

## Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke von Seehunden für das Enantiomer (+)- $\alpha$ -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan und dessen absolute Konfiguration\*\*

Kattrin Möller, Cornelia Bretzke,  
Heinrich Hühnerfuss\*, Roland Kallenborn,  
Jochen N. Kinkel, Jürgen Kopf und Gerhard Rimkus

In den meisten Untersuchungen zum „Schicksal“ organischer Schadstoffe in marinen und terrestrischen Ökosystemen spielt  $\alpha$ -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan ( $\alpha$ -HCH) eine wichtige Rolle. Dies mag daran liegen, daß es nahezu überall auftritt und relativ persistent ist. In Westeuropa darf es zwar nicht mehr direkt im Gemisch mit dem Insektizid  $\gamma$ -Hexachlorcyclohexan ( $\gamma$ -HCH, Lindan) eingesetzt werden, aber in anderen Teilen Europas, besonders in osteuropäischen Staaten, dürfte es immer noch in dieser Anwendungsform in die Umwelt gelangen. Ferner ist für das marine Ökosystem eine zwar geringfügige, aber doch über längere Zeiträume nicht zu vernachlässigende Umwandlung von  $\gamma$ -HCH in  $\alpha$ -HCH durch marine Mikroorganismen gesichert<sup>[11]</sup>.

In den letzten beiden Jahren fand  $\alpha$ -HCH eine zusätzliche Beachtung in Prozeßstudien, weil es als einziges der acht denkbaren HCH-Isomere chiral ist und daher mit chiraler Gaschromatographie untersucht werden kann. Die inzwischen entwickelten Cyclodextrinphasen<sup>[2]</sup> ermöglichen es, zwischen enzymatischen und nichtenzymatischen Abbauprozessen zu unterscheiden<sup>[3]</sup>. Auf diese Weise konnten mikrobielle Abbauwege von  $\alpha$ -HCH im Nordseewasser und sein enzymatischer Abbau in marinen und terrestrischen Lebewesen unterschiedlicher trophischer Stufen verfolgt werden<sup>[3–5]</sup>. In der Leber der Eiderente wurde zum Beispiel ein bevorzugter Abbau von (–)- $\alpha$ -HCH nachgewiesen<sup>[6]</sup>.

Wir erhielten nun einen überraschenden Befund bei der Analyse des Hirngewebes von Seehunden (*Phoca vitulina*): In Hirnproben von acht isländischen Seehunden wurde nahezu ausschließlich (+)- $\alpha$ -HCH nachgewiesen (die Werte für die Enantiomerenverhältnisse (+)- $\alpha$ -HCH/(–)- $\alpha$ -HCH betrugen 55.6, 66.2 und sechsmal 100:0; Abb. 1). Demgegenüber wurden im

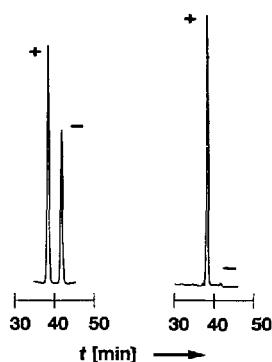


Abb. 1. Vergleich der Chromatogramme von *n*-Hexan-Extrakten des Fett- (links) und des Hirngewebes (rechts) eines Seehunds (*Phoca vitulina*). Versuchsbedingungen siehe Experimentelles.

[\*] Priv.-Doz. Dr. H. Hühnerfuss, Dipl.-Chem. K. Möller, Dr. R. Kallenborn  
Institut für Organische Chemie der Universität  
Martin-Luther-King-Platz 6, D-20146 Hamburg  
Telefax: Int. + 40/4123-2893

C. Bretzke, Priv.-Doz. Dr. J. Kopf

Institut für Anorganische und Angewandte Chemie der Universität Hamburg  
Dr. J. N. Kinkel  
Abt. FO REAG CHROM, Firma E. Merck  
Dr. G. Rimkus

Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt des Landes Schleswig-Holstein

[\*\*] Chromatographische Trennung von Enantiomeren chiraler organischer Schadstoffe, 7. Mitteilung. Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Forschung und Technologie gefördert. – 6. Mitteilung: [4].

Fettgewebe derselben Tiere lediglich Enantiomerenverhältnisse von 1.2 bis 1.4 erhalten. Dieser Befund ist insofern interessant, als vielfach die Hypothese vertreten wird, daß sich die Wirkung der Blut-Hirn-Schranke partiell auch auf bestimmte fettlösliche organische Schadstoffe erstreckt. Unter dem Begriff Blut-Hirn-Schranke werden normalerweise Mechanismen verstanden, die den Übergang vom Blutgefäß in das umgebende interstitielle Zellgewebe des Nervensystems (Glia) und des Kapillarendothels für *nicht*lipidlösliche Substanzen wie Proteine außerordentlich erschweren, um ein konstantes Milieu für die Neuronen sicherzustellen<sup>[7]</sup>. Die Atemgase Kohlendioxid und Sauerstoff können die Kapillarwandungen hingegen leicht passieren. Die genauen Mechanismen, insbesondere die selektive Hinderung des Eintritts bestimmter lipidlöslicher Schadstoffe ins Hirngewebe, bedürfen noch eingehender Untersuchungen. Strittig scheint ferner auch noch zu sein, ob die Schrankenwirkung durch Enzyme in den Endothelzellen ergänzt wird (Enzymschranke).

Im Falle der polychlorierten Biphenyle (PCB) wurden etwa um den Faktor zehn geringere Konzentrationen im Hirngewebe als in anderen Organen derselben Tiere gefunden<sup>[8]</sup>. Dieser bekannte Effekt wird ebenfalls oft der Blut-Hirn-Schranken-Wirkung zugeschrieben. Demgegenüber haben andere Autoren zeigen können, daß sich  $\alpha$ -HCH sehr wohl im Hirngewebe von Mäusen und Ratten<sup>[9]</sup> sowie Pelzrobben<sup>[10]</sup> anzureichern vermag. In den Hirnproben von Ratten<sup>[9a]</sup> und zweier Pelzrobben<sup>[10]</sup> wurden auch bereits Hinweise auf eine bevorzugte Anreicherung von (+)- $\alpha$ -HCH gefunden. Die systematischen Untersuchungen an acht isländischen Seehunden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigen, daß dieses Phänomen offenbar mindestens für wenig belastete isländische Tiere generalisiert werden kann. Ferner zeigen unsere Untersuchungen, daß  $\gamma$ -HCH in den Hirnproben derselben Tiere, ähnlich wie die PCBs, wesentlich geringere Konzentrationen als in den anderen Organen aufweist. Derart extreme Konzentrationsunterschiede zwischen  $\gamma$ -HCH und  $\alpha$ -HCH in Hirnproben im Vergleich zu Proben von anderen Organen, wie sie in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Seehunde, aber auch bereits von Mössner et al. für Pelzrobben<sup>[10]</sup> aufgefunden wurden, lassen sich nicht mit unseren bisherigen Erfahrungen mit enzymatischen und nichtenzymatischen Abbauprozessen von HCH-Isomeren in Einklang bringen. Daher deuten wir die enantioselektive Anreicherung von (+)- $\alpha$ -HCH im Hirngewebe der Seehunde weniger als Folge von enzymatischen Abbauprozessen, sondern vielmehr als eine „bevorzugte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke“ für (+)- $\alpha$ -HCH. Dabei ist natürlich nicht auszuschließen, daß in die gleiche Richtungweisende enzymatische Prozesse diesen Effekt verstärken.

Orientierende Untersuchungen von Eiderenten- und Schafshirnen wiesen ebenfalls auf eine bevorzugte Anreicherung von (+)- $\alpha$ -HCH hin und stützen damit die im Rahmen dieser Untersuchung erhaltenen Befunde<sup>[11]</sup>. Ein ähnlicher Schutzmechanismus wird auch für menschliche Lebewesen vermutet, eine systematische Untersuchung auf dieser trophischen Stufe steht jedoch noch aus.

Eine eingehendere Diskussion dieses Phänomens scheiterte bisher daran, daß die absoluten Konfigurationen der  $\alpha$ -HCH-Enantiomere nicht bekannt waren. Im ersten Schritt mußte eine geeignete Methode zur Trennung einer hinreichenden Menge an  $\alpha$ -HCH-Enantiomeren gefunden werden, die es ermöglicht, einen Einkristall zu züchten. Anschließend sollte mit einer Röntgenstrukturanalyse die absolute Konfiguration des (+)- $\alpha$ -HCH-Enantiomers bestimmt werden.

Versuche zur Trennung der  $\alpha$ -HCH-Enantiomere mit einer optisch aktiven Base, (+)-Brucin, nach der von Cristol beschriebenen Methode<sup>[12]</sup> erwiesen sich als sehr zeitraubend, ehe nach mehreren Wochen und mehrfachem Aufarbeiten des Re-

aktionsansatzes das  $(-)\alpha$ -HCH in 96 % Reinheit erhalten wurde. Das  $(+)\alpha$ -HCH-Enantiomer wurde bei dieser Vorgehensweise verbraucht und hätte eventuell durch Modifikation der Reaktion, also unter Einsatz des  $(-)$ -Enantiomers einer optisch aktiven Base, ganz analog hergestellt werden können.

Sehr viel eleganter waren beide  $\alpha$ -HCH-Enantiomere innerhalb von wenigen Stunden zugänglich, indem eine Trennung mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) unter Verwendung einer präparativen Säule mit der chiralen stationären Phase ChiraDex der Firma Merck durchgeführt wurde. Ein HPLC-Chromatogramm von  $\alpha$ -HCH, wie es mit dieser Phase auf einer analytischen Version dieser Säule erhalten wurde, ist in der Abbildung 2 abgebildet.

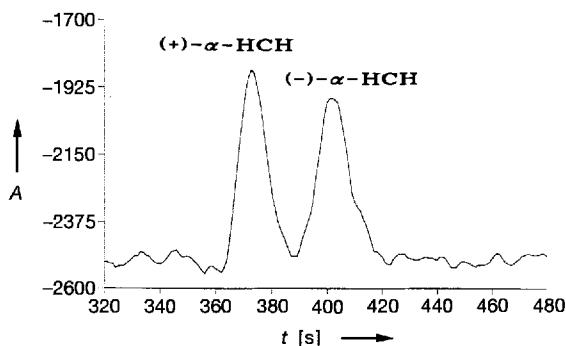


Abb. 2. HPLC-Chromatogramm (Absorption  $A$  gegen Zeit  $t$ ) zur Trennung von  $rac$ - $\alpha$ -HCH. Versuchsbedingungen siehe Experimentelles.

Mit einer präparativen ChiraDex-Säule 250-50 wurden nach fünf Cyclen etwa 20 mg an  $(+)\alpha$ -HCH mit einer Reinheit von  $\geq 99\%$  isoliert. Durch Umkristallisieren aus Ether bei 277 K wurden für die Röntgenstrukturanalyse geeignete Einkristalle dieses Enantiomers erhalten. Die in Abbildung 3 gezeigte SCHA-KAL-Darstellung gibt die auf diese Weise erhaltene Struktur von  $(+)\alpha$ -HCH wieder<sup>[13]</sup>. Nach den von Cahn, Ingold und Prelog vorgeschlagenen Prioritäten-Regeln und ihren Ergänzungen<sup>[14]</sup> kommt der absoluten Struktur von  $(+)\alpha$ -HCH damit die  $(+)-1S,2R,3R,4S,5S,6S$ -Hexachlorcyclohexan-Konfiguration zu.

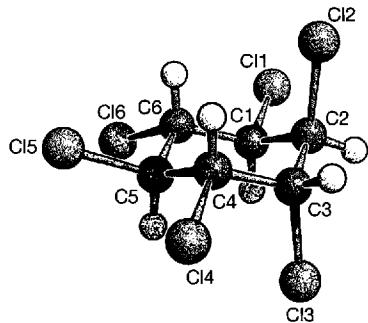


Abb. 3. Die Molekülstruktur von  $(+)\alpha$ -1S,2R,3R,4S,5S,6S-Hexachlorcyclohexan. Bindungslängen [pm] und ausgewählte Bindungswinkel [ $^\circ$ ]: Cl1-C1 178.3, Cl2-C2 179.3, Cl3-C3 178.5, Cl4-C4 179.3, Cl5-C5 178.5, Cl6-C6 178.8, C1-C2 152.3, C2-C3 151.6, C3-C4 152.8, C4-C5 152.1, C5-C6 153.1, C6-C1 151.7, alle C-H-Bindungslängen betrugen 98.0 pm; Cl1-C1-C2 110.0, Cl2-C2-C3 108.0, Cl3-C3-C4 112.0, Cl4-C4-C5 109.9, Cl5-C5-C6 109.8, Cl6-C6-C1 109.9.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, daß sich im Hirngewebe von Seehunden enantioselektiv  $(+)\alpha$ -1S,2R,3R,4S,5S,6S-Hexachlorcyclohexan anreichert. Nach dem bisher vorliegenden Datenmaterial nehmen wird an, daß die Blut-Hirn-Schranke von Seehunden enantioselektiv für dieses  $\alpha$ -HCH-Enantiomer

durchlässig ist. Ob auch andere Schadstoffe enantioselektiv die Blut-Hirn-Schranke zu passieren vermögen, ob vergleichbare Strukturelemente vonnöten sind und inwieweit dieser Befund auf alle Lebewesen höherer trophischer Stufe einschließlich des Menschen übertragbar ist, muß in nachfolgenden Arbeiten geklärt werden.

### Experimentelles

Die Aufarbeitung der Hirnproben (Homogenisierung, Extraktion, chromatographische Aufreinigung, Fraktionierung mit HPLC) erfolgte analog dem bereits früher für Eiderenten-Proben beschriebenen Verfahren [6]. Die  $\alpha$ -HCH-Fraktion wurde gaschromatographisch unter folgenden Bedingungen vermessen: Fused-silica-Kapillarsäule: 25 m, i.D. 0.25 mm, stationäre Phase 50 % Octakis(3-O-butyl-2,6-di-O-pentyl)- $\gamma$ -cyclodextrin und 50 % OV-1701, Carrier-Gas Helium 60 kPa, Vega-Gaschromatograph Carlo Erba, 2  $\mu$ L on-column-Injektion,  $^{63}\text{Ni}$ -ECD mit Stickstoff als Make-up-Gas.

Die HPLC-Trennung der  $\alpha$ -HCH-Enantiomere erfolgte auf der analytischen Säule LiChrocart 250-4 ChiraDex (5  $\mu$ m) der Firma Merck, Darmstadt, unter folgenden Bedingungen: Eluent MeOH/H<sub>2</sub>O 75/25 (v/v); Fließgeschwindigkeit 0.8 mL min<sup>-1</sup>; Druck 1.27  $\times$  10<sup>7</sup> Pa; Probenmenge 3  $\mu$ g  $rac$ - $\alpha$ -HCH; Probenschleife 200  $\mu$ L; Detektor Spektralphotometer. Mit der präparativen Säule 250-50 der gleichen stationären Phase wurden folgende Bedingungen eingehalten: Pumpe L-6200 der Firma Merck-Hitachi, ausgerüstet mit einem präparativen Pumpenkopf; Eluent MeOH/H<sub>2</sub>O 75/25 isokratisch; Fließgeschwindigkeit 15 mL min<sup>-1</sup>; Probenmenge jeweils 16.5–20 mg  $rac$ - $\alpha$ -HCH; nach fünfmaliger Probenaufgabe wurden insgesamt etwa 20 mg  $(+)\alpha$ -HCH mit einer Reinheit von  $\geq 99\%$  isoliert. Durch Umkristallisieren aus Ether bei 277 K wurden für die Röntgenstrukturanalyse geeignete Einkristalle dieses Enantiomers erhalten. Der Drchwert wurde in Hexanolösung mit einem Perkin-Elmer-Polarimeter 243 bestimmt ( $c = 2.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ):  $[\alpha]_D^{20} = 117.4$ .

CAS-Registry-Nummern:  $\alpha$ -HCH, 319-84-6;  $(\pm)\alpha$ -HCH, 60291-32-9;  $(+)$ - $\alpha$ -HCH, 119911-69-2;  $(-)$ - $\alpha$ -HCH, 119911-70-5.

Eingegangen am 28. Oktober,  
veränderte Fassung am 26. November 1993 [Z 6458]

- [1] H. Hühnerfuss, J. Faller, W. A. König, P. Ludwig, *Environ. Sci. Technol.* **1992**, 26, 2127–2133.
- [2] a) W. A. König, R. Krebber, P. Mischnik, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1989**, 12, 732–738; b) W. A. König, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1989**, 37, 471–476; c) V. Schurig, H.-P. Nowotny, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 969–986; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 939–957, zit. Lit.
- [3] H. Hühnerfuss, J. Faller, R. Kallenborn, W. A. König, P. Ludwig, B. Pfaffenberger, M. Oehme, G. Rimkus, *Chirality* **1993**, 5, 393–399, zit. Lit.
- [4] B. Pfaffenberger, H. Hühnerfuss, R. Kallenborn, A. Köhler-Günther, W. A. König, G. Krüner, *Chemosphere* **1992**, 25, 719–725.
- [5] H. Hühnerfuss, R. Kallenborn, *J. Chromatogr.* **1992**, 580, 191–214, zit. Lit.
- [6] R. Kallenborn, H. Hühnerfuss, W. A. König, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 328–329; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 320–321.
- [7] a) H. Greiling, A. M. Gressner, *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*, 2. Aufl., Schattauer, Stuttgart, **1989**, S. 860; b) A. Faller, *Der Körper des Menschen*, 9. Aufl., Thieme, Stuttgart, **1980**, S. 335.
- [8] a) K. Ronald, R. J. Frank, J. L. Dougan, R. Frank, H. E. Braun, *Sci. Total Environ.* **1984**, 38, 133–152; b) R. Kallenborn, *Untersuchungen von ausgewählten chlorierten Schadstoffen im ökologischen Umfeld der Eiderenten (Somateria mollissima (L.)) aus norddeutschen Küstengebieten*, Dissertation, Universität Hamburg, **1993**.
- [9] a) J. Portig, K. Stein, H. W. Vohland, *Xenobiotica* **1989**, 19, 123–130; b) W. Koransky, S. Ullberg, *Biochem. Pharmacol.* **1964**, 13, 1537–1538; c) E. Nakajima, H. Shindo, N. Kurihara, *Radioisotopes* **1970**, 19, 60–66.
- [10] S. Mössner, T. R. Spraker, P. R. Becker, K. Ballschmiter, *Chemosphere* **1992**, 24, 1171–1180.
- [11] K. Möller, H. Hühnerfuss, G. Rimkus, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1993**, 16, 672–673.
- [12] J. S. Cristol, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 1894.
- [13] Kristallstrukturanalyse von  $(+)\alpha$ -HCH: Raumgruppe  $P_{2}2_{1}2_{1}, a = 738.0(1), b = 805.3(1), c = 1802.5(2) \text{ pm}, V = 1071.25 \times 10^6 \text{ pm}^3, Z = 4$ , vermessener Kristall  $0.4 \times 0.4 \times 0.3 \text{ mm}^3$ , 293 K,  $\text{Cu}_K\text{-Strahlung}$ , Enraf-Nonius-CAD4-Diffraktometer, 2248 symmetrieeunabhängige Reflexe, Strukturlösung mit SHELXS-90, Strukturverfeinerung mit SHELXL-93,  $R = 0.0571$  für alle Reflexe und  $R = 0.0546$  für 2173 signifikante Reflexe  $[(F) > 4\sigma(F)]$ , Flack-Parameter:  $x = -0.02(4)$ . Weitere Einzelheiten zur Kristallstrukturanalyse können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, unter Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-400418 angefordert werden.
- [14] a) R. S. Cahn, C. K. Ingold, V. Prelog, *Experientia* **1956**, 12, 81–124; b) *Angew. Chem.* **1966**, 78, 413–447; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1966**, 5, 385–415; c) V. Prelog, G. Helmchen, *ibid.* **1982**, 94, 614–631 bzw. **1982**, 21, 567–583.