

BfR bewertet Untersuchungen zu hormonähnlichen Wirkungen von in natürlichen Mineralwässern vorkommenden Substanzen

Stellungnahme Nr. 007/2011 des BfR vom 2. Februar 2011

Die Belastung von Mineralwässern mit hormonell wirksamen Substanzen ist während der letzten Jahre mehrfach Gegenstand wissenschaftlicher Studien gewesen. Im Rahmen eines Forschungsprojekts des Chemischen und Veterinäruntersuchungsamtes (CVUA) Stuttgart wurde untersucht, ob natürliche Mineralwässer eine östrogenartige Wirkung aufweisen. Dazu wurden Mineralwässer analysiert, um zu ermitteln, ob darin Substanzen enthalten sind, von denen östrogenartige Aktivitäten ausgehen könnten und ob es einen Bezug zur Abfüllung in Glas- und Kunststoffflaschen gibt.

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) hat sowohl die hormonähnlichen als auch die toxikologischen Wirkungen von den in natürlichen Mineralwässern nachgewiesenen Substanzen bewertet. Es gab weder Hinweise auf eine östrogenartige Aktivität in den Mineralwässern noch wurden Substanzen in Konzentrationen nachgewiesen, die eine solche Aktivität hätten hervorrufen können. Allerdings wurden auch einige Substanzen identifiziert, für die bislang noch keine Daten zu hormonartigen Wirkungen vorliegen.

Grundsätzlich sollte aus Sicht des BfR von Mineralwasser keine hormonartige Wirkung ausgehen. Das BfR hält systematische Stufenkontrollen für erforderlich: Direkt den Quellen entnommene Wässer, Wässer nach Durchlaufen der Behandlungsprozesse bei den Abfüllern und im Handel befindliche, abgefüllte Mineralwässer nach unterschiedlich langer Lagerdauer sollten untersucht und verglichen werden. Es besteht weiterer Forschungsbedarf, um ein mögliches gesundheitliches Risiko abschätzen zu können.

1 Gegenstand der Bewertung

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) hat Untersuchungen zur Belastung von Mineralwässern mit hormonell wirksamen Schadstoffen bewertet. Grundlage hierfür waren die Ergebnisse eines Forschungsprojekts des Chemischen und Veterinäruntersuchungsamtes (CVUA) Stuttgart (publiziert in Bopp et al., 2010).

2 Ergebnis

Die Bewertung der hormonähnlichen und toxikologischen Wirkungen von Substanzen, die in der CVUA-Studie (Bopp et al., 2010) identifiziert wurden, ergab keine Hinweise auf östrogenartige Wirkungen in den untersuchten Mineralwasserproben. Für einige Substanzen liegt allerdings bislang noch keine ausreichende Datenbasis für eine entsprechende Bewertung vor. Grundsätzlich sollte aus Sicht des BfR von Mineralwasser keine hormonartige Wirkung ausgehen. Das BfR hält systematische Stufenkontrollen für erforderlich, in denen Ergebnisse von Bioassays, die unterschiedliche Aspekte hormonähnlicher Wirkungen adressieren, mit chemisch-analytischen Daten verglichen werden. Um ein mögliches gesundheitliches Risiko abschätzen zu können, sollte die Relevanz der *in vitro* beobachteten hormonähnlichen Wirkungen auch unter Berücksichtigung robuster *in vivo*-Endpunkte aus toxikologischen Studien überprüft werden.

3 Begründung

3.1 Studien zu hormonähnlichen Wirkungen in Mineralwasserproben

Verschiedene Untersuchungen deuten an, dass in Mineralwasser Substanzen enthalten sein können, die zumindest in *in vitro*-Assays eine östrogenartige Wirkung auslösen.

In Deutschland haben Untersuchungen des Niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit gezeigt, dass bei Mineral- und Tafelwässern teilweise schon die am Brunnenkopf entnommenen Quellwässer einen Hinweis auf eine östrogene Wirksamkeit ergeben. Als mögliche Ursache für die Aktivität werden Huminstoffe im Quellwasser diskutiert (Böhmler et al., 2006). Die Autoren gehen aufgrund vergleichender Daten zu Quellwasser und verpackten Proben davon aus, dass ein Übergang von östrogenartig wirksamen Substanzen von den Verpackungen in die Wässer unwahrscheinlich ist. Allerdings ist ein Eintrag von entsprechend wirksamen Substanzen durch Materialien im Behandlungs- und Abfüllprozess nicht auszuschließen.

Wagner und Oehlmann (2009) berichten von einer östrogenartigen Aktivität in untersuchten Mineralwasser-Proben. Der Nachweis erfolgte mit einem Hefe-basierten *in vitro*-System (YES-Assay) und einem in der Umwelttoxikologie benutzten Schneckenmodell. Die modifizierten Hefezellen mit einem Östrogen-induzierbaren Reportergenkonstrukt reagieren üblicherweise sehr empfindlich auf das natürliche Hormon 17 β -Östradiol und auf Xenoöstrogene mit einer vom humanen Östrogenrezeptor (ER α) abhängigen transkriptionalen Aktivierung. Die untersuchten Mineralwässer waren in Glas-Flaschen, PET-Flaschen und in Getränkekartons verpackt. Die Autoren gehen davon aus, dass in den positiv getesteten Mineralwässern Substanzen aus den Kunststoffverpackungsmaterialien freigesetzt wurden und in einer effektiven östrogenen Wirkkonzentration vorliegen. Bekannte Xenoöstrogene weisen jedoch östrogenartige Potenzen auf, die um einige Größenordnungen kleiner sind als die des natürlichen Hormons 17 β -Östradiol. Sie ist für Nonylphenol um den Faktor 5.000, für Bisphenol A um den Faktor 15.000 geringer (Gaido et al., 1997). Auch andere mögliche Kontaminationen, wie Phthalate oder Antimonverbindungen, die von den Autoren diskutiert werden, wirken *in vitro* noch schwächer als Bisphenol A bzw. gar nicht östrogenartig. In den Proben müssten also entsprechend hohe Substanzkonzentrationen vorliegen, um die genannten östrogenartigen Aktivitäten auszulösen. Im Hinblick auf das bekannte Migrationsverhalten von Substanzen aus dem Kunststoff Polyethylenterephthalat (PET) erscheint dies auch unter der Annahme der Migration von synergistisch wirkenden Substanzen nicht plausibel. Die in der Publikation angegebenen Daten belegen nicht die von den Autoren diskutierte Hypothese, die östrogenartige Aktivität stamme aus PET-Flaschen. Auch die Versuche mit einem Schnecken-Modell (*Potamopyrgus antipodarum*) sind nicht geeignet, die im Hefe-Test erhaltenen Befunde zu erhärten. Ob dieses Testsystem tatsächlich ausschließlich auf östrogenartige Substanzen reagiert oder eventuell auch durch Adsorptionseffekte an der Matrix (Glas, PET) beeinflusst wird, kann aufgrund der von den Autoren vorgelegten Daten nicht beurteilt werden. Aufgrund der Daten aus dem Schneckenmodell können daher keine wissenschaftlich fundierten Schlussfolgerungen zum gesundheitlichen Risiko des Verbrauchers gezogen werden. Hierzu wären chemische Analysen von Substanzen, die aus dem Kunststoff ins Mineralwasser übergehen (migrieren) können, erforderlich.

In einer aktuellen Arbeit von Wagner und Oehlmann (2010) wurde die östrogenartige Aktivität in untersuchten Mineralwasser-Proben mit Hilfe eines Proliferationstests mit humanen Brustkrebszellen (E-Screen-Assay) untersucht. Die berichteten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Quantifizierung der Effekte stark vom Design der Extraktionsmethode (u.a. Wahl des Extraktionssäulenmaterials und der Aufarbeitung der Extrakte) beeinflusst werden. Die Ergebnisse des E-Screen-Assays interpretieren die Autoren dahingehend, dass die

nachgewiesene östrogene Aktivität aus dem PET-Verpackungsmaterial migriert. Indes zeigen die Daten lediglich an, dass das Verpackungsmaterial einen quantitativen Einfluss auf die nachgewiesene östrogene Aktivität hat. Neben einer Belastung der Quelle können Kontaminationen durch das Flaschenmaterial, die Deckeldichtungen oder die verwendeten Etiketten anhand der Daten nicht ausgeschlossen werden. Der Einfluss unterschiedlich langer Lagerungszeiten ist nicht untersucht worden. Weiterhin wären Ergebnisse aus vergleichenden systematischen Untersuchungen wichtig, die mit Mineralwasserproben (1) unverpackt ab Quelle, (2) aus Glasflaschen und (3) aus PET-Flaschen, jeweils aus identischer Quelle abgefüllt, durchgeführt wurden.

3.2 Beurteilung von Kontaminanten in Mineralwasserproben

Im Rahmen des durch das Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum Baden Württemberg geförderten Forschungsprojekts „Hormonelle Aktivität in natürlichen Mineralwässern“ des CVUA Stuttgart (Bopp et al., 2010) wurde untersucht, ob und gegebenenfalls in welchem Umfang natürliche Mineralwässer eine östrogen-ähnliche Wirkung aufweisen. Die Untersuchungen erfolgten mit dem E-Screen-Assay und instrumentell-analytischen Screening-Methoden (GC/MS-Screening). Weiterhin erfolgte eine Charakterisierung möglicher Eintragspfade für die identifizierten Substanzen. Im Rahmen des Forschungsprojektes wurden die identifizierten Substanzen soweit wie möglich semiquantitativ ausgewertet. Die ermittelten Konzentrationen liegen größtenteils unter 1 µg/L. Für 4(1H)-Chinazolinon und 2-Aminobenzamid wurden Werte bis zu 2 bzw. 17 µg/L angegeben. Zu den hormonellen oder toxikologischen Wirkungen der identifizierten Substanzen wurde eine Abfrage in verschiedenen Datenbanken (Pubmed, ISIWeb of Science, Toxnet, Scopus und LitDoc) durchgeführt. Die erhaltenen Informationen werden im Folgenden dargestellt.

Butylhydroxytoluol

Butylhydroxytoluol (BHT) ist ein zugelassener Lebensmittelzusatzstoff (E321) und wird als Antioxidans in verschiedenen Verbraucherprodukten, z.B. kosmetischen Mitteln, Pflanzenschutzmitteln und Lebensmittelverpackungen eingesetzt. Von der JECFA (1995) wurde ein ADI-Wert von 0-0,05 mg/kg Körpergewicht (KG) abgeleitet. BHT ist in der Kunststoff-Richtlinie (2002/72/EG) mit einem spezifischen Migrationsgrenzwert (SML) von 3 mg/kg gelistet. BHT wurde in Mineralwasser aus Glasflaschen – nicht aber aus PET-Flaschen – nachgewiesen (ca. 2 µg/L). Dies wurde auf das Herauslösen aus den Polyethyldichtungen der Verschlüsse zurückgeführt (Higuchi et al., 2004). In einer anderen Analyse des Institut Fresenius von abgefülltem Wasser (Zerbe, 8. BfR-Verbraucherforum, 2010) wurde BHT in 5 von 68 Proben aus Glas- und PET-Flaschen nachgewiesen (max. 6,2 µg/L). In den parallel durchgeführten biologischen Tests (YES- und E-Screen) wurden aber keine östrogenartigen Effekte beobachtet. Die Autoren konnten keine Bindungsaffinität von BHT an den Östrogenrezeptor nachweisen. BHT hatte *in vitro* weder eine proliferative Wirkung in Brustkrebszellen noch induzierte es die transkriptionale Aktivität des Östrogenrezeptors (Jobling et al., 1995). Andere Arbeiten geben allerdings begrenzte Hinweise auf eine endokrine Wirkung: In einem Reporter-Gen-Test mit der embryonalen Nierenfibroblasten Zelllinie 293T wurden mit relativ hohen BHT-Konzentrationen (50 und 100 µmol/L) geringfügige östrogenartige Effekte nachgewiesen (Wada et al., 2004). Eine anti-androgenartige Wirkung von BHT wurde in einer transfizierten Prostatakarzinomzelllinie nachgewiesen (Schrader und Cooke, 2000). Insgesamt kann aus den Daten gefolgert werden, dass BHT keine oder allenfalls sehr schwache östrogenartige Wirkungen entfaltet, die nicht zu einer nennenswerten Aktivität im E-Screen führen sollten.

Tabelle 1: Liste der identifizierten Substanzen

CAS-Nr.:	Substanz	Restriktion*
1885-29-6	2-Aminobenzonitril	
88-68-6	2-Aminobenzamid	SML = 0,05 mg/kg (nur für PET für Wasser und Getränke)
491-36-1	4(1 <i>H</i>)-Chinazolinon	
6386-38-5	Methyl-3-(3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxyphenyl)propionat	
96-76-4	2,4-Di- <i>tert</i> -butylphenol	
301-02-0	Oleamid	ohne Beschränkung
	Fettsäureamide	
77-90-7	Tri- <i>n</i> -butylacetylcitrat (ATBC)	TDI = 1,0 mg/kg KG/Tag ohne Beschränkung
7568-58-3	Tributylaconitat	
77-94-1	<i>n</i> -Butylcitrat	SML(Tpl) = 3 mg/kg Gruppen-R: 0,05 mg/kg KG/Tag
87-41-2	1(3 <i>H</i>)-Isobenzofuranon	
28553-12-0	Di-isononylphthalat (DINP)	Gruppen-TDI (mit DIDP) = 0,15 mg/kg KG/Tag SML(T) = 9 mg/kg
128-37-0	BHT (Butylhydroxytoluol) (2,6-Di- <i>tert</i> -butyl- <i>p</i> -kresol)	ADI = 0,05 mg/kg KG/Tag SML = 3,0 mg/kg
90-43-7	2-Phenylphenol	
82304-66-3	7,9-Di- <i>tert</i> -butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dien-2,8-dion	
166412-78-8	DINCH (1,2-Cyclohexan-dicarbonensäure-diisononylester)	TDI = 1 mg/kg KG/Tag ohne Beschränkung*

*aufgrund der Richtlinie der EU-Kommission 2002/72/EG für Kunststoffe im Kontakt mit Lebensmitteln; angegeben wurde der spezifische Migrationsgrenzwert (SML). Die tolerable/akzeptable tägliche Aufnahmemenge (TDI bzw. ADI) pro kg Körpergewicht (KG) wurde vom Scientific Committee on Food (SCF) oder von der Europäischen Lebensmittelsicherheitsbehörde (EFSA) abgeleitet.

Di-isononylphthalat

Di-isononylphthalat (DINP) ist 2005 von der EFSA bewertet worden: Das entsprechende wissenschaftliche Gremium der EFSA (AFC Panel) leitete aufgrund einer Rattenstudie (mit einer höchsten Dosis ohne leber- und nierentoxische Wirkungen (NOAEL) von 15 mg/kg KG/Tag) einen TDI-Wert von 0,15 mg/kg KG ab (EFSA, 2005). Von der EFSA wurden mit DINP im Gegensatz zu anderen reproduktionstoxischen Phthalaten (z.B. Diethylhexylphthalat (DEHP) keine offenkundigen toxischen Wirkungen auf die Fortpflanzungsorgane von Ratten festgestellt. Hinsichtlich möglicher endokriner Wirkungen von DINP wurden in einer Studie von Gray et al. (2000) an neonatalen Ratten leichte Effekte auf die Brustdrüsen-Entwicklung von männlichen Ratten ausschließlich bei hoher Dosierung (750 mg/kg KG vom Schwangerschaftstag 14 bis zum 3. Tag nach der Geburt) beobachtet. Neuere Arbeiten von Kwack et al. (2009) und Boberg et al. (2010) bestätigen anti-androgene Wirkungen von DINP

(Brustdrüse, Anogenital-Abstand, Hodenhistologie und Spermienmotilität) nach oraler Applikation. Der NOAEL für reproduktionstoxische Effekte nach perinataler Gabe wurde in der Studie von Boberg et al. (2010) bei 300 mg/kg KG/Tag festgestellt, d.h. DINP ist etwa um den Faktor 60- bis 90-fach weniger wirksam als DEHP. Anti-androgene Effekte von DINP wurden auch an Ratten (im Hershberger-Test) beobachtet (Lee und Koo, 2007). Die Reduktion der testikulären Testosteronsynthese weist auf einen ähnlichen Mechanismus wie bei DEHP hin (Borch et al., 2004). Dagegen wurden keine Auswirkungen der maternalen DINP-Exposition (250 und 750 mg/kg KG) auf testikuläre oder adrenale Proteine der Steroidsynthese oder auf den Androgenrezeptor in Rattenföten beobachtet (Adamsson et al., 2009). Auch *in vitro* wurden keine DINP-Effekte auf Östrogenrezeptoren (ER α , ER β) oder den Androgenrezeptor nachgewiesen (Takeuchi et al., 2005; Krüger et al., 2008; Ghisari und Bonefeld-Jorgensen, 2009). Unklare *in vitro*-Effekte zeigte DINP im rekombinanten Hefetest und in einem Proliferationstest mit einer Brustkrebszelllinie (Harris et al., 1997) sowie hinsichtlich Schilddrüsenhormon-artiger Wirkungen (Ghisari und Bonefeld-Jorgensen, 2009) oder der FSH-stimulierten Progesteron-Freisetzung (Mlynarciková et al., 2007). In einer Fütterungsstudie an Ratten nach hoher DINP-Exposition der Muttertiere (20.000 ppm im Futter), die zu reproduktionstoxischen Effekten an Nachkommen beiderlei Geschlechts führten (Masutomi et al., 2003), wurde nur in weiblichen Nachkommen eine erniedrigte Expression des Progesteronrezeptors in Hypothalamusregionen gezeigt (Takagi et al., 2005). Aufgrund der o.a. *in vitro*-Daten ist nicht anzunehmen, dass DINP zu einer östrogenartigen Aktivität im E-Screen beiträgt.

1,2-Cyclohexan-dicarbonsäure-diisononylester

1,2-Cyclohexan-dicarbonsäure-diisononylester (DINCH) wurde 2003 vom BfR auf der Grundlage von umfassenden toxikologischen Daten bewertet und in die Empfehlungen I (als Weichmacher für PVC), XXVII (Förderbänder) und XXIX (Kunststoffschläuche für Getränke) aufgenommen. 2006 wurde von der EFSA für DINCH aufgrund von nierentoxischen Effekten ein NOAEL von 100 mg/kg KG/Tag festgelegt und daraus ein TDI von 1 mg/kg KG abgeleitet (EFSA, 2006). Die durch DINCH induzierte Schilddrüsenhyperplasie wurde von der EFSA wegen der höheren Empfindlichkeit von Ratten im Vergleich zum Menschen als kein geeigneter Parameter für die TDI-Ableitung angesehen. Nach pränataler Applikation von DINCH und in Zweigenerationsstudien an Ratten und Kaninchen wurden keine entwicklungs- oder reproduktionstoxischen Effekte bis zu einer Dosis von 1000 mg/kg KG/Tag nachgewiesen. Spezifische Studien zu einer möglichen endokrinen Wirkung von DINCH wurden dem BfR oder der EFSA nicht vorgelegt. Da DINCH auch für Dichtungsringe in Flaschenverschlüssen beantragt wurde, liegen auch Migrationswerte für PVC-Verschlüsse mit 37% DINCH in Mineralwasser und Fruchtsäften vor: Es wurden bei Lagerung bis zu 25 Tagen (28°C) Migrationen im Bereich von 10-30 μ g/kg gemessen (EFSA, 2006). Aufgrund des Fehlens von östrogen-spezifischen Effekten in den reproduktionstoxikologischen Studien ist nicht davon auszugehen, dass derartig niedrige Migrationswerte von DINCH zu einem östrogenartigen Effekt im E-Screen führen könnten.

Acetyltributylcitrat

Ohta et al. (2003) untersuchten das Acetyltributylcitrat auf östrogene und androgene Aktivität *in vitro* und auf östrogene Aktivität *in vivo*. Ligandbindungsassays (ER, AR) und *in vivo*-Experimente mit ovariektomierten Sprague-Dawley-Ratten nach oraler Applikation von 0,5 bzw. 500 mg/kg und nach subkutaner Applikation von 0,5 bzw. 100 mg/kg ergaben keine Hinweise auf eine endokrine Aktivität.

2-Phenylphenol

2-Phenylphenol ist u. a. zur Konservierung von Zitrusfrüchten mit einem Grenzwert von 12 mg/kg zugelassen. Die Substanz könnte aus der Verwendung als Desinfektionsmittel während der Produktion von Flaschen oder bei der Abfüllung in das Mineralwasser gelangt sein. Für die Substanz wurden Ergebnisse aus *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten zur Identifikation eines möglichen endokrinen Wirkpotentials publiziert. *In vitro*-Bindungsstudien mit Cytosolpräparationen aus dem Uterus von ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratten (ER Competitive Binding Assay) zeigen, dass die Substanz nicht an Östrogen-Rezeptoren bindet (Blair et al., 2003). In einem rekombinanten Hefetest und im E-Screen-Assay wurde im Vergleich zu 17 β -Östradiol eine etwa 1×10^{-6} geringere Aktivität festgestellt. Auch in einer 2-Generations-Studie ergaben sich bis 500 mg/kg KG/Tag als höchste getestete Dosis für alle relevanten Endpunkte keine Hinweise auf eine endokrine Aktivität von Phenylphenol (Bomhard et al., 2002). Ghisari und Bonefeld-Jorgensen (2009) fanden im T-Screen und im ER-Transaktivierungs-Assay ebenfalls keine Hinweise auf eine Beeinflussung des endokrinen Systems.

Oleamid und andere Fettsäureamide

Endogene Fettsäureamide, zu denen auch das Oleamid zählt, sind als Lipidmediatoren in Hirn und Blut von Säugern bekannt, die verschiedene G-Protein-gekoppelte (z. B. Cannabinoid-Rezeptoren CB1, CB2) und andere Rezeptoren aktivieren und so an der Regulation des Nervensystems, des kardiovaskulären Systems sowie des Reproduktionssystems und des Immunsystems beteiligt sind (Hiley und Hoi, 2007).

Exogene Quellen für Oleamid sind u.a. Lebensmittelverpackungen, bei denen Oleamid als Gleitmittel im Produktionsprozess von Kunststofffolien eingesetzt wird. Experimentelle Daten, die einen unmittelbaren Effekt auf das endokrine System belegen, oder Hinweise auf eine Interaktion mit Komponenten bekannter Östrogenhormonrezeptor-Systeme aus *in vitro*-Experimenten sind bisher nicht bekannt.

Weitere identifizierte Substanzen

Das analytisch nachgewiesene 2,4-Di-*tert*-butylphenol stellt ein Abbauprodukt des Polymeradditivs Tris(2,4-di-*tert*-butylphenyl)phosphit dar. Das 7,9-Di-*tert*-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9,-dien-2,8-dion ist ein Abbauprodukt des BHT. Über die toxikologischen Eigenschaften der beiden Verbindungen im Hinblick auf mögliche endokrine Aktivitäten ist nichts bekannt.

Die nachgewiesenen Verbindungen Tributylaconitat und *n*-Butylcitrat sind chemische Abbauprodukte des als Weichmacher auf Zitronensäure-Basis verwendeten Acetyltributylcitrats (s.o.). Über ihre endokrinen Eigenschaften liegen keine Informationen vor.

Auch über die endokrinen Eigenschaften von 2-Aminobenzonitril, 2-Aminobenzamid, 4(1*H*)-Chinazolinon, 3-Phenylpropionat (Benzenepropionic acid), 3,5-*bis*(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy-methylester und 1(3*H*)-Isobenzofuranon (Phthalid) liegen dem BfR keine Daten vor.

4 Fazit und Handlungsempfehlungen

Zur grundsätzlichen Klärung der Frage, ob in Mineralwässern hormonell aktive Substanzen vorkommen, hält das BfR systematische Stufenkontrollen, beginnend mit den direkt den Quellen entnommenen Wässern über die Wasser nach Durchlaufen der Behandlungsprozesse bei den Abfüllern bis zu den im Handel befindlichen abgefüllten Mineralwässern für erforderlich. Es wäre dabei wünschenswert, die Ergebnisse der *in vitro*-Tests mit chemisch-analytischen Daten zu vergleichen. Die im Rahmen von Stufenkontrollen gewonnenen Probenreihen sollten mit Bioassays untersucht werden, die unterschiedliche Aspekte der Östrogen-Wirkung adressieren: (1) Ligand-Rezeptor-Bindung (*in vitro* Competitive Binding-Assay), (2) Nachweis des stimulierenden Effekts auf die Zellproliferation (E-Screen), (3) Ligand-anhängige Transaktivierung (YES-Assay, Luciferase-Transactivation-Assay). Für die gesundheitliche Bewertung von Mineralwässern sind weitere Anstrengungen zur analytischen Identifizierung von Kontaminanten mit hormonähnlichen Wirkungen erforderlich. Außerdem sollten zur besseren Einschätzung der gesundheitlichen Relevanz von *in vitro* beobachteten hormonähnlichen Substanzwirkungen auch robuste toxikologische Endpunkte aus tierexperimentellen Studien mit diesen Substanzen berücksichtigt werden.

5 Referenzen

Adamsson, A., Salonen, V., Paranko, J., and Toppari, J. (2009). Effects of maternal exposure to di-isononylphthalate (DINP) and 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (p,p'-DDE) on steroidogenesis in the fetal rat testis and adrenal gland. *Reproductive Toxicology* 28, 66-74.

BfR-Empfehlungen zu Materialien für den Lebensmittelkontakt (Stand vom 01.06.2009).

Blair, R. M., Fang, H., Branham, W. S., Hass, B. S., Dial, S. L., Moland, C. L., Tong, W., Shi, L., Perkins, R., and Sheehan, D. M. (2000). The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicological Sciences* 54, 138-153.

Boberg, J., Christiansen, S., Axelstad, M., Kledal, T. S., Vinggaard, A. M., Dalgaard, M., Nellemann, C., and Hass, U. (2010). Reproductive and behavioral effects of diisononyl phthalate (DINP) in perinatally exposed rats. *Reproductive Toxicology*, in press.

Böhmler, G., Kohnen, R., Borowski, U., and Rühle, A. (2006). Einsatz eines biologischen Testsystems (E-Screen) in der amtlichen Lebensmittelüberwachung zum Nachweis estrogen wirksamer Substanzen. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1, 325–331.

Bomhard, E. M., Brendler-Schwaab, S. Y., Freyberger, A., Herbold, B. A., Leser, K. H., and Richter, M. (2002). o-Phenylphenol and its sodium and potassium salts: a toxicological assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 32, 551-625.

Bopp, K., B. Kuch, M. Roth (2010). Hormonelle Aktivität in natürlichen Mineralwässern? *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 106, 489-500

Borch, J., Ladefoged, O., Hass, U., and Vinggaard, A. M. (2004). Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. *Reproductive Toxicology* 18, 53-61.

EFSA (2005). Opinion of the AFC Panel on a request from the Commission related to Di-isononylphthalate (DINP) for use in food contact materials. *The EFSA Journal* (2005) 244, 1-18.

EFSA (2006). Opinion of AFC Panel on a request related to a 12th list of substances for food contact materials. *The EFSA Journal* (2006) 395 to 401, 1-21.

Gaido, K. W., Leonard, L. S., Lovell, S., Gould, J. C., Babai, D., Portier, C. J., and McDonnell, D. P. (1997). Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicology and Applied Pharmacology* 143, 205-212.

Ghisari, M., and Bonefeld-Jorgensen, E. C. (2009). Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. *Toxicology Letters* 189, 67-77.

- Gray, L. E., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D. N. R., and Parks, L. (2000). Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicological Sciences* 58, 350-365.
- Harris, C. A., Henttu, P., Parker, M. G., and Sumpter, J. P. (1997). The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*. *Environmental Health Perspectives* 105, 802-811.
- Higuchi, A., Yoon, B. O., Kaneko, T., Ham, M., Maekawa, M., and Nohmi, T. (2004). Separation of endocrine disruptors from aqueous solutions by pervaporation: dioctylphthalate and butylated hydroxytoluene in mineral water. *Journal of Applied Polymer Science* 94, 1737-1742.
- Hiley, C. R., and Hoi, P. M. (2007). Oleamide: a fatty acid amide signaling molecule in the cardiovascular system? *Cardiovascular Drug Reviews* 25, 46-60.
- JECFA Report No. 44 (1995). http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_859.pdf
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M. G., and Sumpter, J. P. (1995). A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environmental Health Perspectives* 103, 582-587.
- Krüger, T., Long, M., and Bonefeld-Jorgensen, E. C. (2008). Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology* 246, 112-123.
- Kwack, S. J., Kim, K. B., Kim, H. S., and Lee, B. M. (2009). Comparative toxicological evaluation of phthalate diesters and metabolites in Sprague-Dawley male rats for risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A: Current Issues* 72, 1446-1454.
- Lee, B. M., and Koo, H. J. (2007). Hershberger assay for antiandrogenic effects of phthalates. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* 70, 1365-1370.
- Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Takahashi, N., and Hirose, M. (2003). Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein, or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/reproductive systems in later life. *Toxicology* 192, 149-170.
- Mlynarcikova, A., Fickova, M., and Scsukova, S. (2007). The effects of selected phenol and phthalate derivatives on steroid hormone production by cultured porcine granulosa cells. *Alternatives to Laboratory Animals : ATLA* 35, 71-77.
- Ohta, M., Oshima, S., Iwasa, T., Ito, N., Morii, M., Morino, M., Nakamura, T., and Nagai, K. (2003). Examination of sex-hormonal activity of some additives for PVDC film. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 44, 227-233.
- Schrader, T. J., and Cooke, G. M. (2000). Examination of selected food additives and organochlorine food contaminants for androgenic activity *in vitro*. *Toxicological Sciences* 53, 278-288.

- Takagi, H., Shibutani, M., Lee, K. Y., Masutomi, N., Fujita, H., Inoue, K., Mitsumori, K., and Hirose, M. (2005). Impact of maternal dietary exposure to endocrine-acting chemicals on progesterone receptor expression in microdissected hypothalamic medial preoptic areas of rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology* 208, 127-136.
- Takeuchi, S., Iida, M., Kobayashi, S., Jin, K., Matsuda, T., and Kojima, H. (2005). Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors alpha and beta, and androgen receptor. *Toxicology* 210, 223-233.
- Wada, H., Tarumi, H., Imazato, S., Narimatsu, M., and Ebisu, S. (2004). *In vitro* estrogenicity of resin composites. *Journal of Dental Research* 83, 222-226.
- Wagner, M., and Oehlmann, J. (2009). Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. *Environmental Science and Pollution Research International* 16, 278-286.
- Wagner, M. and Oehlmann, J. (2010). Endocrine disruptors in bottled mineral water: estrogenic activity in the E-Screen. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, in press.
- Zerbe, H. (2010). Mögliche gesundheitsrelevante Stoffe in abgefülltem Wasser
http://www.bfr.bund.de/cm/232/moegliche_gesundheitsrelevante_stoffe_in_abgefuehlt_em_wasser.pdf.