,  
Weihenstephaner Steig 23, D-85354 Freising-Weihenstephan

Tel.: +49-(0)8161-71-3283; Fax: +49-(0)8161-71-4418

E-Mail: [cta@wzw.tum.de](mailto:cta@wzw.tum.de), [parlar@wzw.tum.de](mailto:parlar@wzw.tum.de)

**Freising-Weihenstephan, 21. Mai 2008**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	<b>Themenbereich a): Stressprozesse induziert in Zellen (Proteomik)</b>	<b>3</b>
2.2	<b>Themenbereich b): Metabolisierung</b>	<b>4</b>
2.3	<b>Themenbereich c): Lipidhydroperoxidbildung (Krankheitsbilder)</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>6</b>
3.1	<b>Zu Themenbereich a):</b>	<b>6</b>
3.1.1	Quantitatives Proteinprofiling und Proteinextraktion	8
3.1.2	Electrophoretische Trennung	8
3.1.3	Bestimmung des Massenfingerprints mittels MALDI-TOF-MS	9
3.2	<b>Zu Themenbereich b):</b>	<b>10</b>
3.3	<b>Zu Themenbereich c):</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>12</b>
4.1	<b>Zu Themenbereich a)</b>	<b>12</b>
4.2	<b>Zu Themenbereich b)</b>	<b>14</b>
4.2.1	Bestimmung von Chlorphenolen in Blut und Urin	14
4.3	<b>Zu Themenbereich c)</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>Literatur</b>	<b>38</b>

# 1 Problemstellung

Im Rahmen einer Studie konnte festgestellt werden, inwieweit die proteomischen und metabolischen Parameter durch den Einsatz der PowerTube-QuickZep-TEVS Technik ändern. Hierzu wurden drei Themenbereiche ausgewählt:

- a) Mögliche Änderung der Proteomik-Muster von Human HL-60 und *Saccharomyces cerevisiae* (W303) Zellen nach Anwendung der PowerTube-Technik
- b) Einfluss von PowerTube Technik auf die Metabolisierungsraten der Modellsubstanzen „Chlorphenole“ im Blut und Urin von 10 Probanden
- c) Feststellung der Wirkung der PowerTube-QuickZap Technik auf die Fettsäuremetabolisierung unter Einsatz der chiralen Analytik von 9-HODE und 13-HODE in der LDL-Fraktion im Blut von 10 Probanden

## 2 Einleitung

### 2.1 Themenbereich a): Stressprozesse induziert in Zellen (Proteomik)

Die Stressprozesse von Human- und Hefezellen durch verschiedene Einflussfaktoren ist ein wichtiger Bereich der Proteomik [1–5]. Sie ist hoch reguliert und beinhaltet selektive transcriptionale und trans-lationale Mechanismen, die zur Bildung von spezifischen Responseproteinen verantwortlich sind [6-8\_]. Die adaptiven Mechanismen führen zur Stressinduktion von gut charakterisierten „Shock“ Proteinen. Es wird angenommen, dass HSF durch konformationale Änderungen aktiviert wird [9]. Diese kann auch durch indirekte Interaktionen mit fehlgefalteten

Proteinen eingeleitet werden. In unseren Untersuchungen mit HL-60 und *S. cerevisiae* sollte untersucht werden, ob und in wieweit Stressproteine durch Anwendung von Power Tube entstehen.

## **2.2 Themenbereich b): Metabolisierung**

Hierbei geht es um die Bildung von spezifischen Metaboliten sowie um die Feststellung, ob die Abbau- und Ausscheidungsmechanismen durch äußere Faktoren beeinflusst werden. Als Modellsubstanzen dienen dabei Verbindungen, die in der Bevölkerung ubiquitär vorkommen und deren analytische Bestimmung hoch sensitiv vorgenommen werden können.

Wir haben uns im Rahmen dieser Studie für die „Chlorphenole“ entschieden, weil bekannt ist, dass praktisch jede Person in Deutschland mit Chlorphenolen, insbesondere mit Pentachlorphenol, mehr oder weniger belastet ist [10]. Diese Verbindungen stammen aus damals erhältlichen Holzschutzmitteln [11]. Die Kontamination geschieht entweder durch Einatmen der Raumluft, oder durch direkten Hautkontakt [12]. Obwohl diese Verbindungen seit geraumer Zeit nicht mehr verwendet werden, ist die Bevölkerung mit diesen Substanzen kontaminiert, die somit ein potentiell Gesundheitsrisiko darstellen [13]. Außerdem können die Chlorphenole mit hochempfindlichen gaschromatischen Detektoren wie Elektroneneinfangdetektor (ECD) im Spurenbereich hinreichend nachgewiesen werden [14]. Chlorphenole werden im menschlichen Körper zum Teil metabolisiert. Dabei entstehen Chlorphenolgluconoride, die durch die Niere ausgeschieden werden. Das Verhältnis von freien Chlorphenolkonzentrationen zu Chlorphenolgluconoriden ist ein wichtiger Hinweis dafür, ob die Person diese Substanzen metabolisieren kann oder nicht [15].

Im Rahmen unserer Arbeiten haben wir versucht zu beschreiben, wie sich die Metabolisierungsraten in einzelnen Probanden nach Anwendung der Power Tube Technik ändern und ob dabei positive oder negative Effekte bezüglich deren Ausscheidung hervorgerufen werden können.

### 2.3 Themenbereich c): Lipidhydroperoxidbildung (Krankheitsbilder)

Die Bildung von Lipidhydroperoxiden (LOOH) von ungesättigten Fettsäuren im menschlichen Körper ist in der Literatur mehrfach mit chronischen Krankheiten wie Arteriosklerose [16], rheumatische Arthritis [17], Diabetes [18], Multiple Sklerose [19] und anderen Nervenkrankheiten in Zusammenhang gebracht worden. Das gebildete LOOH ist nicht stabil und wird zum Beispiel in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{LO}^\bullet$ -Radikalen umgewandelt [20]. So entstehen z.B. aus Linolensäurehydroperoxide die Substanzen 9-hydroxy-10,12-octadecadienoyle Säure (9-HODE) und 13-Hydroxy-10,12-octadecadienoyle Säure (13-HODE), die in Arteriosklerose-Belägen [21] und Humanserum [22] nachgewiesen werden können.

Diese Verbindungen können in der LDL-Fraktion bis auf das 50-fache angereichert werden. Offenbar werden dabei Fettsäureanteile in LDLs oxidiert. Dies bedeutet, dass die Konzentration von 9-HODE und 13-HODE eindeutige Hinweise darauf geben, ob ein oxidativer Stress im Körper vorstatten geht oder nicht. Nicht nur der Gehalt an 9-HODE und 13-HODE im Blutserum der Probanden ist signifikant, sondern auch deren Chiralität. Diese Abbauprodukte der Fettsäuren sind im Gegensatz zu den Fettsäuren chiral und kommen somit in zwei Enantiomeren vor [23]. In unseren Voruntersuchungen konnten wir feststellen, dass die Konzentrationen der einzelnen Enantiomere wichtige Hinweise darauf geben, ob beispielsweise eine Stoffwechselkrankheit oder eine chronische Krankheit vorliegt [24].

Wir wollten im Rahmen dieser Arbeit wissen, erstens welche Gehalte an 9-HODE bzw. 13-HODE vor und nach der Behandlung mit Power Tube vorkommen und zweitens, ob sich die Enantiomerenverhältnisse, ( $\pm$ ) der gleichen Säuren, nach Anwendung der PowerTube-Technik ändern.

### 3 Material und Methoden

Alle Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel hatten p.a.-Qualität und wurden von Merk, Deutschland bezogen.

#### 3.1 Zu Themenbereich a):

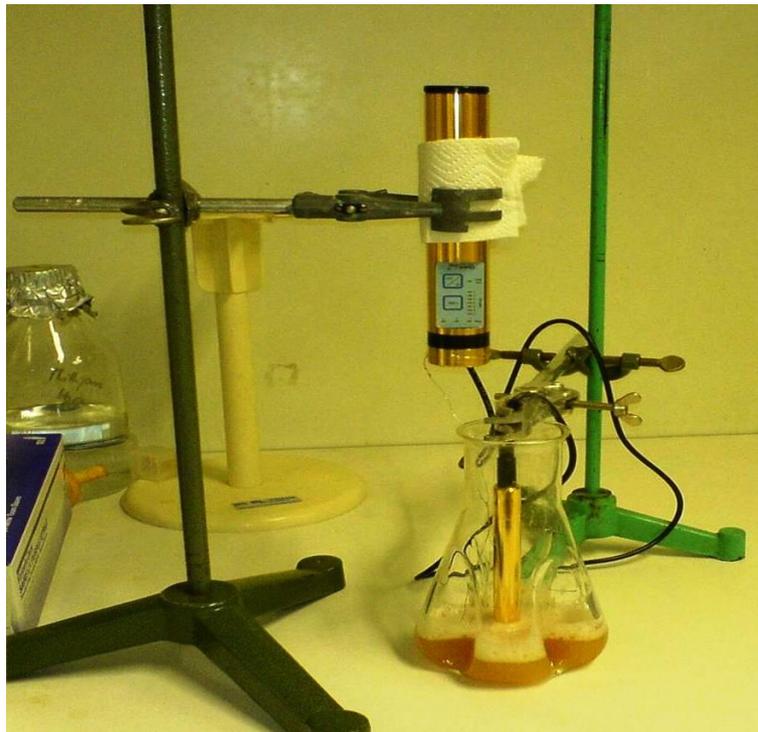
**A1) Human HL-60-Zellen:** Die zur Untersuchung eingesetzten Zellen sind Human HL-60. Die Human HL-60 Zellen waren in RPMI (GiBCO) mit 10 % Fetal-Kalb-Serum ( $1 \times 10^6$  pro ml) in T-25 Flaschen (15 ml pro Flasche) gefüllt. Alle Untersuchungen wurden bei 37,5 °C durchgeführt.

**B1) *Saccharomyces cerevisiae* (W303)-Zellen:** Die eingesetzten Hauptkulturen werden mit Hefezellen aus der logarithmisch wachsenden Vorkultur (optische Dichte zwischen 0,5 und 2) angeimpft. Die Impfmenge wird bei beiden Hefen so bemessen, dass sich in der Hauptkultur immer eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen einstellt. Das entspricht einer optischen Dichte von 0,1. Die Hauptkultur wird ebenfalls wie die Vorkultur bei 30 °C und 172 rpm im Schüttelschrank bebrütet. In Abständen von 30 Minuten wird die optische Dichte ermittelt. Ab einer optischen Dichte von 1,0 muss die zur Messung der Trübung verwendete Hefesuspension verdünnt werden, da bei optischen Dichten über 1,0 verfälschte Ergebnisse durch Beschattungseffekte der Zellen auftreten.

Sobald die Hauptkulturen eine optische Dichte von 1,0 erreichten, wurden 12 ml der Kultur durch Zentrifugieren (5000 rpm, 5 min) geerntet. Das Zellpellet wurde mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß bei 5000 rpm für 5 min nochmals pelletiert. Das erhaltende Zellgewicht entspricht einem Trockengewicht von etwa 5 mg und einer Zellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml. Die Hauptkulturen wurden in Zentrifugengefäßen mit 10 ml für 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert und das Nährmedium abdekantiert.

Für die Wachstumskurven wurden die Hefezellen im YNB-Nährmedium kultiviert. Die Hauptkultur wurde jedoch nicht bei einer OD von 1,0 geerntet, sondern bis zur stationären Phase kultiviert. Für die Ermittlung der Wachstumsphasen wurde die Trübung der Nährlösung (optische Dichte) herangezogen und als Transmission bei einer Wellenlänge von 610 nm gemessen. Als Reagenzienleerwert für das Photometer diente sterilisiertes YNB-Nährmedium. Während der ersten und zweiten Generationsphase wurde die optische Dichte alle 2 Stunden, während der dritten Generationsphase stündlich und ab der dritten Generationsphase alle 30 Minuten gemessen.

Die Power Tube Experimente wurden immer bei der Stufe 3 durchgeführt. Die Dauer der Belastung war 21 min. Die praktische Anordnung ist in Abb. 1 dargestellt. Als Gegenpool diente eine Pt-Elektrode, die mit einer Metallschelle mit dem Gerät gekoppelt war. Unter diesen Bedingungen konnten weitere Metallkontaminationen ausgeschlossen werden.



**Abbildung 1.** Geräteanordnung für die Proteomik-Untersuchungen mit Power Tube.

### 3.1.1 Quantitatives Proteinprofiling und Proteinextraktion

Es wurden die Proteome zweier Proben mit einander verglichen, wobei die erste Probe der Kontrolle diente und die Zellpopulation in Abwesenheit der Power Tube repräsentierte. Die zweite Probe enthielt demnach die exponentiell angestiegene Zellpopulation nach Adaption der Power Tube. Beide Populationen wurden in der Midlogphase bei  $OD_{600\text{ nm}}$  geerntet. Dies erfolgte durch Zentrifugation (9000 g, 3 min) und durch Auswaschen mit vorgeheizter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS). Die Pellets wurden danach in 200  $\mu\text{l}$  Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,5, 1 % SDS w/v) suspendiert. Während die Proben in Eis gekühlt wurden, erfolgte die Zelldisruption mit einem Ultrasonic-Homogenisator (zweifach, 30 Pulse, 1 Hz Intervall und 0,3 s Pulsdauer, 20 kHz homogener Sound, 60 Watt Leistung). Die Zelldebris wurden pelletiert bei Zentrifugation mit 14,000g und 4 °C über 30 min. Danach wurden die Proteinextrakte aliquotiert und bei minus 78 °C eingefroren.

Bevor der isoelektrischen Fokussierung (IEF) wurden die Extrakte mit einem Thiourea Lysis Puffer zu einer finalen Konzentration von weniger als 0,25 % an SDS verdünnt. Der Puffer setzte sich aus 2 M Thiourea, 7 M Urea, 1 % CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan- sulfonat) w/v, 0,4 % DTT w/v und 0,5 % Pharmalyte (3–10 v/v). Alle Flüssigkeiten, die in Zellkontakt bevor der Proteinextraktion kamen wurden sterilisiert, um mögliche Kontaminationen vorzubeugen sowie erhitzt auf 30 °C, um andere Stressfaktoren wie Kälteschock zu vermeiden.

### 3.1.2 Electrophoretische Trennung

Die erste und zweite Dimension der Electrophorese wurde verwendet, um die Proteine voneinander zu trennen. Zur Detektion der Proteine kam 2-DE mit immobilisiertem pH-Gradienten (IPG) nach Görg et al. (2000) zur Anwendung [25]. Der Rehydratationspuffer der IPG-Streifen setzte sich aus 6 M Urea, 2 M Thiourea, 1 % CHAPS w/v, 0,4 % DTT w/v und 0,5 % Pharmalyte (3–10 v/v) zusammen. Die Probe wurde mittels Cup-loading zugeführt (2 cm von der Anode). Für die erste

Dimension (IPG-IEF) kamen die IPG Gele mit einem pH-Gradienten zwischen 3,4 und 5,4 sowie zwischen 4,9 und 6,9 zur Anwendung. Die IEF wurde mit den fokussierenden Systemen IPGphor™ oder Multiphor II™ von Amersham Biosciences durchgeführt. Die zweite Dimension (SDS-PAGE) erfolgte mit 1 mm dicken Vertikalgelen (13 % T) und Precision Protein Standard™ Markers von Bio-Rad, Hercules (USA) wurden verwendet, um die Molekulargewichte zu bestimmen. Die aufgetrennten Proteine wurden mit Silber nach Blum et al. (1987) [26] sowie mit einer Coomassie Brilliant Blue R350 Lösung (Amersham Bioscience) markiert. Die Gele wurden zur Dokumentation eingescannt. Zur computergestützten Gelanalyse diente die Protein Weaver Software. Die gestressten Gele wurden mit den nicht gestressten verglichen.

### **3.1.3 Bestimmung des Massenfingerprints mittels MALDI-TOF-MS**

Die Proteinspots wurden aus Coomassiegelen extrahiert und entfärbt (über 30 min in einer Lösung mit 100 µl Acetonitril (50 %) und 5 mM Ammoniumbicarbonat). Die Lösung wurde für 20 min mit Acetonitril getrocknet und für 45 min bei 55 °C inkubiert (mit 50 µl DTT (10 mM)). Danach wurden die Spots 30 min lang mit 50 µl Iodacetamid bei Raumtemperatur inkubiert, zweimal mit 100 µl HCl (5 mM) Ammoniumbicarbonat für 20 min ausgewaschen, dehydriert mit Acetonitril und schließlich bei 40 °C für 30 min mit einem Speedvac getrocknet. Für die tryptische Verdauung wurden 20 µg Trypsin in 100 µl HCl (1 mM) gelöst und mit 150 µl Ammoniumbicarbonat (5 mM) kurz vor Gebrauch addiert (Konzentration: 12,5 ng/µl). 10 µl dieser Lösung wurden auf den jeweils getrockneten Proteinspots pipettiert und danach für 30 min bei 0 °C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen, um die Autodigestion von Trypsin zu minimieren. Danach wurde 20 µl Ammoniumbicarbonat (5 mM) zu den Proben addiert und für weitere 8 h bei 37 °C inkubiert. 0,25 µl von alpha-Cyano-4-hydroxymethylsäure in 1 mg/ml Acetonitril wurde auf die Probenstreifen pipettiert und dann luftgetrocknet. Danach wurde 0,5 µl der verdauten Probe zu dem Streifen addiert und mit 0,5 µl einer Matrixlösung gemixt; die Matrixlösung bestand aus 15 mg/mg alpha-Cyano-4-

hydroxyzimtsäure in 50 % Acetonitril plus 0,5 % Trifluoressigsäure (TFA). Die entstandene Lösung wurde für 10 min in Luft getrocknet.

Für die Massenspektrometrie wurde ein ETTAN z<sup>2</sup> MALDI-TOF der Firma Amersham Bioscience verwendet, das mit einem UV Stickstofflaser (337 nm) und einem Reflektron ausgestattet war (positiv-Ion bei 20 kV mit verzögerter Extraktion und geringer Massenabstoßung). Das System wurde mit Peptidproben (AngiotensinII, ACTH 1-39) kalibriert und mit einem internen Standard (Trypsin-Autodigestion-Fragment) versehen. Für jedes Spektrum wurden 200 einzelne Shots akkumuliert. Die Corque 150104 Datenbank vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) wurde zur Proteinidentifikation herangezogen.

### **3.2 Zu Themenbereich b):**

Probenahme: Die Blutprobe wurde bei allen 10 Probanden im nüchternen Zustand entnommen und sofort mit Citrat-Puffer stabilisiert, um eine Gerinnung zu vermeiden. Es wurden 2 × 10 ml Blut durch Venenpunktion entnommen, mit je 2 ml 3,8 %er Natrium-Citratpufferlösung versetzt und bei minus 20 °C gelagert. Bei den Urinproben wurde zunächst auch Morgenurin zur Untersuchung herangezogen. Es zeigte sich jedoch, dass mit Morgenurin allein keine befriedigenden Aussagen über die Metabolisierung gemacht werden können, weil die in der Harnblase befindlichen Glucoronide zu den Chlorphenolen hydrolysieren. Aus diesem Grund wurde zusätzlich zu den Morgenurinproben, nach vollständiger Blasenentleerung, eine Stunde später eine weitere Probe entnommen und untersucht. Diese Probe ist repräsentativer als die Morgenurinprobe. Die Urinprobe wurde ohne zusätzliche Stabilisierung auch bei minus 20 °C gelagert. Alle Proben wurden in Superclean-Glasbehältern eingefroren, da es bei Plastik- oder Metallbehältern zu Verlusten an Chlorphenolen kommen kann. Nach dem Einsatz der Power Tube Stufe 3 für 21 Minuten wurden die Blut- und Urinproben der Probanden erneut auf Chlorphenole und Chlorphenolglucoronide hin untersucht.

Die HRGC-Parameter sind im Folgenden aufgelistet: Detektor: 63Ni-ECD; Injektor: Split/Splitless; Trennsäule: DB 1701; Trägergas: N<sub>2</sub> (3 ml/min); Splitgas: N<sub>2</sub> (27 ml/min); Make-up-Gas: N<sub>2</sub> (30 ml/min); Splitverhältnis: 1:10; Injektortemperatur: 230 °C; Detektortemperatur: 280 °C; Temperaturprogramm: 80 – 175 °C (4 °C/min), 175 – 220 °C (15 min); Injektionsvolumen: 1 µl. Im Folgenden sind die Retentionszeiten (R<sub>t</sub>) der Chlorphenolacetate aufgelistet (Tab. 1).

**Tabelle 1.** Retentionszeiten (R<sub>t</sub>) der untersuchten Chlorphenolacetate.

Substanz	R <sub>t</sub> (min)	Substanz	R <sub>t</sub> (min)
3,4-Dichlorphenolacetat	10,24	2,4,5-Trichlorphenolacetat	14,99
2,4/2,5-Dichlorphenolacetat	10,79	2,3,4-Trichlorphenolacetat	16,62
2,3-Dichlorphenolacetat	11,97	2,3,5,6-Tetrachlorphenolacetat	17,98
2,4,6-Trichlorphenolacetat	12,88	2,3,4,6-Tetrachlorphenolacetat	18,13
2,3,6-Trichlorphenolacetat	14,61	2,4,6-Trichlorphenolacetat	21,07
2,3,5-Trichlorphenolacetat	14,78	Pentachlorphenolacetat	22,07

Die Stabilität, Responsefaktoren und Eichgeraden wurden für alle Chlorphenolacetate geprüft. Die Parameter erfüllten alle Voraussetzungen zur erfolgreichen Quantifizierung der Chlorphenolacetate.

### 3.3 Zu Themenbereich c):

Auch hier dienten die gleichen 10 Probanden zur Blutabnahme (nicht Zustand) wie unter Themenbereich b beschrieben. Das zur Derivatisierung notwendige N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA) wurde von Macherey-Nagel bezogen. Alle anderen Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel besaßen p.a.-Qualität und kamen von Merck, Deutschland. Für die HRGC-Untersuchen wurde ein Gaschromatograph von Hewlett Packard (Serie II, 5890) mit FID-Detektor eingesetzt. Dazu wurde eine DB-1 Säule mit 1 µm Schichtdicke verwendet. Die Prozessparameter waren wie folgt: Detektortemperatur: 290 °C; Injektortemperatur:

280 °C; Injektionsvolumen: 0,2–0,7 µl von ca. 1 %er Lösung; Temperaturprogramm: 80 °C (3 min) bis 280 °C (3 °C/min), 15 min bei 280 °C; Trägergas: Helium; 1 : 30 Splitverhältnis.

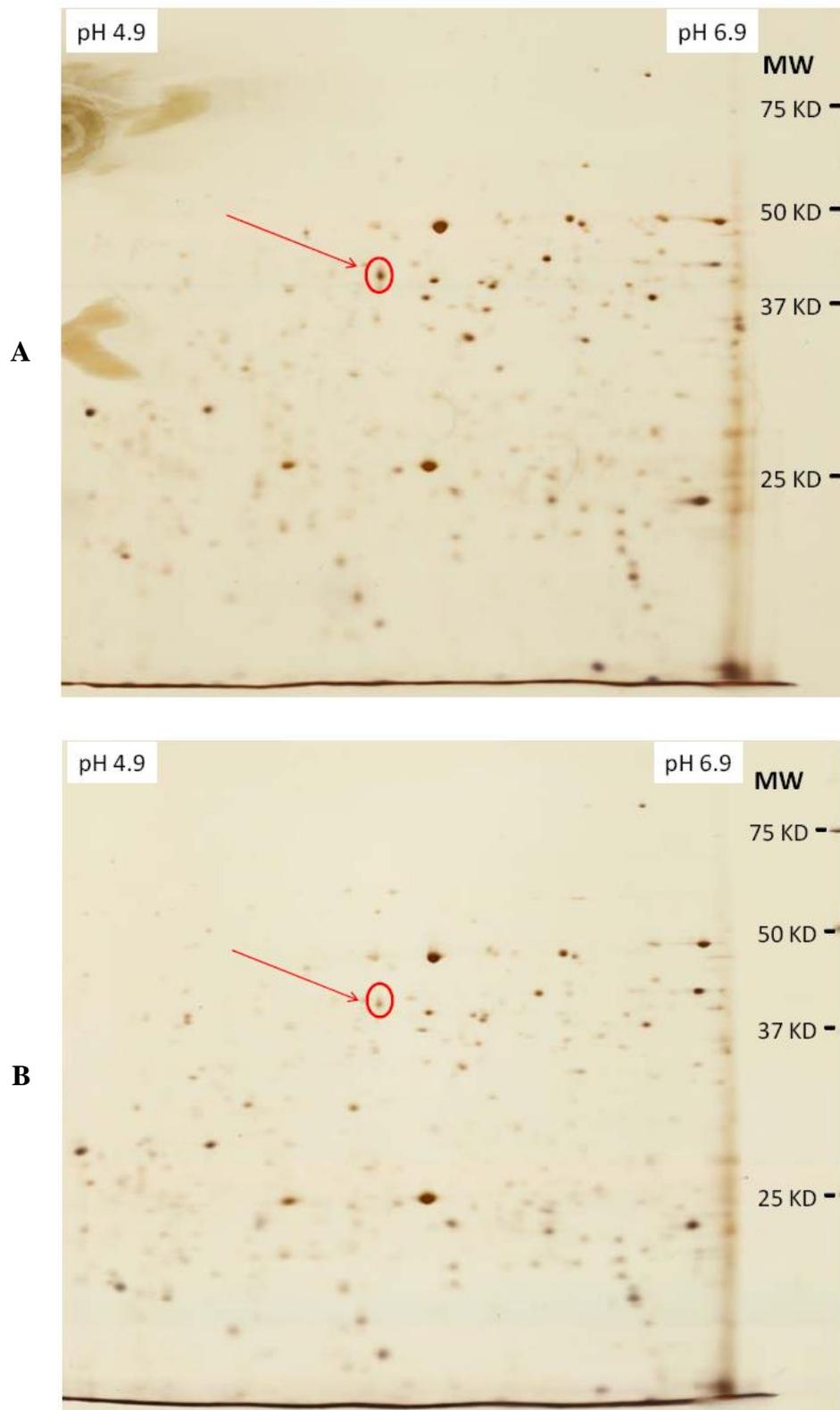
Die HRGC-MS Untersuchungen wurden mit Finnigan 8002 Massenspektrometer vorgenommen. Die HRGC-Bedingungen waren zu denen der HRGC-Untersuchungen identisch. Für die chirale Trennung wurde eine BGB176SE-Säule verwendet. Die Bedingungen für die chirale HRGC waren wie folgt: Chrompack CP-9002, FID, Säule: BGB176SE, BGB-Analytik AG; Adliswil, Schweiz. 20 % 2,3-dimethyl-6-tert-buthylmethyilsilylat-β-CD auf SE-5,2. Länge: 30 m, Durchmesser: 0,25 mm; 0,25 µm Filmdicke; Split/Splitless, 230 °C; 1 : 20 Split; Injektionsvolumen: 1–2 µl; temperaturprogrammiert und isotherm.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

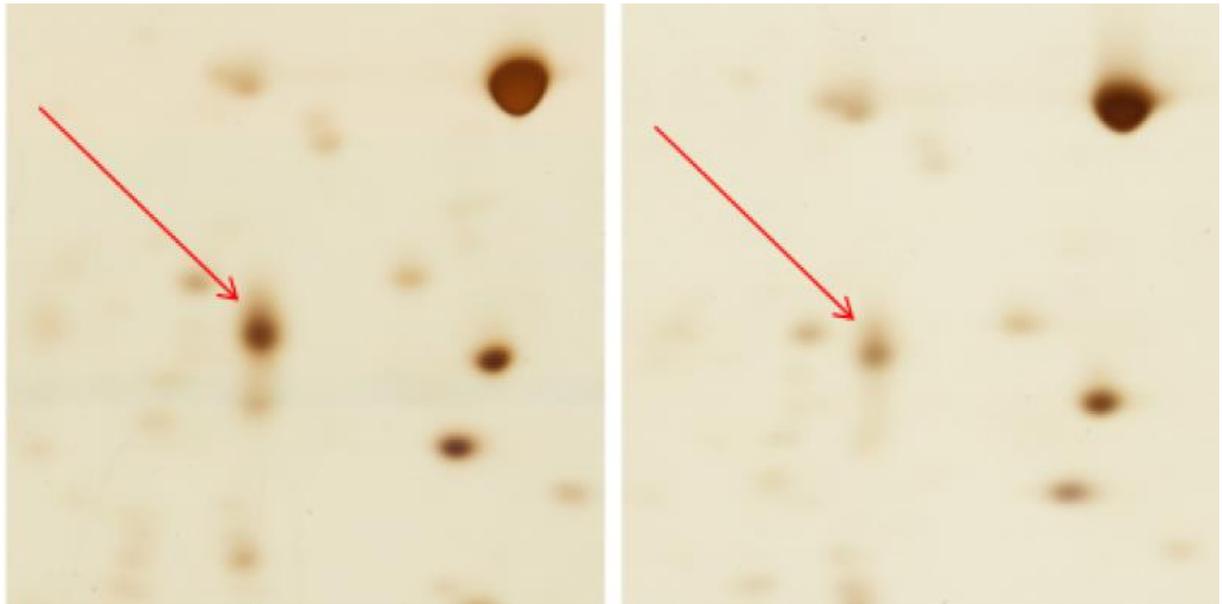
### 4.1 Zu Themenbereich a)

Die Power Tube Untersuchungen mit beiden Zellen wurden auf der höchsten Stufe mit unterschiedlicher Belastungsdauer durchgeführt. Nach der Aufarbeitung wurden die Blind- und Versuchswerte miteinander verglichen.

**Fazit:** Die Untersuchungen zeigen deutlich, dass sich durch die vorschriftsmäßige Anwendung der Power Tube die Proteommuster der Zellen nicht ändern. Somit kommt es nach der Anwendung zu keinerlei Schäden der Humanzellen. Bei Hefezellen wurde erst nach der Anwendung von 3 h und 21 min ein hochreguliertes Protein gefunden. Das Protein befindet im pH Bereich zwischen 4,9 bis 6,9 und hat ein Molekulargewicht von 43 kD sowie einen isoelektrischen Punkt (IP) von 5,8. Wir vermuten, dass das Protein der Stressreduktion in der Zelle dient (Abb. 2 und 3).



**Abbildung 2.** Silbernitratgel mit einem pH Gradienten zwischen 4,9–6,9. **A:** Probe (gestresst) nach Behandlung mit der Power Tube; **B:** Kontrollprobe (nicht gestresst).



**A**

**B**

**Abbildung 3.** Hochreguliertes Proteinspot in Vergrößerung dargestellt; **A:** gestresste Probe, **B:** Kontrollprobe.

## 4.2 Zu Themenbereich b)

### 4.2.1 Bestimmung von Chlorphenolen in Blut und Urin

Nach einer Flüssig-Fest-Extraktion und Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die Chlorphenole in allen Proben untersucht. Von den 10 Probanden wurden je 3 Urin- und 3 Blutproben entnommen und mittels HRGC-ECD sowie nach Notwendigkeit mit HRGC-MS untersucht. Die individuellen Merkmale der einzelnen Probanden sind Tab. 2 beschrieben.

**Tabelle 2.** Die individuellen Merkmale der einzelnen Probanden.

Proband	Merkmale	Proband	Merkmale
1	62 Jahre, Raucher, männlich	6	33 Jahre, Nichtraucher, männlich
2	66 Jahre, Raucher, weiblich	7	38 Jahre, Nichtraucher, weiblich
3	33 Jahre, Nichtraucher, weiblich	8	16 Jahre, Nichtraucher, weiblich
4	40 Jahre, Raucher, weiblich	9	18 Jahre, Nichtraucher, weiblich
5	34 Jahre, Nichtraucher, weiblich	10	30 Jahre, Raucher, männlich

Alle Probanden waren gesund und frei von Beschwerden.

Nachfolgend sind alle Ergebnisse bezüglich der Chlorphenolanalysen in Blut- und Urinproben je nach Proband zusammengefasst, wobei zwischen vor und nach der Anwendung mit Power Tube QuickZap Technologie unterschieden wird (Tab. 3). Anschließend sind ebenfalls sind zur besseren Veranschaulichung die Chlorphenolkonzentrationen nochmals vergleichend in Graphiken dargestellt (Abb. 4).

**Tabelle 3.** Zusammenfassende Ergebnisse der Chlorphenolkonzentration je nach Proband.

Proband-Nr.: 1

	Blut-Nüchtern		Morgenurin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	1,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1
2,4,5-Trichlorphenol	6,3 ± 0,2	2,7 ± 0,3	2,9 ± 0,2	4,5 ± 0,2
2,3,4-Trichlorphenol	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,1 ± 0,1
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,0 ± 0,0	1,3 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	12,0 ± 0,3	3,7 ± 0,2	4,3 ± 0,4	38,0 ± 1,2

	Blut-Nüchtern; gleicher Zeitpunkt wie Urinabgabe		Erstmögliche Urinprobe nach dem Morgenurin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	1,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1
2,4,5-Trichlorphenol	6,0 ± 0,3	2,7 ± 0,3	1,5 ± 0,2	5,5 ± 0,2
2,3,4-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,1
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	11,7 ± 0,4	3,5 ± 0,2	2,4 ± 0,4	39,4 ± 1,2

	Blut nach der Therapie; nach ca. 1,5 h		Urin nach der Therapie nach ca. 1,5 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	3,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1
2,4,5-Trichlorphenol	8,8 ± 0,3	3,3 ± 0,3	2,3 ± 0,2	8,5 ± 0,4
2,3,4-Trichlorphenol	2,2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	3,1 ± 0,3
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	1,5 ± 0,1	2,4 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Pentachlorphenol	15,8 ± 0,5	5,0 ± 0,2	6,3 ± 0,2	44,5 ± 1,6

	Blut nach der Therapie; nach ca. 24 h		Urin nach der Therapie nach ca. 24 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	1,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,1
2,4,5-Trichlorphenol	2,5 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,2
2,3,4-Trichlorphenol	1,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,3 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	8,2 ± 0,3	2,1 ± 0,2	1,7 ± 0,2	12,5 ± 0,5

- Konzentrationsangaben in:  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Proband-Nr.: 2

	Blut-Nüchtern		Morgenerin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
2,4,5-Trichlorphenol	0,9 ± 0,1	0,4 ± 0,2	5,0 ± 0,2	9,0 ± 0,3
2,3,4-Trichlorphenol	2,9 ± 0,3	1,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,1
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,3 ± 0,1	1,3 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	19,2 ± 0,5	3,0 ± 0,3	8,2 ± 0,6	27,0 ± 1,1

	Blut-Nüchtern; gleicher Zeitpunkt wie Urinabgabe		Erstmögliche Urinprobe nach dem Morgenerin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
2,4,5-Trichlorphenol	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,1	2,3 ± 0,2	4,5 ± 0,3
2,3,4-Trichlorphenol	2,7 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,2
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	18,0 ± 0,4	2,2 ± 0,2	4,3 ± 0,3	25,0 ± 1,2

	Blut nach der Therapie; nach ca. 1,5 h		Urin nach der Therapie nach ca. 1,5 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	2,1 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,2
2,4,5-Trichlorphenol	3,2 ± 0,4	1,7 ± 0,2	5,1 ± 0,4	12,0 ± 0,4
2,3,4-Trichlorphenol	4,0 ± 0,4	2,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0,6 ± 0,2
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	1,7 ± 0,2	2,9 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Pentachlorphenol	25,3 ± 1,5	6,3 ± 0,4	9,4 ± 0,7	44,5 ± 1,7

	Blut nach der Therapie; nach ca. 24 h		Urin nach der Therapie nach ca. 24 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,4,5-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	3,2 ± 0,4
2,3,4-Trichlorphenol	1,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	7,1 ± 0,3	1,7 ± 0,2	1,2 ± 0,2	10,0 ± 0,6

- Konzentrationsangaben in:  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Proband-Nr.: 3

	Blut-Nüchtern		Morgenerin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1
2,4,5-Trichlorphenol	5,1 ± 0,2	3,0 ± 0,4	4,7 ± 0,4	8,7 ± 0,3
2,3,4-Trichlorphenol	6,2 ± 0,2	3,8 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,2
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	2,0 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,2
Pentachlorphenol	15,8 ± 1,6	2,7 ± 0,2	7,4 ± 0,6	22,5 ± 1,8

	Blut-Nüchtern; gleicher Zeitpunkt wie Urinabgabe		Erstmögliche Urinprobe nach dem Morgenerin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,4,5-Trichlorphenol	4,7 ± 0,3	2,9 ± 0,4	3,1 ± 0,3	6,7 ± 0,4
2,3,4-Trichlorphenol	3,5 ± 0,3	3,2 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	11,8 ± 1,2	2,1 ± 0,4	4,2 ± 0,4	20,4 ± 1,9

	Blut nach der Therapie; nach ca. 1,5 h		Urin nach der Therapie nach ca. 1,5 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,2
2,4,5-Trichlorphenol	6,3 ± 0,4	5,7 ± 0,3	3,1 ± 0,2	10,3 ± 0,3
2,3,4-Trichlorphenol	7,4 ± 0,4	6,0 ± 0,3	3,5 ± 0,2	14,5 ± 1,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	3,2 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,2	6,5 ± 0,5
Pentachlorphenol	17,5 ± 1,8	4,0 ± 0,2	7,8 ± 0,4	38,2 ± 2,0

	Blut nach der Therapie; nach ca. 24 h		Urin nach der Therapie nach ca. 24 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,4,5-Trichlorphenol	2,1 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,2	3,7 ± 0,3
2,3,4-Trichlorphenol	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Pentachlorphenol	9,2 ± 0,8	1,0 ± 0,1	2,8 ± 0,4	8,7 ± 0,8
------------------	-----------	-----------	-----------	-----------

- Konzentrationsangaben in:  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Proband-Nr.: 4

	Blut-Nüchtern		Morgenurin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,5 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
2,4,5-Trichlorphenol	6,5 ± 0,4	3,0 ± 0,4	7,2 ± 0,4	10,0 ± 0,6
2,3,4-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,7 ± 0,2	1,4 ± 0,3	0,0 ± 0,0	2,8 ± 0,2
Pentachlorphenol	6,5 ± 0,4	2,0 ± 0,2	5,2 ± 0,2	12,6 ± 0,8

	Blut-Nüchtern; gleicher Zeitpunkt wie Urinabgabe		Erstmögliche Urinprobe nach dem Morgenurin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,4,5-Trichlorphenol	5,3 ± 0,3	2,0 ± 0,4	6,4 ± 0,5	6,9 ± 0,3
2,3,4-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,5 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0	1,5 ± 0,3
Pentachlorphenol	6,2 ± 0,4	2,0 ± 0,2	5,2 ± 0,4	15,6 ± 0,8

	Blut nach der Therapie; nach ca. 1,5 h		Urin nach der Therapie nach ca. 1,5 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	1,5 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,2	1,2 ± 0,3
2,4,5-Trichlorphenol	10,2 ± 0,4	4,5 ± 0,3	8,2 ± 0,6	15,2 ± 1,2
2,3,4-Trichlorphenol	1,3 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	1,7 ± 0,2	2,3 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,9 ± 0,6
Pentachlorphenol	12,0 ± 0,4	6,9 ± 0,6	7,5 ± 0,8	28,0 ± 1,0

	Blut nach der Therapie; nach ca. 24 h		Urin nach der Therapie nach ca. 24 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,4,5-Trichlorphenol	1,7 ± 0,2	1,0 ± 0,1	2,1 ± 1,3	4,9 ± 0,5
2,3,4-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	3,4 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,2	5,2 ± 0,4

- Konzentrationsangaben in: **µg/kg**

**Proband-Nr.: 5**

	Blut-Nüchtern		Morgenurin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	1,5 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	1,3 ± 0,2
2,4,5-Trichlorphenol	0,6 ± 0,2	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,2	2,1 ± 0,3
2,3,4-Trichlorphenol	0,7 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,8 ± 0,2
Pentachlorphenol	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,2	4,9 ± 0,3

	Blut-Nüchtern; gleicher Zeitpunkt wie Urinabgabe		Erstmögliche Urinprobe nach dem Morgenurin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	1,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,2
2,4,5-Trichlorphenol	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,4 ± 0,1	1,4 ± 0,4
2,3,4-Trichlorphenol	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Pentachlorphenol	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2	3,2 ± 0,3

	Blut nach der Therapie; nach ca. 1,5 h		Urin nach der Therapie nach ca. 1,5 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	2,1 ± 0,4	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,2	3,0 ± 0,3
2,4,5-Trichlorphenol	1,2 ± 0,2	1,6 ± 0,4	0,5 ± 0,1	2,1 ± 0,4
2,3,4-Trichlorphenol	1,0 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,6 ± 0,3
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,7 ± 0,2
Pentachlorphenol	1,2 ± 0,2	1,6 ± 0,4	1,2 ± 0,2	12,5 ± 0,6

	Blut nach der Therapie; nach ca. 24 h		Urin nach der Therapie nach ca. 24 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,2
2,4,5-Trichlorphenol	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,2

2,3,4-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,9 ± 0,3

- Konzentrationsangaben in: **µg/kg**

Proband-Nr.: 6

	Blut-Nüchtern		Morgenerin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,0
2,4,5-Trichlorphenol	7,1 ± 0,4	4,3 ± 0,3	8,3 ± 0,3	12,0 ± 0,6
2,3,4-Trichlorphenol	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2	0,0 ± 0,0	4,0 ± 0,4
Pentachlorphenol	10,5 ± 0,8	4,6 ± 0,4	7,6 ± 0,6	20,2 ± 0,8

	Blut-Nüchtern; gleicher Zeitpunkt wie Urinabgabe		Erstmögliche Urinprobe nach dem Morgenerin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,4,5-Trichlorphenol	7,4 ± 0,4	3,2 ± 0,5	8,4 ± 0,6	10,2 ± 0,6
2,3,4-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,8 ± 0,2	1,9 ± 0,3	0,0 ± 0,0	2,1 ± 0,3
Pentachlorphenol	9,2 ± 0,5	5,4 ± 0,4	8,9 ± 0,3	20,1 ± 1,0

	Blut nach der Therapie; nach ca. 1,5 h		Urin nach der Therapie nach ca. 1,5 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	2,5 ± 0,4	0,7 ± 0,3	1,0 ± 0,2	3,0 ± 0,6
2,4,5-Trichlorphenol	15,4 ± 0,6	6,8 ± 0,4	11,2 ± 0,6	21,0 ± 1,2
2,3,4-Trichlorphenol	3,4 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,7 ± 0,3	1,5 ± 0,2
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	2,5 ± 0,4	3,4 ± 0,4	4,5 ± 0,6	5,9 ± 0,6
Pentachlorphenol	18,0 ± 1,0	10,2 ± 0,6	14,0 ± 1,0	33,5 ± 1,2

	Blut nach der Therapie; nach ca. 24 h		Urin nach der Therapie nach ca. 24 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

2,4,5-Trichlorphenol	2,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	3,4 ± 0,4	3,9 ± 0,6
2,3,4-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	4,2 ± 0,4	2,1 ± 0,3	3,5 ± 0,3	6,1 ± 0,3

- Konzentrationsangaben in: **µg/kg**

**Proband-Nr.: 7**

	Blut-Nüchtern		Morgenerin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,2
2,4,5-Trichlorphenol	6,1 ± 0,3	4,2 ± 0,6	5,8 ± 0,4	10,2 ± 0,6
2,3,4-Trichlorphenol	8,2 ± 0,4	4,9 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,2
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	1,9 ± 0,3	2,1 ± 0,3	1,9 ± 0,3	1,2 ± 0,2
Pentachlorphenol	21,1 ± 0,7	1,7 ± 0,3	8,9 ± 0,6	31,0 ± 1,6

	Blut-Nüchtern; gleicher Zeitpunkt wie Urinabgabe		Erstmögliche Urinprobe nach dem Morgenerin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,4,5-Trichlorphenol	5,9 ± 0,5	2,9 ± 0,3	3,8 ± 0,4	7,1 ± 0,3
2,3,4-Trichlorphenol	7,8 ± 0,6	3,7 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	16,8 ± 0,8	1,4 ± 0,6	10,6 ± 0,6	28,4 ± 2,0

	Blut nach der Therapie; nach ca. 1,5 h		Urin nach der Therapie nach ca. 1,5 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	1,8 ± 0,2
2,4,5-Trichlorphenol	7,8 ± 0,4	6,0 ± 0,4	6,8 ± 0,4	11,0 ± 0,5
2,3,4-Trichlorphenol	10,2 ± 0,8	5,8 ± 0,4	1,6 ± 0,2	2,7 ± 0,3
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	3,5 ± 0,3	3,9 ± 0,6	2,8 ± 0,3	3,1 ± 0,5
Pentachlorphenol	25,0 ± 1,2	5,8 ± 0,8	14,6 ± 0,8	37,0 ± 2,2

	Blut nach der Therapie; nach ca. 24 h		Urin nach der Therapie nach ca. 24 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid

2,4,6-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,4,5-Trichlorphenol	2,0 ± 0,2	1,7 ± 0,6	2,5 ± 0,5	6,9 ± 0,3
2,3,4-Trichlorphenol	3,2 ± 0,4	2,8 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,1
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	9,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0	2,8 ± 0,2	6,0 ± 0,6

- Konzentrationsangaben in:  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Proband-Nr.: 8

	Blut-Nüchtern		Morgenerin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,4,5-Trichlorphenol	10,2 ± 0,4	3,0 ± 0,3	7,5 ± 0,5	12,6 ± 0,8
2,3,4-Trichlorphenol	8,1 ± 0,3	5,2 ± 0,6	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,2
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	2,0 ± 0,2	2,3 ± 0,3	2,0 ± 0,2	0,9 ± 0,3
Pentachlorphenol	24,0 ± 0,8	1,6 ± 0,3	9,3 ± 0,6	34,2 ± 1,8

	Blut-Nüchtern; gleicher Zeitpunkt wie Urinabgabe		Erstmögliche Urinprobe nach dem Morgenerin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,4,5-Trichlorphenol	6,0 ± 0,5	3,0 ± 0,4	4,2 ± 0,04	8,2 ± 0,4
2,3,4-Trichlorphenol	8,1 ± 0,7	3,5 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	19,6 ± 0,8	1,0 ± 0,2	10,2 ± 0,8	30,2 ± 1,6

	Blut nach der Therapie; nach ca. 1,5 h		Urin nach der Therapie nach ca. 1,5 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	1,6 ± 0,4	1,5 ± 0,3	0,2 ± 0,1	2,0 ± 0,2
2,4,5-Trichlorphenol	8,0 ± 0,6	6,2 ± 0,6	7,4 ± 0,6	13,5 ± 1,3
2,3,4-Trichlorphenol	16,0 ± 0,8	8,2 ± 0,4	3,0 ± 0,4	4,2 ± 0,6
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	8,4 ± 0,4	4,3 ± 0,7	2,9 ± 0,3	4,0 ± 0,5
Pentachlorphenol	30,0 ± 1,6	8,2 ± 0,4	11,2 ± 0,4	42,0 ± 2,0

	Blut nach der Therapie; nach ca. 24 h	Urin nach der Therapie nach ca. 24 h

	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,4,5-Trichlorphenol	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,4	2,8 ± 0,6	7,2 ± 0,4
2,3,4-Trichlorphenol	3,8 ± 0,4	3,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,2
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	12,0 ± 0,6	0,0 ± 0,0	3,4 ± 0,4	8,2 ± 0,8

- Konzentrationsangaben in:  $\mu\text{g}/\text{kg}$

Proband-Nr.: 9

	Blut-Nüchtern		Morgenerin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	1,4 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2	1,4 ± 0,2
2,4,5-Trichlorphenol	0,8 ± 0,2	1,6 ± 0,4	0,8 ± 0,2	2,4 ± 0,4
2,3,4-Trichlorphenol	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,2
Pentachlorphenol	1,6 ± 0,4	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	5,5 ± 0,5

	Blut-Nüchtern; gleicher Zeitpunkt wie Urinabgabe		Erstmögliche Urinprobe nach dem Morgenerin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	1,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,4
2,4,5-Trichlorphenol	0,5 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1	1,8 ± 0,6
2,3,4-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Pentachlorphenol	0,8 ± 0,4	1,4 ± 0,4	1,0 ± 0,2	3,4 ± 0,4

	Blut nach der Therapie; nach ca. 1,5 h		Urin nach der Therapie nach ca. 1,5 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	2,4 ± 0,4	0,6 ± 0,2	1,8 ± 0,4	4,6 ± 0,6
2,4,5-Trichlorphenol	2,0 ± 0,4	2,0 ± 0,2	0,8 ± 0,2	2,7 ± 0,5
2,3,4-Trichlorphenol	1,5 ± 0,3	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,3	2,0 ± 0,4
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	1,6 ± 0,4	1,0 ± 0,2	0,2 ± 0,1	1,6 ± 0,3
Pentachlorphenol	2,0 ± 0,4	2,0 ± 0,4	1,4 ± 0,4	14,5 ± 0,9

	Blut nach der Therapie; nach ca. 24 h		Urin nach der Therapie nach ca. 24 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,7 ± 0,3
2,4,5-Trichlorphenol	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,2	1,2 ± 0,4
2,3,4-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,2	2,0 ± 0,4

- Konzentrationsangaben in: **µg/kg**

**Proband-Nr.: 10**

	Blut-Nüchtern		Morgenerin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	1,2 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,3	1,2 ± 0,2
2,4,5-Trichlorphenol	7,0 ± 0,4	3,2 ± 0,4	3,2 ± 0,4	5,0 ± 0,6
2,3,4-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	16,2 ± 1,2	4,5 ± 0,5	6,0 ± 0,4	40,2 ± 1,6

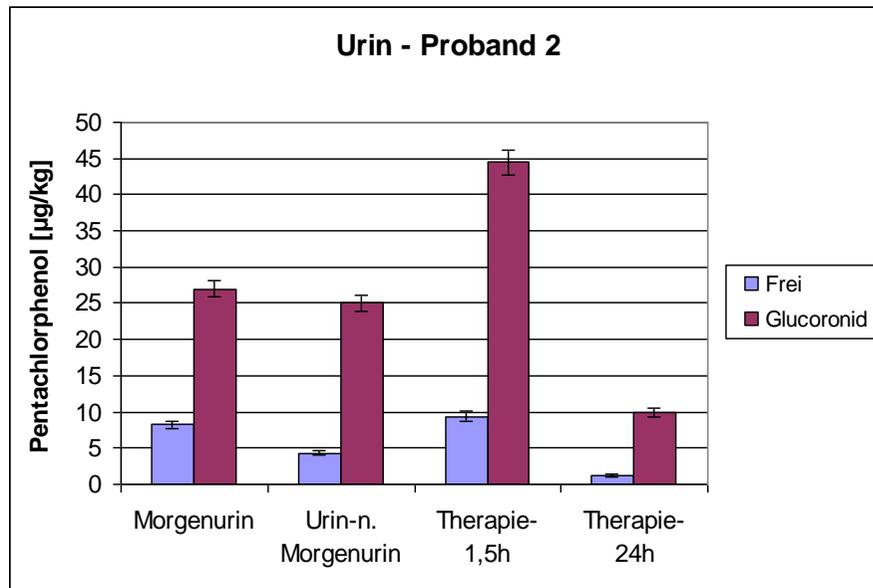
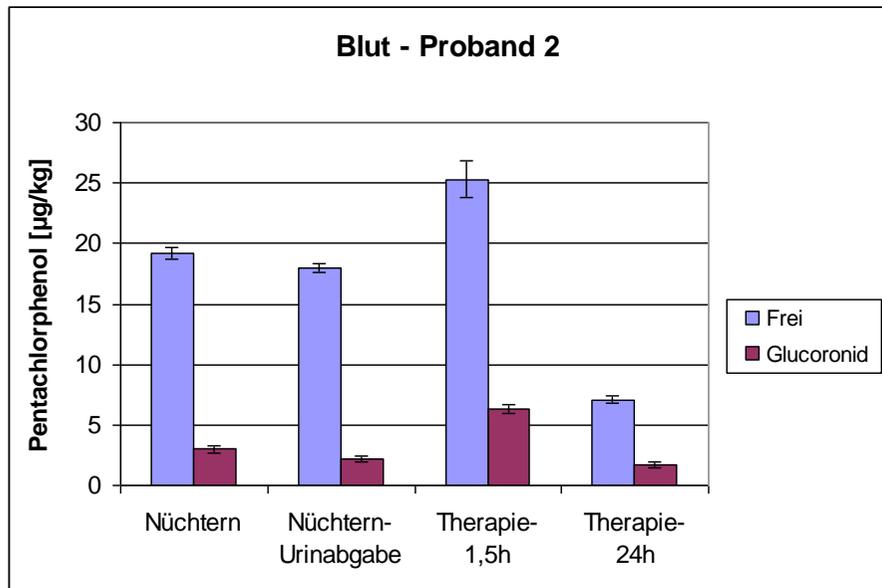
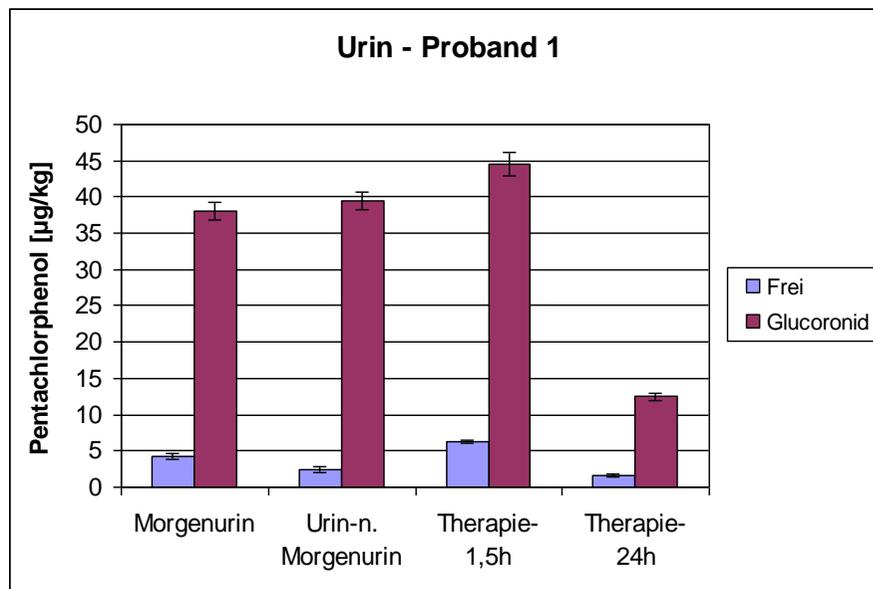
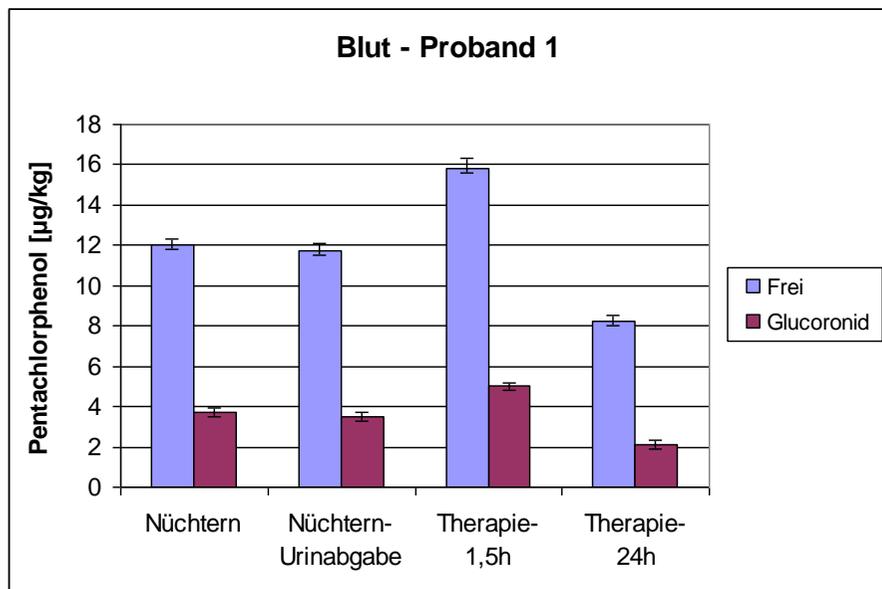
	Blut-Nüchtern; gleicher Zeitpunkt wie Urinabgabe		Erstmögliche Urinprobe nach dem Morgenerin	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	1,1 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1	1,4 ± 0,2
2,4,5-Trichlorphenol	6,5 ± 0,5	2,8 ± 0,4	1,5 ± 0,3	6,5 ± 0,7
2,3,4-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	12,4 ± 0,8	4,0 ± 0,4	2,6 ± 0,6	40,0 ± 1,8

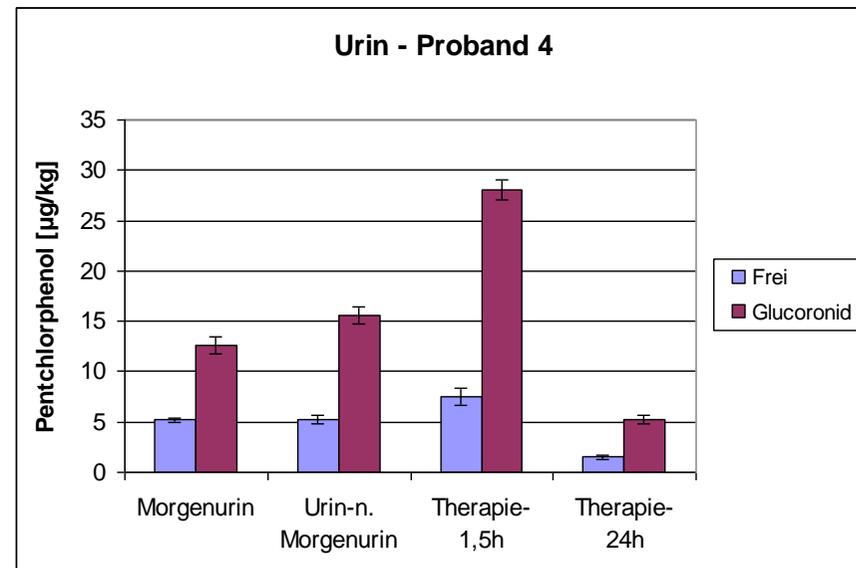
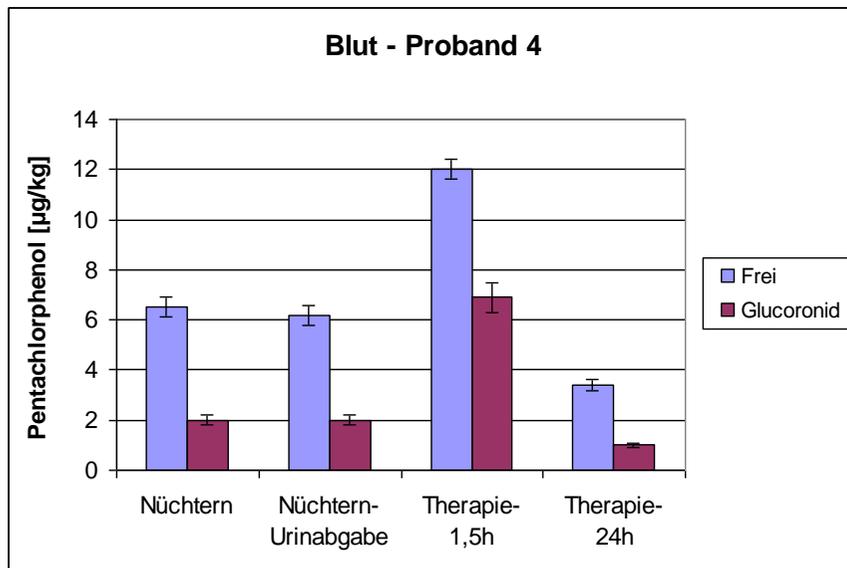
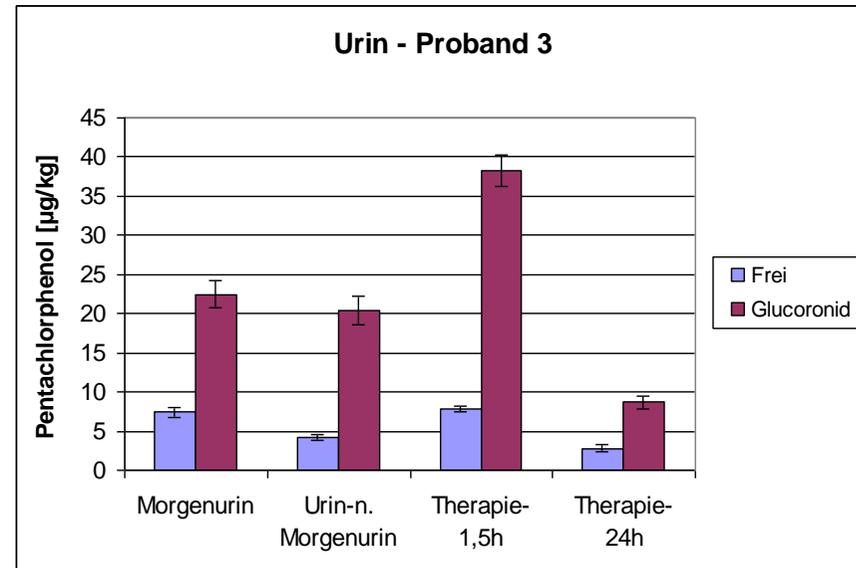
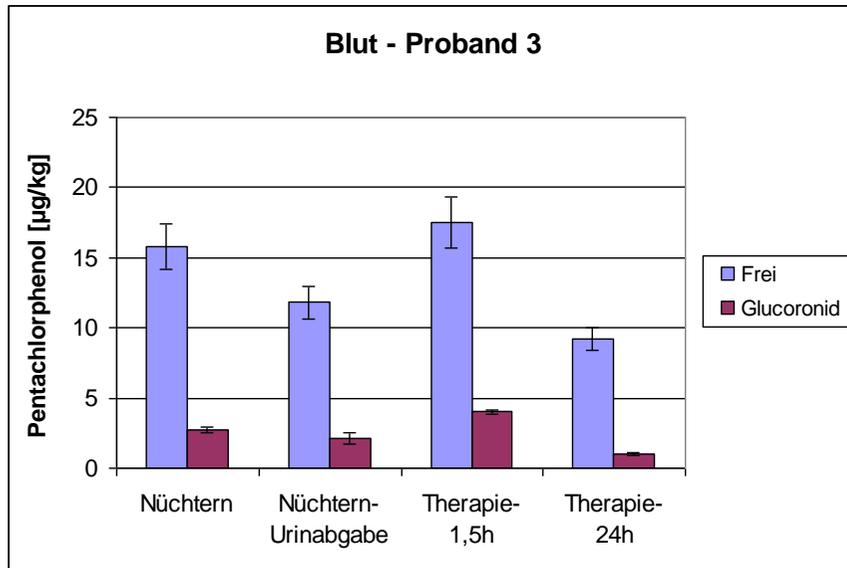
	Blut nach der Therapie; nach ca. 1,5 h		Urin nach der Therapie nach ca. 1,5 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	2,2 ± 0,4	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,6 ± 0,4
2,4,5-Trichlorphenol	7,4 ± 0,8	4,0 ± 0,6	2,0 ± 0,4	8,0 ± 1,0
2,3,4-Trichlorphenol	8,0 ± 0,6	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,2
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	3,0 ± 0,5	3,0 ± 0,6	1,4 ± 0,4	1,4 ± 0,2
Pentachlorphenol	16,0 ± 0,8	5,4 ± 0,4	6,5 ± 0,5	48,0 ± 2,0

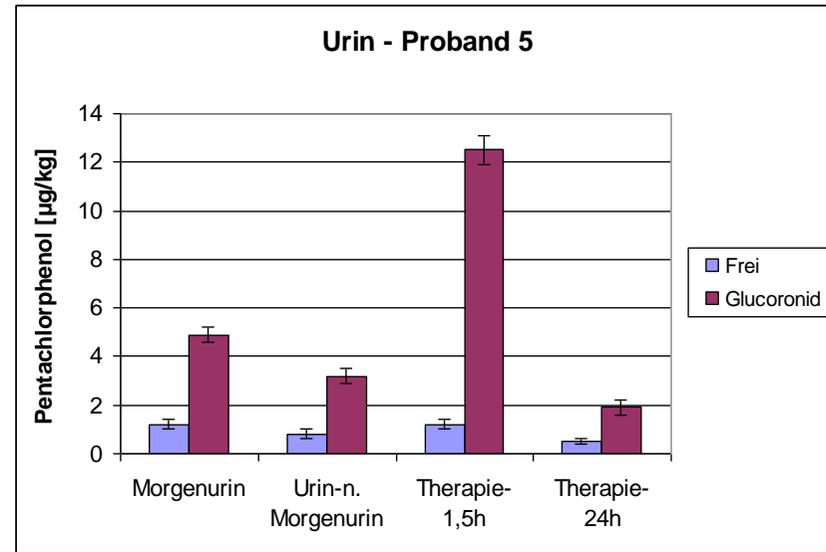
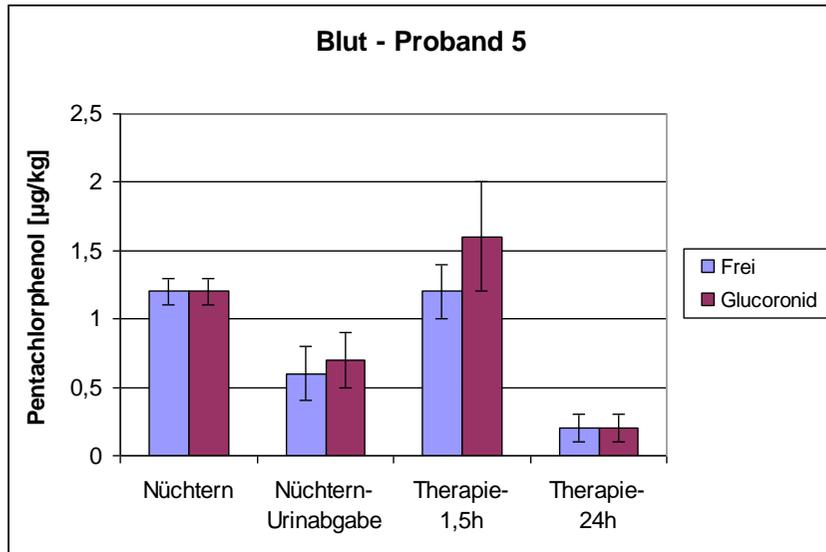
	Blut nach der Therapie; nach ca. 24 h		Urin nach der Therapie nach ca. 24 h	
	Frei	Glucoronid	Frei	Glucoronid
2,4,6-Trichlorphenol	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
2,4,5-Trichlorphenol	3,0 ± 0,4	1,5 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,8 ± 0,4
2,3,4-Trichlorphenol	2,0 ± 0,6	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0
2,3,4,6-Tetrachlorphenol	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Pentachlorphenol	7,4 ± 0,6	2,0 ± 0,4	2,0 ± 0,4	14,5 ± 0,0

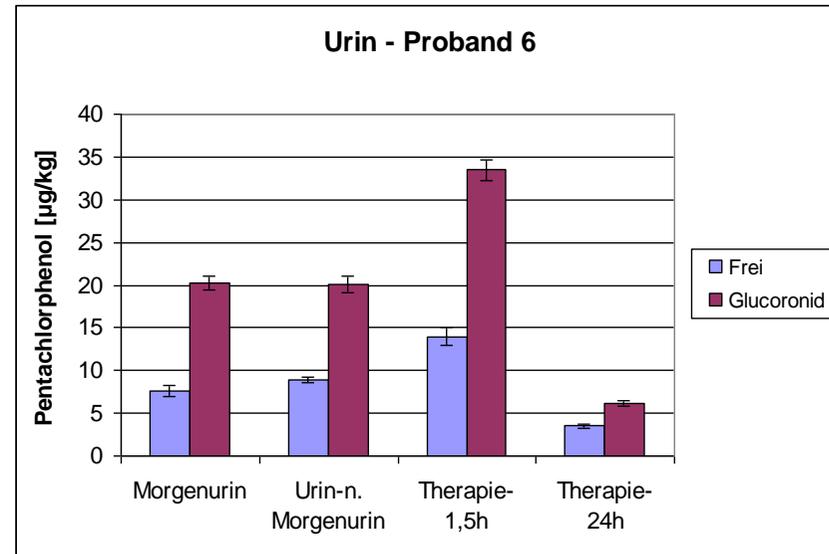
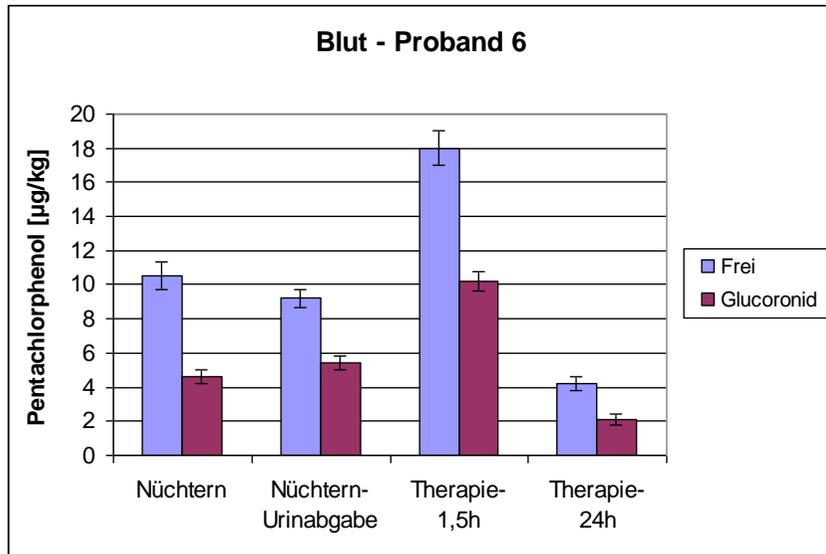
- Konzentrationsangaben in: **µg/kg**

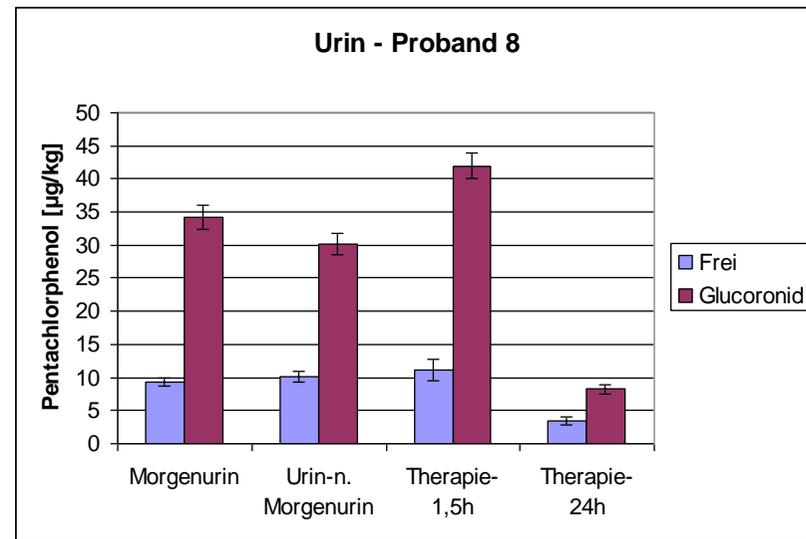
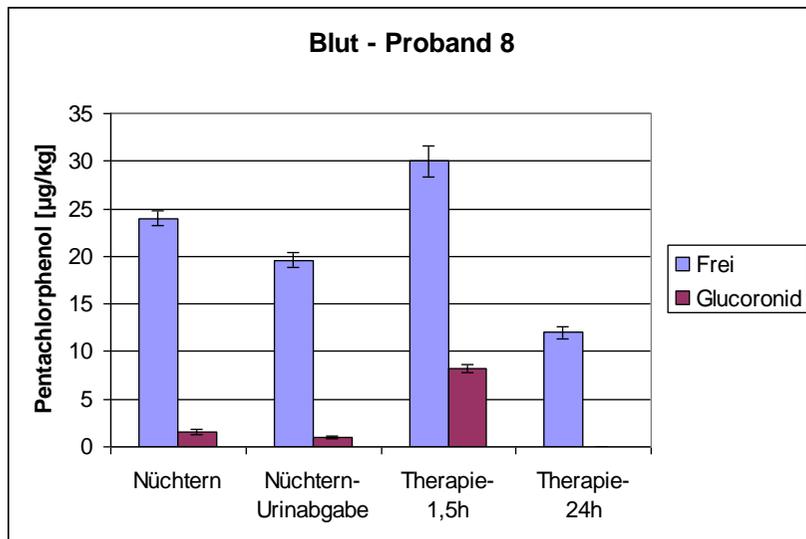
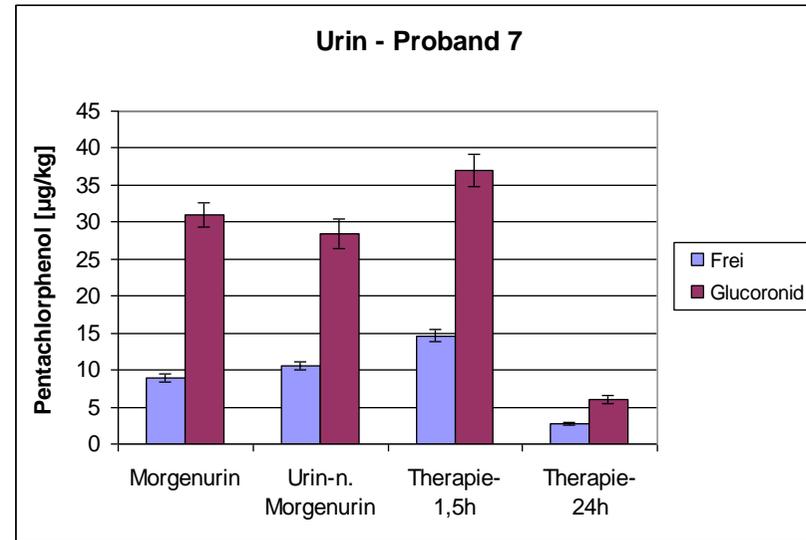
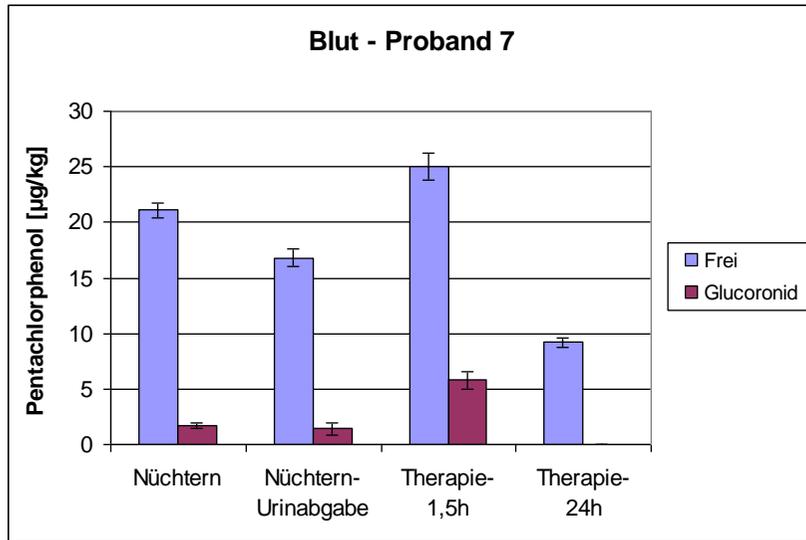
Abbildung 4. Pentachlorphenolkonzentrationen je nach Proband extra graphisch dargestellt.

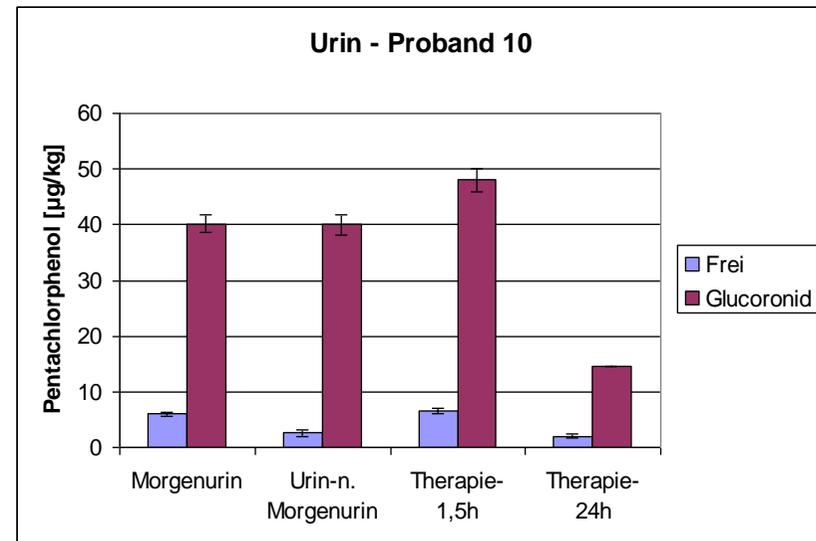
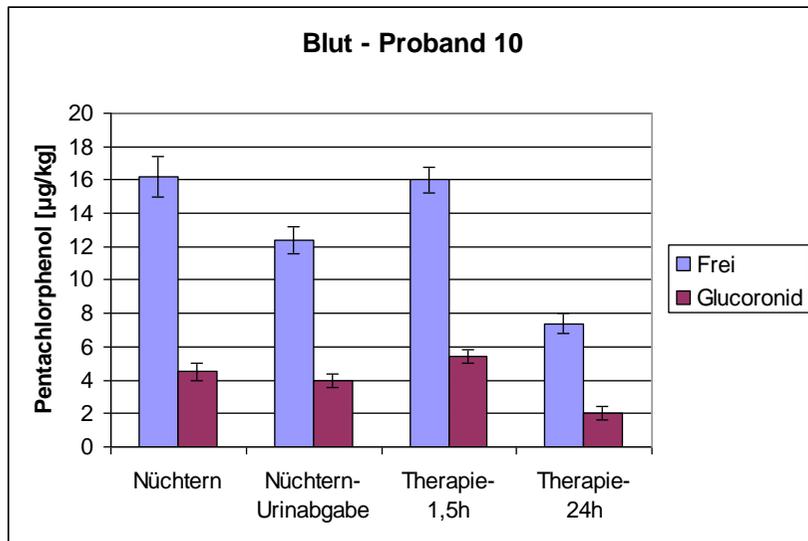
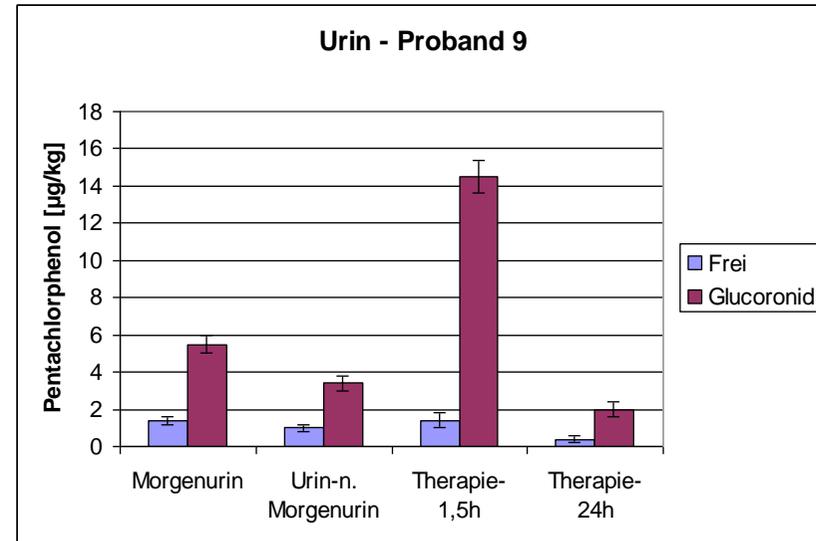
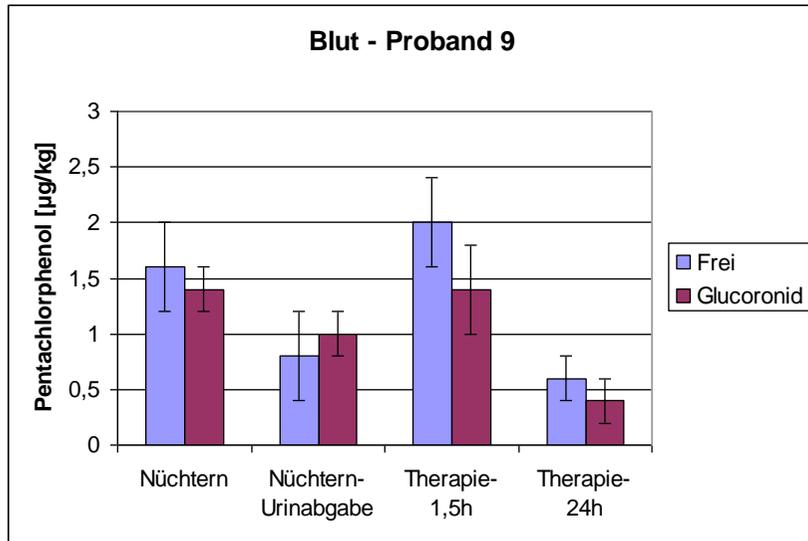












Daraus geht deutlich hervor, dass nach der Anwendung der Power Tube bei allen Probanden zuerst die Chlorphenolkonzentrationen in den Blut- und Urinproben signifikant anstiegen. Diese Daten gelten für 1,5 h nach der Therapie. Misst man die Chlorphenolkonzentrationen nach 24 h, so stellt man fest, dass die Konzentration dieser Verbindungen sowohl in den Blut- als auch den Urinproben signifikant reduziert wurden. Dies gilt gleichermaßen für freie Chlorphenole als auch für Glucoronide.

Besonders hervorzuheben ist die rasante Konzentrationszunahme der Glucoronide 1,5 h nach der Behandlung. Daraus ergibt sich, dass bei allen Probanden die Metabolisierungsraten steigen. Diese Steigerung macht deutlich, dass es durch die Power Tube Behandlung zu einer Metabolisierungsaktivität der Probanden kommt. Nach 24 h werden diese Verbindungen durch die Harnblase ausgeschieden. Dies führt zu einer allgemeinen Entgiftung dieser Umweltchemikalien.

**Fazit:** Die Power Tube aktiviert eindeutig den Metabolisierungsprozess und führt zu einer Entgiftung aller Probanden. Würde man Power Tube regelmäßig anwenden, dann ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die Chlorphenole fast vollständig aus dem Körper eliminiert werden.

### **4.3 Zu Themenbereich c)**

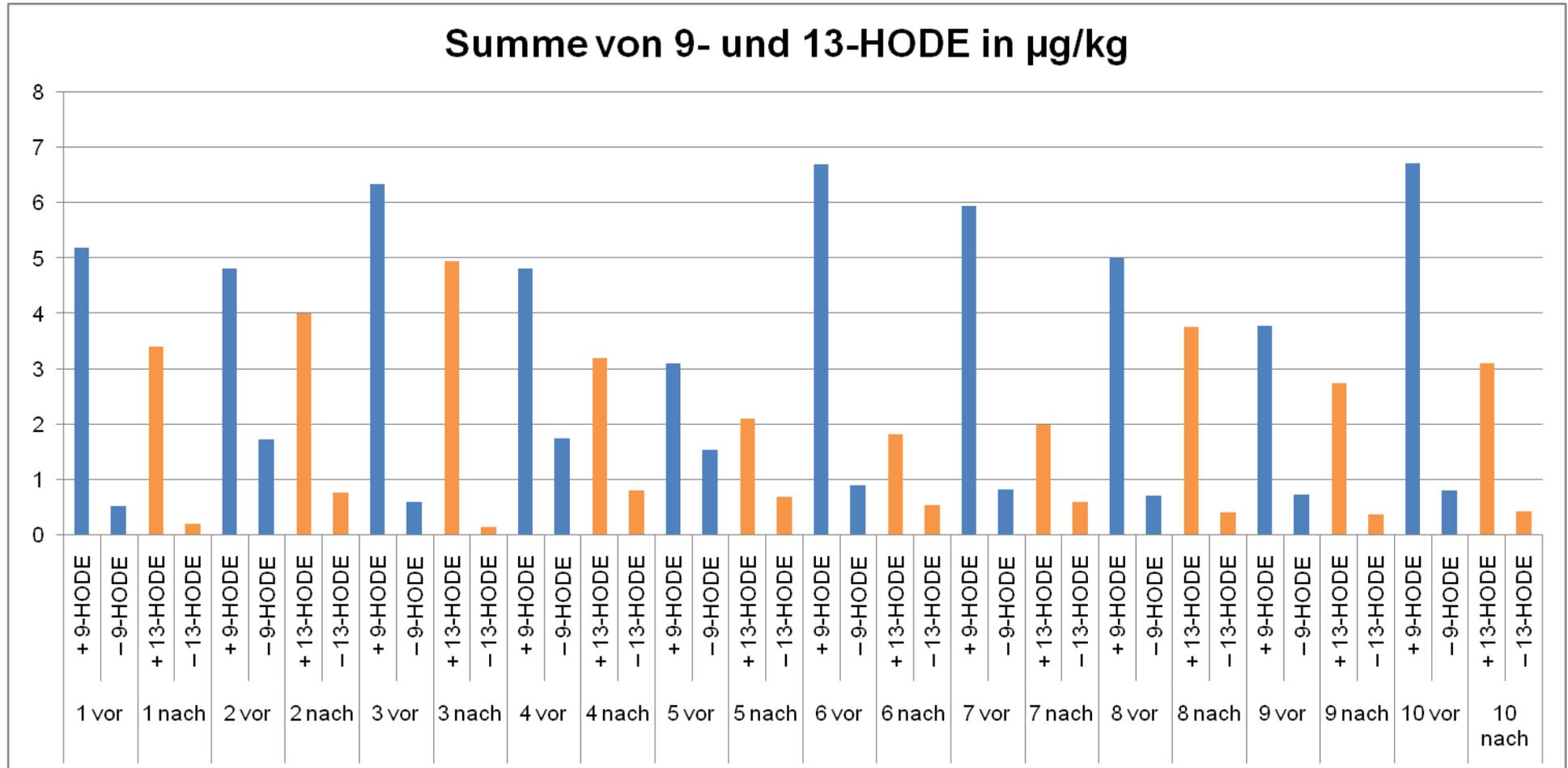
Aus den erzielten Ergebnissen kann zuerst abgeleitet werden, dass nach der Behandlung mit Power Tube die Konzentrationen von  $\pm$  9-HODE und  $\pm$  13-HODE sinken. Dies ist ein Hinweis darauf, dass bei den behandelten Probanden die Fettoxidation zu Fettsäureperoxiden reduziert wird. Da Fettsäuren in ausreichenden Konzentrationen im Körper vorkommenden, kann die Reduzierung von Fettsäureperoxiden möglicherweise nur damit zusammenhängen, dass die intermediär gebildeten Peroxy-Species in ihrer Konzentration abnehmen. Außerdem

verdeutlichen die ( $\pm$ ) Verhältnisse der 9- und 13-HODEs zusätzlich, dass diese Verbindungen nach der Behandlung mehr racemisieren (Tab. 4, Abb. 5).

**Tabelle 4.**  $\pm$  9- und  $\pm$  13-HODE Gehalte von Probanden vor und nach der Anwendung (21 min, 3 Behandlungen im Laufe eines Tages – 9:00; 14:00; 18:00; – Probenahme: 8:45 und 20:00 Uhr); Die Bestimmungen wurden mit HRGC-HRGC-Chiral-MS durchgeführt.

Proband	Produkt	Summe 9- 13-HODE in $\mu\text{g}/\text{kg}$	( $\pm$ )-Verhältnisse
1 vor	+ 9-HODE	5,20	1 : 0,01
	– 9-HODE	0,53	1 : 0,03
1 nach	+ 13-HODE	3,40	1 : 0,54
	– 13-HODE	0,21	1 : 0,55
2 vor	+ 9-HODE	4,81	1 : 0,03
	– 9-HODE	1,73	1 : 0,07
2 nach	+ 13-HODE	4,00	1 : 0,65
	– 13-HODE	0,77	1 : 0,71
3 vor	+ 9-HODE	6,35	1 : 0,02
	– 9-HODE	0,60	1 : 0,01
3 nach	+ 13-HODE	4,95	1 : 0,63
	– 13-HODE	0,15	1 : 0,65
4 vor	+ 9-HODE	4,81	1 : 0,03
	– 9-HODE	1,76	1 : 0,03
4 nach	+ 13-HODE	3,20	1 : 0,55
	– 13-HODE	0,80	1 : 0,58
5 vor	+ 9-HODE	3,10	1 : 0,01
	– 9-HODE	1,55	1 : 0,01
5 nach	+ 13-HODE	2,10	1 : 0,47
	– 13-HODE	0,70	1 : 0,58
6 vor	+ 9-HODE	6,70	1 : 0,03
	– 9-HODE	0,91	1 : 0,03
6 nach	+ 13-HODE	1,82	1 : 0,60
	– 13-HODE	0,55	1 : 0,57
7 vor	+ 9-HODE	5,95	1 : 0,03
	– 9-HODE	0,82	1 : 0,03
7 nach	+ 13-HODE	2,00	1 : 0,45
	– 13-HODE	0,60	1 : 0,52
8 vor	+ 9-HODE	5,00	1 : 0,02
	– 9-HODE	0,71	1 : 0,02
8 nach	+ 13-HODE	3,77	1 : 0,33
	– 13-HODE	0,42	1 : 0,37
9 vor	+ 9-HODE	3,78	1 : 0,02
	– 9-HODE	0,73	1 : 0,03
9 nach	+ 13-HODE	2,74	1 : 0,55
	– 13-HODE	0,38	1 : 0,55
10 vor	+ 9-HODE	6,72	1 : 0,04
	– 9-HODE	0,81	1 : 0,04
10 nach	+ 13-HODE	3,10	1 : 0,65
	– 13-HODE	0,44	1 : 0,62

## Summe von 9- und 13-HODE in µg/kg



**Abbildung 5.** Schematische Darstellung der Änderung der 9- und 13-HODE ( $\pm$ )-Verhältnisse nach Anwendung der Power Tube (Stufe 3, für 21 min) je nach Proband.

Vor der Behandlung dominieren die (+)-Enantiomere beider Verbindungen im Blut der Probanden, nach der Behandlung ändert sich dies deutlich und die (–)-Enantiomere nehmen zu einem relativen Anteil zu. Eine plausible Erklärung für diesen Sachverhalt wäre wie folgt: Normalerweise ist die Bildung von 9-HODE und 13-HODE aus den entsprechenden Fettsäuren stereospezifisch. Diese biotische Umwandlung führt zur Bildung einer der möglichen Enantiomeren (+-Antipode). Dabei spielen freie Peroxide kaum eine Rolle. Nach Anwendung der Power Tube kommt es dazu, dass die biotisch kontrollierte Bildung von 9- und 13-HODEs in ihrer Effektivität reduziert wird, sodass die freien Peroxyradikale im Blut erfolgreich mit der biotischen Bildung von 9- und 13-HODEs konkurrieren und diesmal abiotisch die Fettsäuren zu 9- und 13-HODE umsetzen (Tab. 5).

**Tabelle 5.** Vorgeschlagener Blockierungsweg zur Bildung von Fettsäureperoxiden.

Biotische Bildung von 10,12- bzw. 9,10-Octadiensäure:	(+) 9-Hydroxy-10,12-Octadiensäure
	(+) 13-Hydroxy-9,11-Octadiensäure
Abiotische Bildung von 10,12- bzw. 9,10-Octadiensäure	(±) 9-Hydroxy-10,12-Octadiensäure
	(±) 13-Hydroxy-9,11-Octadiensäure
Blockierung der biotischen Bildung	→ Zunahme der (–)-Enantiomerkonzentrationen der 9- und 13-HODEs durch freie Peroxyradikale
	→ Reduzierung der Peroxyradikalkonzentration im Blut der Probanden

## 5 Literatur

- [1] Ritossa, F. (1963) *Drosophila Informati* 37, 122.
- [2] Welch, W. J. (1992) *Physiological Reviews* 72(4), 1063-81.
- [3] Beckmann, R. P.; Mizzen, L. E.; Welch, W. J. (1990) *Science* 248(4957), 850-854.
- [4] Pelham, H. R. (1988) *Nature* 332(6167), 776-777.
- [5] Pelham, H. R. (1982) *Cell* 30(2), 517-528.
- [6] Wu, C.; Wilson, S.; Walker, B.; et al. (1987) *Science* 238(4831), 1247-1253.
- [7] Sorger, P. K.; Nelson, H. C. M. (1989) *Cell* 59(5), 807-813.
- [8] Nevins, J. R. (1982) *Cell* 29(3), 913-919.
- [9] Perisic, O.; Xiao, H.; Lis, J. T. (1989) *Cell* 59, 797-806.
- [10] Henneböle, J. (1990) Dissertation Universität Kassel.
- [11] Gebefügi, I. (1985) Dissertation Technische Universität München.
- [12] Seifert, Prescher K E, Ullrich D. (1984) *WaBoLu-Hefte* 2.
- [13] Budiansky, S. (1980) *Outlook – Indoor air pollution. Environmental Science and Technology* 14, 1023.
- [14] Krause, C. (1982) In: Aurand, K., Seifert, B. and Wegner, J. (Editors), *Luftqualität in Innenräumen*, Fischer, Stuttgart/New York, 309–316.
- [15] Parlar, H.; Henneböle, J. (1990) Bericht Nr. 3, Universität Kassel, Abteilung Chemie.
- [16] Morel, D. W.; Hessler, J. R.; Chisolm, G. M. (1983) *Journal of Lipid Research* 24(8), 1070-1076.
- [17] Winyard, P. G.; Tatzber, F.; Esterbauer, H. et al. (1993) *Annals of the Rheumatic Diseases* 52(9), 677-680.

- [18] Nishigaki, I.; Hagihara, M.; Tsunekawa et al. (1981) *Biochemical Medicine* 25(3), 373-378.
- [19] Mickel, H. S. (1978) *Symposium on the Pharmacological Effect of Lipids*, 179-190.
- [20] Gardner, H. W. (1989) *Free Radical Biology & Medicine* 7(1), 65-86.
- [21] Kuehn, H.; Belkner, J.; Wiesner, R. et al. (1992) *Eicosanoids* 5(1), 17-22.
- [22] Esterbauer, H.; Benedetti, A.; Lang, J. et al. (1986) *Biochimica et Biophysica Acta* 876(1), 154-166.
- [23] Parlar, H. (2007) *Unveröffentlichte Ergebnisse*.
- [24] Parlar, H. (2008) *Unveröffentlichte Ergebnisse*.
- [25] Gorg, A.; Obermaier, C.; Boguth, G. et al. (2000) *Electrophoresis* 21(6), 1037-1053.
- [26] Blum, H.; Beier, H.; Gross, H.J. (1987) *Electrophoresis* 8, 93–99.