

Belastung der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland durch amino- und nitroaromatische Verbindungen

Abschlussbericht (PUG U97009)

Tobias Weiß und Jürgen Angerer

Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg, Schillerstraße 25/29, 91054 Erlangen.

März 2001

Wir danken Prof. Dr. U. Ewers vom Hygiene-Institut des Ruhrgebiets und Frau Dr. A. Flieger vom Hygiene-Institut der Universität Bochum für die Organisation eines Teils der Kollektive.



IPASUM Erlangen

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen	3
1 Einleitung	5
1.1 Zielsetzung und methodischer Ansatz	5
2 Stand der Kenntnisse	6
2.1 Metabolismus von aromatischen Aminen und Nitroverbindungen	6
2.1.1 Hämoglobinaddukte	7
2.2 Parameter	8
3 Material und Methoden	9
3.1 Methode zur Bestimmung von 2,4-Dinitrobenzoesäure im Harn	11
3.1.1 Grundlage des Verfahrens	11
3.1.2 Probenvorbereitung	11
3.1.3 Gaschromatographische Arbeitsbedingungen	12
3.1.4 Zuverlässigkeitskriterien	13
3.2 Methode zur Bestimmung von Nitro- und Aminonitroaromaten	14
3.2.1 Methode A: Bestimmung der nicht konjugiert vorliegenden sprngstofftypischen Amino/Nitroaromaten	14
3.2.2 Probenvorbereitung Methode A	14
3.2.3 Methode B: Bestimmung von sprengstofftypischen Amino/Nitroaromaten nach Hydrolyse	14
3.2.4 Probenvorbereitung Methode B	14
3.2.5 Zuverlässigkeitskriterien	15
3.2.6 Gaschromatographische Arbeitsbedingungen	15
3.3 Sammelmethode zur Bestimmung von nitroaromatischen Verbindungen im Harn	17
3.3.1 Grundlagen der Verfahrens	17
3.3.2 Probenvorbereitung	17
3.3.3 Gaschromatographische Arbeitsbedingungen	18
3.3.4 Zuverlässigkeitskriterien	19
3.4 Methode zur Bestimmung von Moschus-Xylol in Plasma	20
3.4.1 Grundlage des Verfahrens	20
3.4.2 Probenvorbereitung	20
3.4.3 Gaschromatographische Arbeitsbedingungen	21
3.4.4 Zuverlässigkeitskriterien	21
3.5 Methode zur Bestimmung von nitroaromatischen Addukten an Hämoglobin	22
3.5.1 Grundlagen der Verfahrens	22
3.5.2 Probenvorbereitung	22
3.5.3 Gaschromatographische Arbeitsbedingungen	24
3.5.4 Zuverlässigkeitskriterien	25
3.6 Untersuchte Bevölkerungsgruppen und Kollektive	25
3.6.1 Normalpersonen aus städtischen Gebieten	25
3.6.2 Normalpersonen aus ländlichen Gebieten	25
3.6.3 Bewohner Rüstungsaltslasten	26
3.6.4 Berufliche Belastung	26
3.6.5 Moschus-Xylolkollektive (Normalpersonen)	26
4 Untersuchungsergebnisse	27
4.1 Renale Ausscheidung von Metaboliten der Nitroaromaten	27
4.1.1 2,4-Dinitrobenzoesäure im Urin beruflich belasteter Personen	27

4.1.2	Nitro- und Aminonitroaromaten im Urin beruflich belasteter Personen	27
4.1.3	Nitroaromaten-Screening im Urin bei Personen der Allgemeinbevölkerung	28
4.1.4	Moschus-Xylol im Plasma von Personen der Allgemeinbevölkerung	30
5	Ergebnisdiskussion	30
5.1.1	Sprengstofftypische Nitroaromaten und deren Metaboliten	30
5.1.2	Moschus-Xylol in der Allgemeinbevölkerung	32
5.1.3	Aromatische Amino- und Nitroverbindungen in der Allgemeinbevölkerung	32
6	Ausblick	36
7	Literatur	37

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

1-NA = 1-Naphtylamin, α -Naphtylamin
 2,4,6-TNT = 2,4,6-Trinitrotoluol
 2,4-DNB = 2,4-Dinitrobenzol
 2,4-DNBA = 2,4-Dinitrobenzoesäure
 2,4-DNT = 2,4-Dinitrotoluol
 2,6-DNB = 2,6-Dinitrobenzol
 2-A-4,6-DNT = 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol
 2-A-4-NT = 2-Amino-4-Nitrotoluol
 2-A-6-NT = 2-Amino-6-Nitrotoluol
 2-NA = 2-Naphtylamin, β -Naphtylamin
 3,5-DcIA = 3,5-Dichloranilin
 4-A-2,6-DNT = 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol
 4-A-2-NT = 4-Amino-2-Nitrotoluol
 4-A-5-NT = 4-Amino-5-Nitrotoluol
 4-ADP = 4-Aminodiphenyl
 ANTs = Aminonitrotoluole
 ATs = Aminotoluole
 Et₂O = Diethylether
 EtOH = Ethanol
 g = Erdbeschleunigung
 Hb = Hämoglobin
 HFBA = Heptafluorbuttersäureanhydrid
 I.S. = interner Standard
 MeOH = Methanol
 MES = 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
 m-T = m-Toluidin
 MX = Moschus-Xylol
 NAs = Naphtylamine
 NB = Nitrobenzol
 o-T = o-Toluidin
 PFFA = Pentafluorpropansäureanhydrid
 p-T = p-Toluidin
 TNT = 2,4,6-Trinitrotoluol



Kurzbeschreibung des Projekts

Obwohl aromatische Nitro- und Aminoverbindungen in der Regel nur Zwischenprodukte der chemischen Industrie darstellen, scheint der Mensch in größerem Umfang als bisher angenommen mit diesen Stoffen in Berührung zu kommen. Aufgrund der mutagenen Eigenschaften einiger dieser Stoffe ist dies auch von großer umweltmedizinischer Bedeutung.

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurden verschiedene Bevölkerungsgruppen auf ihre innere Belastung durch Amino- bzw. Nitroaromaten und deren Metaboliten untersucht. Neben Probanden aus städtischen (N=100) und ländlichen (N=101) Gebieten stellten sich Bewohner zweier Rüstungsalblastenstandorte (N=63) und Personen, die beruflichen Umgang mit sprengstofftypischen Nitroaromaten hatten (N=82), zur Verfügung. Bei den Untersuchungsparametern handelt es sich um Anilin, Nitrobenzol, Toluidine, Nitrotoluole, Dinitrotoluole, Trinitrotoluol, 3,5-Dichloranilin und Xylol-Moschus. Die renale Ausscheidung der Stoffwechselprodukte dieser Verbindungen wird über ein Biologisches Monitoring erfasst, während sog. Hämoglobin-Addukte mittels biochemischem Effekt-Monitoring bestimmt werden. Hierzu waren neue, quantitativ analytische Verfahren zu entwickeln. Die Ergebnisse des Biologischen Monitorings (renale Ausscheidung) werden diskutiert.

Short description of project

Although aromatic nitro and amino compounds are normally used as intermediates in chemical industry, the human population seems to be exposed in a greater extent as suspected so far. Due to the mutagenic properties of several aromatic nitro and amino compounds this is of important interest in environmental medicine.

Within this study we examine miscellaneous sections of the population concerning their body burden of amino and nitro aromatics and their metabolites. Urban (N=100) and rural (N=101) people as well as residents of inherited military waste sites (N=63) and persons occupationally exposed to aromatic nitro compounds (N=82) declared themselves willing to participate the study. Parameters of interest are aniline, nitrobenzene, toluidines, nitrotoluenes, dinitrotoluenes, trinitrotoluene, 3,5-dichloroaniline, musk xylene and their main metabolites. The renal excretion of the metabolites is examined using Biological Monitoring, whereas hemoglobine adducts will be quantified applying Biochemical Effect Monitoring. Therefore new analytical methods had to be developed. The results of Biological Monitoring (renal excretion) are discussed.



1 Einleitung

Aromatischen Nitro- und Aminoverbindungen kommen seit über 100 Jahren Schlüsselstellungen in der organischen Chemie zu. Aromatische Nitroverbindungen werden durch Nitrierung hergestellt, wobei ein oder mehrere Wasserstoffatome des Arylringsystems durch Nitrogruppen ersetzt werden. In die entstandenen Nitroaromaten kann nachfolgend eine Vielzahl möglicher Substituenten eingefügt werden wie z. B. Alkyl-, Sulfonsäure-, Amino-, Hydroxyl- und auch Halogen-Gruppen. Dadurch ist eine große Zahl von Substanzen zugänglich, die u.a. als Struktureinheiten aromatische Amine und aromatische Nitrogruppen (bzw. Derivate davon) enthalten und Anwendung finden als Farbstoffe, Pflanzenschutzmittel, Pharmaka, Kunststoffe sowie auch als Explosivstoffe. Darüber hinaus werden Nitroverbindungen wie z.B. Moschus-Xylol als Duftstoffe zu Kosmetika eingesetzt und finden wegen ihrer Persistenz Verbreitung in der Umwelt. Aromatische Amine und Nitroverbindungen können in vivo ineinander umgewandelt werden.

Obwohl Nitro- und Aminoaromaten in der Regel keine Endprodukte der chemischen Industrie darstellen, zeigen neuere Untersuchungen, dass eine Reihe von Nitroaromaten bzw. deren Metaboliten im Harn von Normalpersonen ausgeschieden werden [ANGERER et al. 1994, HEUDORF & PETERS 1994, NEUMANN et al. 1995]. Herkunft und Quellen sind noch weitestgehend unbekannt. Diese Untersuchungen lassen darauf schließen, dass der Mensch in größerem Umfang als bisher angenommen mit aromatischen Nitro- bzw. Aminoverbindungen in Kontakt kommt. Dies ist aufgrund der Toxizität und des mutagenen Potentials von großer arbeitsmedizinischer und umweltmedizinischer Relevanz. So wurden beispielsweise vor kurzem Anilin und o-Toluidin in der Muttermilch kanadischer Frauen gefunden [DeBRUIN et al. 1999]. Auch der weit verbreitete Sprengstoff 2,4,6-Trinitrotoluol und die bei seiner Produktion anfallenden Dinitrotoluole erlangen arbeitsmedizinische Bedeutung bei Produktion und Entsorgung von Munition. Mit der Wiedervereinigung Deutschlands fielen beispielsweise 300.000 t Munition zur Entsorgung an [ASCHE & RICHARD 1994]. Daneben stellen diese Stoffe ein großes umweltmedizinisches Altlastenproblem in der Bundesrepublik Deutschland dar. Wie viele Menschen auf ehemaligen Sprengstoffproduktionsanlagen oder Truppenübungsplätzen mit kontaminierten Böden leben, ist noch unklar.

Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang, dass aromatische Nitro- und Aminoverbindungen im Allgemeinen gut über die Haut aufgenommen werden.

1.1 Zielsetzung und methodischer Ansatz

Zweck dieser Untersuchung ist zu klären, ob und in welchem Umfang die Allgemeinbevölkerung der Bundesrepublik Deutschland Nitro- bzw. Aminoaromaten ausgesetzt ist.

Im Rahmen dieser Studie werden daher die Konzentrationen verschiedener Nitroaromaten in Blut, deren Metabolite in Urin sowie die diesbezüglichen Hämoglobinaddukte im Blut von Probanden verschiedener Bevölkerungsgruppen über ein sog. „Biological Monitoring“ quantitativ bestimmt. Mittels Fragebogen wurden die Lebens- und Ernährungsgewohnheiten der Probanden sowie andere expositionsrelevante Begleitumstände erfasst.



Im einzelnen werden folgende Bevölkerungsgruppen bezüglich ihrer Nitro- und Aminoaromatenbelastung untersucht:

- Normalpersonen unterschiedlichen Alters aus urbanen Gebieten
- Normalpersonen unterschiedlichen Alters aus ländlichen Gebieten
- Personen, die im Bereich von Rüstungsaltslastenstandorten mit zum Teil erheblichen Bodenverunreinigungen wohnen
- Personen, die beruflich gegenüber Nitroaromaten exponiert sind.

Ursprünglich sollte sich der Focus der zu untersuchenden Substanzen auf die sprengstofftypischen Nitroaromaten (2,4,6-Trinitrotoluol, Dinitrotoluole, etc.) und deren Metaboliten richten. Im Laufe der Arbeiten stellte sich jedoch heraus, dass vielmehr mit einer Belastung der Allgemeinbevölkerung aus anderen Quellen zu rechnen ist. Das Untersuchungsspektrum wurde daher um verschiedene Monoaminoaromaten (Toluidine, 3,5-Dichloranilin) erweitert.

2 Stand der Kenntnisse

2.1 Metabolismus von aromatischen Aminen und Nitroverbindungen

Eine Hauptroute der Verstoffwechslung von aromatischen Nitroverbindungen ist die Reduktion einer Nitrofunktion. Nitroreduktasen der Leber reduzieren die unverändert aufgenommenen Nitroaromaten zu Nitrosoaromaten und N-Hydroxy-arylaminen. Alle Zwischenprodukte werden weiter bis zu den entsprechenden Aminoaromaten reduziert, die u. a. nach Acetylierung über den Harn eliminiert werden können. Auch eine Reduktion von Nitroaromaten durch Mikroorganismen im Darm nach oraler Aufnahme wird diskutiert.

Die aus Nitroaromaten entstandenen aromatischen Amine werden in Abhängigkeit von ihrer Menge, der Verteilungsgeschwindigkeit im Organismus und dem Polymorphismus der beteiligten Enzyme über unterschiedliche Stoffwechselwege wieder ausgeschieden. Aminoaromaten werden im allgemeinen durch N-Acetyltransferasen acetyliert und somit harngängig gemacht. Mit zunehmender Aminoaromatendosis steigt neben der acetylierten Form des Amins unter Wirkung mischfunktioneller Oxidasen auch die Konzentration von Hydroxyarylaminen und Hydroxy-N-acetylarylaminen. Die im ersten Schritt entstehenden N-Hydroxyarylamine werden unter anderem in den Erythrozyten zu Nitrosoaromaten oxidiert. Diese führen dann zur Bildung von Met-Hb. Außerdem bilden sie an der Thiofunktion des Cysteins des Hämoglobins Addukte in Form von Sulfinsäureamiden. Da im Körper Nitrosoaromaten wieder zu N-Hydroxyarylaminen reduziert werden können, kann der Zyklus der Met-Hb-Bildung so mehrfach durchlaufen werden.

Während Nitrobenzolen neben Reaktionen am aromatischen Ringsystem nur der reduktive Stoffwechselweg zum Amin offen steht, können Nitrotoluole auch eine oxidative Stoffwechselkaskade durchlaufen. Hier wird die Methyl-Seitenkette schrittweise über Benzylalkohol und Benzaldehyd zur entsprechenden Säurefunktion oxidiert. Es entsteht eine Nitrobenzoesäure als Endprodukt dieses Phase-I-Metabolismus, die teilweise konjugiert mit dem Urin ausgeschieden wird. Im Urin beruflich mit Dinitrotoluolen belasteter Arbeiter wurde 2,4-Dinitrobenzoesäure als Hauptmetabolit identifiziert [WOOLEN et al. 1985, BADER et al. 1996].

Als jeweilige ultimative Karzinogene werden die Hydroxylaminderivate angesehen. Die Einstufung in Kategorien krebserregender Arbeitsstoffe der untersuchten Parameter ist der



Tabelle 1 zu entnehmen. Ein vereinfachtes Metabolismusschema ist in Abbildung 1 dargestellt.

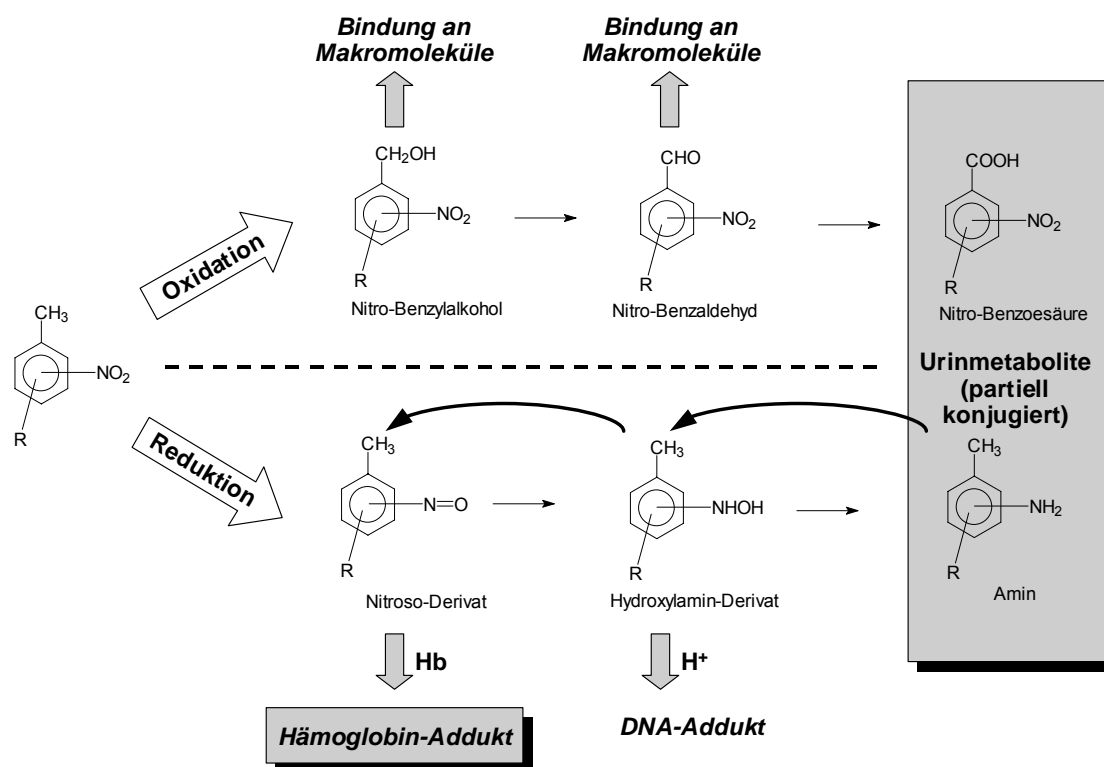


Abbildung 1: Vereinfachtes Metabolismus-Schema von Nitroaromaten im Säugetierorganismus. Die grau hinterlegten Verbindungen werden im Rahmen dieser Arbeit quantitativ analytisch erfasst

2.1.1 Hämoglobinaddukte

Die durch das Cytochrom-P450-Monooxygenase-Enzymsystem zum Nitrosoderivat aktivierten aromatischen Amine können mit den endständigen Thiofunktionen des Cysteins des Hämoglobins (Hb) Addukte in Form von Sulfinsäureamiden bilden [RINGE et al.1988]. Da im Allgemeinen die Konzentrationen aromatischer Amine *in vivo* sehr gering sind, kann man bzgl. der Adduktbildung (DNA, Hb, etc.) Reaktionskinetiken pseudo-erster Ordnung erwarten. Ein Vergleich der Adduktbildung an DNA und Hämoglobin ist zulässig, da unter diesen Bedingungen das Verhältnis der Produktbildungsraten (DNA:Hb) und das Verhältnis der Reaktionskonstanten (DNA:Hb) gleich ist. Hämoglobinaddukte können somit als Surrogate für DNA-Addukte herangezogen werden.

Dazu muss das jeweilige Hb-Addukt jedoch noch weitere Bedingungen erfüllen [SKIPPER & TANNENBAUM 1990, TØRNQVIST & LANDIN 1995]

- 1) Das Addukt muss unter biologischen Bedingungen stabil sein
- 2) Die Lebenszeit des Proteins *in vivo* sollte durch die Adduktbildung nicht beeinflusst werden.

Lars Ehrenberg und Mitarbeiter waren die ersten, die das Potential von Proteinaddukten als Surrogat für DNA-Addukte erkannten [EHREBERG et al.1974]. Diese Arbeitsgruppe leitete im Tierexperiment eine mathematische Beziehung zwischen der kontinuierliche Exposition gegenüber einem alkylierenden Agens und dem „steady-state“ Adduktlevel her.

Beim Menschen beträgt die Lebenszeit von Erythrozyten und Hämoglobin ca. 120 Tage. Die Altersverteilung ist homogen.

Wenn also ein chemisch und biologisch stabiles Hb-Addukt gebildet wird und die Exposition gegenüber dem adduktbildenden Agens konstant ist, dann wird die Adduktmenge proportional zum Alter des Hämoglobins sein. Das heißt, die Adduktkonzentration von Hb-Molekülen, die 120 Tage alt sind, wird 120 mal größer sein, als diejenige von Hb-Molekülen, die nur einen Tag alt sind. Da die Anzahl der 120 Tage alten Erythrozyten genauso groß ist wie der einen Tag alten Erythrozyten (homogene Altersverteilung), folgt daraus, dass die mittlere Adduktkonzentration im Menschen der ca. 60fachen Menge entspricht, die von einer Eintagesdosis gebildet wird.

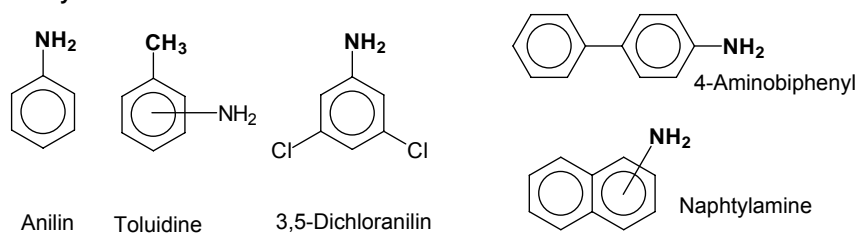
Auch wenn die tägliche Dosis nicht konstant ist, oder die Exposition unterbrochen erfolgt, entspricht die Adduktmenge dem 60fachen der durchschnittlichen Dosis der letzten 120 Tage. Das biochemische Effektmonitoring von Hb reflektiert somit eine 4monatige durchschnittliche Exposition.

Es gilt allerdings zu beachten, dass nicht alle carcinogenen aromatischen Amine Addukte bilden, die so stabil sind, dass ihre Lebenszeit *in vivo* derjenigen unveränderter Erythrozyten entspricht [NEUMANN 1984].

2.2 Parameter

Das Untersuchungsspektrum für die oben genannten Bevölkerungsgruppen umfasst folgende Parameter:

Lifestyle and Environment:



Sprengstofftypische Amino/Nitroaromaten:

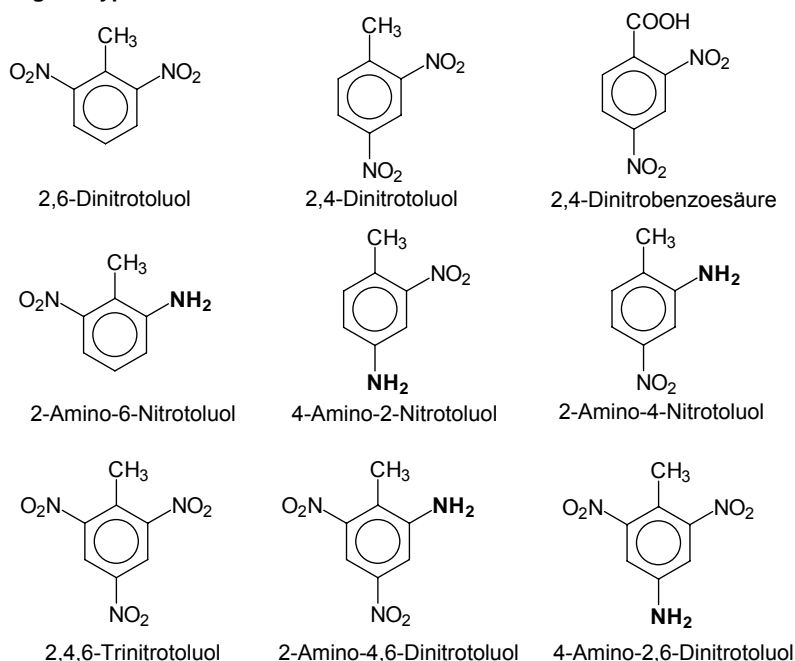


Abbildung 2: Untersuchungsparameter



Untersuchungsparameter	Muttersubstanz	Methode
Harn		
Anilin (3)/Nitrobenzol	Anilin (3)	Methode in Abschnitt 3.3
o-Toluidin (2)	2-Nitrotoluol (2)	Methode in Abschnitt 3.3
m-Toluidin	3-Nitrotoluol	Methode in Abschnitt 3.3
p-Toluidin (3)	4-Nitrotoluol	Methode in Abschnitt 3.3
2-Amino-4-Nitrotoluol (2)	2,4-Dinitrotoluol (2)	Methode in Abschnitt 3.2
4-Amino-2-Nitrotoluol	2,4-Dinitrotoluol (2)	Methode in Abschnitt 3.2
2-Amino-6-Nitrotoluol	2,6-Dinitrotoluol (2)	Methode in Abschnitt 3.2
2,4-Dinitrotoluol (2)	2,4-Dinitrotoluol (2)	Methode in Abschnitt 3.2
2,6-Dinitrotoluol (2)	2,6-Dinitrotoluol (2)	Methode in Abschnitt 3.2
2,4-Dinitrobenzoesäure	2,4-Dinitrotoluol (2)	Methode in Abschnitt 3.1
2,4,6-Trinitrotoluol (3)	2,4,6-Trinitrotoluol (3)	Methode in Abschnitt 3.2
4-Amino-2,6-Dinitrotoluol	2,4,6-Trinitrotoluol (3)	Methode in Abschnitt 3.2
2-Amino-4,6-Dinitrotoluol	2,4,6-Trinitrotoluol (3)	Methode in Abschnitt 3.2
4-Aminodiphenyl (1)	4-Aminodiphenyl (1)	Methode in Abschnitt 3.3
α -Naphthylamin	α -Naphthylamin	Methode in Abschnitt 3.3
β -Naphthylamin (1)	β -Naphthylamin (1)	Methode in Abschnitt 3.3
Blut		
Moschus-Xylol	Moschus-Xylol	Methode in Abschnitt 3.4
Hb-Addukte		
Anilin (3)/Nitrobenzol	Anilin (3)	Methode in Abschnitt 3.5
o-Toluidin (2)	2-Nitrotoluol (2)	Methode in Abschnitt 3.5
m-Toluidin	3-Nitrotoluol	Methode in Abschnitt 3.5
p-Toluidin (3)	4-Nitrotoluol	Methode in Abschnitt 3.5
2-Amino-4-Nitrotoluol (2)	2,4-Dinitrotoluol (2)	Methode in Abschnitt 3.5
4-Amino-2-Nitrotoluol	2,4-Dinitrotoluol (2)	Methode in Abschnitt 3.5
2-Amino-6-Nitrotoluol	2,6-Dinitrotoluol (2)	Methode in Abschnitt 3.5
4-Aminodiphenyl (1)	4-Aminodiphenyl (1)	Methode in Abschnitt 3.5
α -Naphthylamin	α -Naphthylamin	Methode in Abschnitt 3.5
β -Naphthylamin (1)	β -Naphthylamin (1)	Methode in Abschnitt 3.5

Tabelle 1: Untersuchungsparameter, die Zahlen in Klammern geben die Einstufung in die Kategorien „Krebserzeugender Arbeitsstoffe“ nach DFG wieder

3 Material und Methoden

Sämtliche Chemikalien lagen in den bestmöglichen Reinheitsgraden vor. Genauerer Angaben zu Materialien und Methoden sind den entsprechenden Literaturstellen zu entnehmen.

Abbildung 3 zeigt Schemata der analytischen Methoden zum biologischen Monitoring von Nitroaromaten im Harn. Schemata zur Analyse von Moschus-Xylol aus Plasma und



Hämoglobinaddukten aromatischer Amino- und Nitroverbindungen sind Abbildung 4 zu entnehmen.

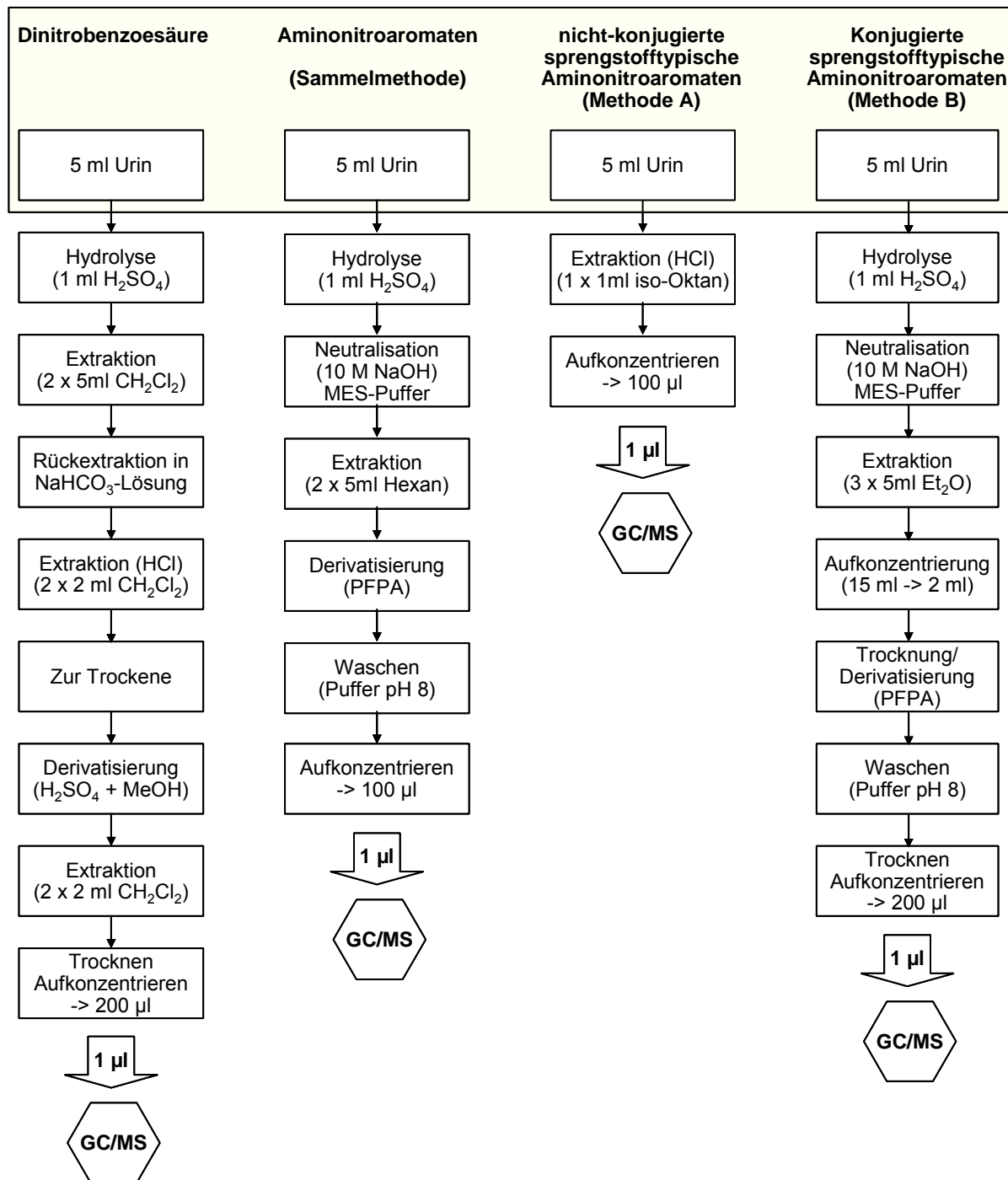


Abbildung 3: Flussdiagramm Biomonitoringverfahren aus Urin (MeOH = Methanol, PFPA = Pentafluorpropansäureanhydrid, MES = 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

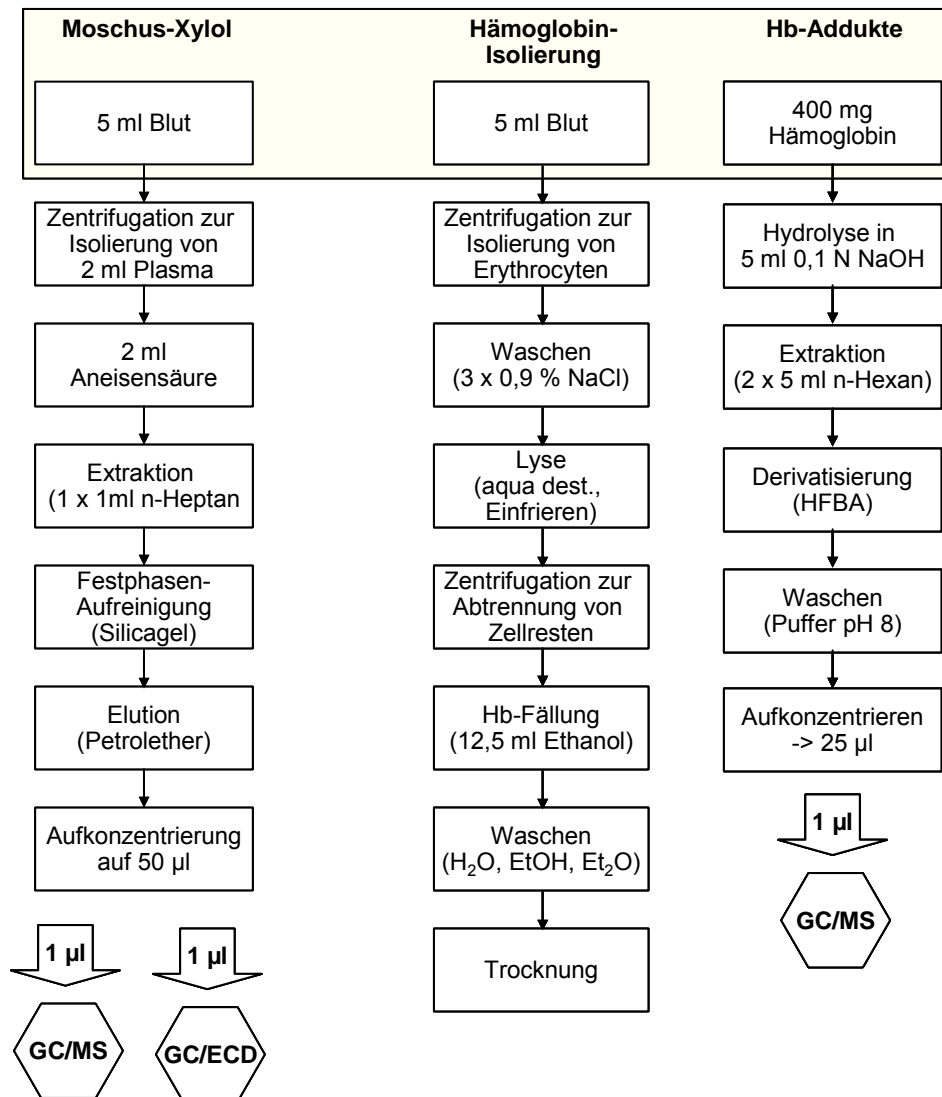


Abbildung 4: Flussdiagramm Biomonitoringverfahren aus Blut (EtOH = Ethanol, Et₂O = Diethylether, HFBA = Heptafluorbuttersäureanhydrid)

3.1 Methode zur Bestimmung von 2,4-Dinitrobenzoesäure im Harn

Siehe auch ANGERER & WEISMANTEL 1998.

3.1.1 Grundlage des Verfahrens

Nach einer sauren Hydrolyse von 5 ml Harn wird der Analyt durch pH-Wert-gesteuerte Extraktionen zwischen Harn, Dichlormethan, Wasser und wiederum Dichlormethan isoliert. Die Derivatisierung erfolgt nach Trocknung mit einem Methanol-Schwefelsäure-Gemisch. Nach Extraktion in Dichlormethan wird der Analyt kapillargaschromatographisch getrennt und massenspektroskopisch detektiert.

3.1.2 Probenvorbereitung

5 ml Urin werden mit 200 µl des internen Standards (3,5-Dinitrobenzoesäure in Wasser, 1 mg l⁻¹) und 1 ml konzentrierte Schwefelsäure (95 – 97%) versetzt und für



1 Stunde bei 90 °C in einem Trockenschrank inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 500 mg Natriumchlorid hinzugefügt und 2 mal mit je 5 ml Dichlormethan für 10 min in einem Laborschüttler flüssig/flüssig extrahiert und 5 min bei 1.500 g zentrifugiert. Die vereinten organischen Phasen werden anschließend mit 1 ml einer 0,01 molaren Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt, erneut 10 min geschüttelt und 5 min bei 1.500 g zentrifugiert. Die organische Phase wird abgehoben und verworfen. Die wässrige Phase wird nun angesäuert, mit 500 mg Natriumchlorid versetzt und erneut 2 mal mit je 2 ml Dichlormethan extrahiert (10 min schütteln und 5 min bei 1.500 g zentrifugieren). Die vereinten organischen Phasen werden anschließend vorsichtig im Stickstoffstrom zur Trockene gebracht. Der Rückstand wird in 1 ml 98%iger Schwefelsäure aufgenommen und mit 3 ml Methanol für 1 Stunde bei 75 °C in einem Wasserbad zur Derivatisierung inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur werden 1 ml einer gesättigten Kochsalzlösung und 5 ml Wasser hinzugefügt und die Proben 2 mal mit je 2 ml Dichlormethan am Laborschüttler (10 min) extrahiert und bei 1.500 g zentrifugiert (5 min). Die organischen Phasen werden abgehoben und 10 min über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird in ein 5 ml Schraubgläschen transferiert, das Natriumsulfat mit 500 µl Dichlormethan nachgewaschen und dieses Lösungsmittel ebenfalls in das Schraubgläschen überführt. Die organische Lösung wird anschließend vorsichtig im Stickstoffstrom auf ca. 200 µl eingeeengt und zur quantitativen Analyse mittels GC/MS in ein Microvial überführt.

3.1.3 Gaschromatographische Arbeitsbedingungen

Kapillarsäule:	Material:	Quarz
	Stationäre Phase:	Phenylmethylpolysiloxan (BPX-35)
	Länge:	60 m
	Innerer Durchmesser:	0,22 mm
	Filmdicke:	0,25 µm
Detektor:	massenselektiver Detektor (MSD)	
Ionisierungsenergie:	70 eV	
Multiplierspannung:	2400 V	
Temperaturen:	Säule:	90 °C, 1 Minute isotherm; dann Anstieg 6 °C pro Minute bis 220 °C; isotherm für 15 Minuten; Anstieg auf 270 °C mit 15 °C pro Minute; 15 Minuten isotherm bei Endtemperatur
	Injektor:	260 °C
	Detektor:	300 °C
Trägergas:	Helium 5.0 mit constant flow 0,8 ml pro Minute	
Probenmenge:	1 µl	
Split:	splitless	
Retentionszeiten:	34,0 Minuten 2,4-Dinitrobenzoesäure 34,8 Minuten 3,5-Dinitrobenzoesäure (I.S.)	



SIM: 2,4-Dinitrobenzoesäure und 3,5-Dinitrobenzoesäure:
 Quantifier [m/z]: 195
 Qualifier [m/z]: 226, 196, 149

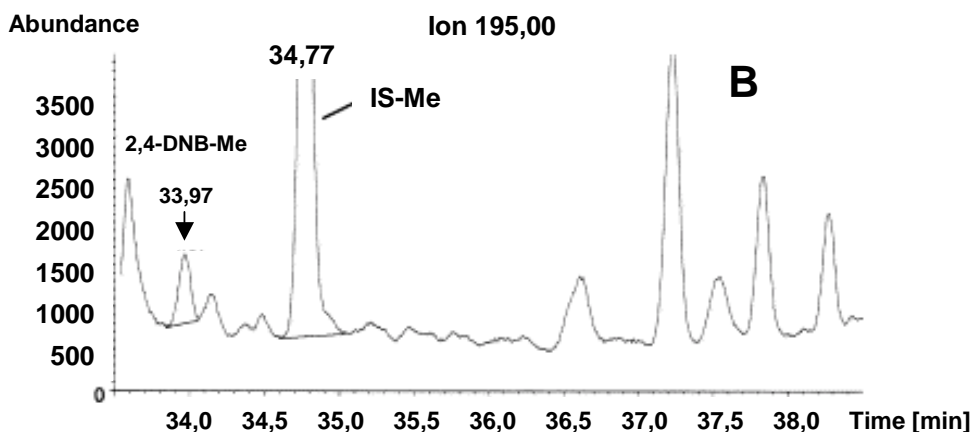
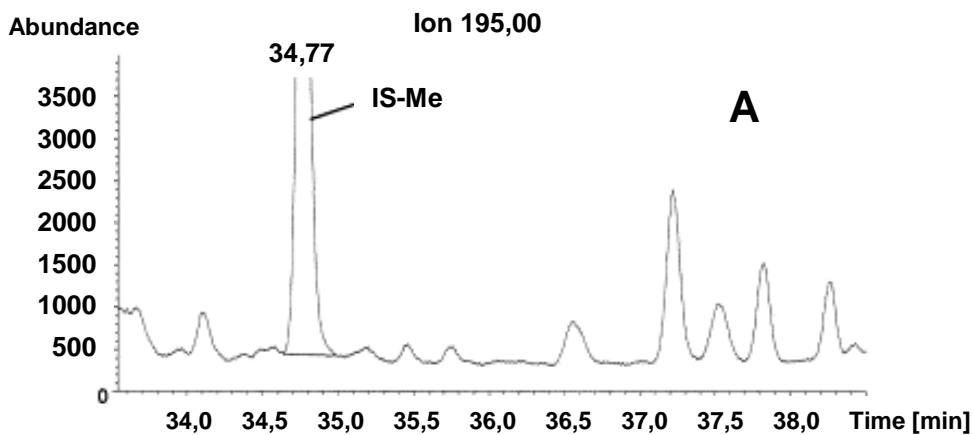


Abbildung 5: Beispielchromatogramm eines unbelasteten Poolurins (A) und eines mit 5,0 µg/l 2,4-DNBA belasteten Urins eines 2,4-DNT-exponierten Arbeiters (B)

3.1.4 Zuverlässigkeitskriterien

<i>Nachweisgrenze 1 µg/l</i>		<i>Konzentration</i>	<i>N</i>
<i>Präzision in der Serie</i>	4,8%	20 µg/l	7
	4,5%	100 µg/l	7
<i>Belasteter Urin</i>	5,9%	38 µg/l	7
	<i>Präzision von Tag zu Tag</i>	17,6 µg/l	12
<i>Wiederfindung</i>	112% ± 5,3%	17,6 µg/l	7
	94 ± 3,5 %	88,0 µg/l	7
<i>Individual</i>	79% – 10%	70,4 µg/l	
	90,7% ± 8,3 %		

Tabelle 2: Zuverlässigkeitskriterien der 2,4-DNBA-Analytik



3.2 Methode zur Bestimmung von Nitro- und Aminonitroaromaten

Siehe auch BADER et al. 1998.

3.2.1 Methode A: Bestimmung der nicht konjugiert vorliegenden sprngstofftypischen Amino/Nitroaromaten

Nach einer Extraktion aus 5 ml Harn in iso-Oktan werden die Analyten ohne Derivatisierung kapillargaschromatographisch getrennt und massenspektroskopisch detektiert.

3.2.2 Probenvorbereitung Methode A

5 ml Urin werden mit 100 µl internen Standard (^{13}C -Nitrobenzol in Methanol, $1,5 \text{ mg l}^{-1}$), 1,5 g Natriumchlorid und 500 µl konzentrierter Salzsäure versetzt. Die Proben werden mit 1 ml iso-Oktan durch Schütteln am Vortex-Mixer 1 Minute flüssig/flüssig extrahiert und anschließend 5 Minuten bei 1.500 g zentrifugiert. Die organische Phase wird abgehoben, in ein 1,5 ml Gläschen überführt, im Stickstoffstrom vorsichtig auf ca. 100 µl eingengt und zur anschließenden quantitativen Analyse mittels GC/MS in ein Microvial überführt.

3.2.3 Methode B: Bestimmung von sprengstofftypischen Amino/Nitroaromaten nach Hydrolyse

Nach einer sauren Hydrolyse von 5 ml Harn werden die Analyten durch pH-Wert-gesteuerte Extraktionen zwischen Harn und Diethylether isoliert. Nach einem Trocknungsschritt werden die Analyten mit Pentafluorpropansäureanhydrid derivatisiert und nach einem Waschschrift mit anschließender Trocknung kapillargaschromatographisch getrennt und massenspektroskopisch detektiert.

3.2.4 Probenvorbereitung Methode B

5 ml Urin werden mit 100 µl internem Standard (4-Amino-3,5-dinitrotoluol in Wasser, 5 mg l^{-1}) und 1 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Die Proben werden anschließend 1 Stunde bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Eisessig werden die Proben in einem Eis/Wasser-Bad gekühlt und unter ständigem Umschwenken mit 3,4 ml 10 molarer Natronlauge (3 x 1 ml + 1 x 400 µl), gefolgt von 8 ml MES-Puffer (pH 6, 0,25 M: 53,6 MES + 1000 ml H_2O + 10 ml 10 M NaOH) und zusätzlichen 300 µl 10 M NaOH versetzt. Der pH-Wert muß zwischen 5,5 und 7,0 liegen und ist durch Zugabe von Natronlauge bzw. Eisessig nachzuregulieren. Nach Zugabe von 5 g Natriumchlorid werden die Proben 3 mal mit je 5 ml Diethylether extrahiert und zentrifugiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 2 ml iso-Oktan versetzt, nachfolgend im Stickstoffstrom auf ca. 2 ml eingengt und schließlich durch Zugabe von 1000 mg Natriumsulfat 30 min getrocknet. Die flüssige Phase wird in ein 20ml-Schraubglas überführt, das Natriumsulfat 2 mal mit 2 ml iso-Oktan nachgewaschen und dieses Lösungsmittel ebenfalls in das Schraubglas transferiert. Man fügt nun 50 µl Pyridin (getrocknet über Natriumsulfat) und 200 µl Pentafluorpropansäureanhydrid hinzu und inkubiert eine Stunde bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ und nachfolgend 16 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden die Proben mit 10 ml Phosphatpuffer (pH 8, 0,01 M: 5,4 g $\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ + 2000 ml H_2O + 750 µl H_3PO_4) gewaschen und bei 1.500 g zentrifugiert. Das organische Lösungsmittel wird nun in ein 5-ml Schraubglas, das bereits 200 µl Toluol enthält, überführt, mit 500 mg Natriumsulfat getrocknet und erneut in ein frisches Gläschen



transferiert. Anschließend engt man die Proben im Stickstoffstrom auf ein Endvolumen von 200 µl ein und überführt sie zur sich anschließenden quantitativen Analyse mittels GC/MS in ein Microvial.

3.2.5 Zuverlässigkeitskriterien

	<i>Konzentration (dotiert)</i>		<i>N</i>
Nachweisgrenze			
2,4-DNT	0,5 µg/l		
2,6-DNT	0,5 µg/l		
2,4,6-TNT	2 µg/l		
4-A-2,6-DNT (Methode A (frei))	25 µg/l		
2-A-4,6-DNT (Methode A (frei))	25 µg/l		
4-A-2,6-DNT (Methode B (total))	1 µg/l		
2-A-4,6-DNT (Methode B (total))	4 µg/l		
Präzision in der Serie			
Methode A	6 – 22 %	10 µg/l	9
Methode B	8 – 13 %	10 µg/l	9
Präzision von Tag zu Tag			
Methode A	8 – 29 %	10 µg/l	6
Methode B	8 – 17 %	10 µg/l	6
Wiederfindung			
Methode A	58 – 74 %	10 µg/l	6
Methode B	nicht bestimmt		

Tabelle 3: Zuverlässigkeitskriterien der Analytik von Nitro- und Aminonitroaromaten

3.2.6 Gaschromatographische Arbeitsbedingungen

Kapillarsäule: Material: Quarz
 Stationäre Phase: Phenylmethylpolysiloxan (DB-17)
 Länge: 60 m
 Innerer Durchmesser: 0,25 mm
 Filmdicke: 0,3 µm

Detektor: massenselektiver Detektor (MSD)
 Ionisierungsenergie: 70 eV
 Multiplierspannung: 2800 V

Temperaturen: **Methode A:**
 Säule: 95 °C, Anstieg 3 °C pro Minute bis 200 °C; isotherm für
 10 Minuten; Anstieg auf 275 °C mit 25 °C pro Minute; 45 Minuten
 isotherm bei Endtemperatur

Methode B:
 Säule: 60 °C, Anstieg 5 °C pro Minute bis 180 °C; Anstieg auf
 270 °C mit 30 °C pro Minute; 18 Minuten isotherm bei Endtemperatur



Injektor: jeweils 260 °C
 Detektor: jeweils 280 °C

Trärgas: Helium 5.0 mit constant flow 1,0 ml pro Minute

Probenmenge: 1 µl

Split: splitless

Analyt	Retentionszeit [Minuten]	Quantifier [m/z]	Qualifier [m/z]
Methode A			
I.S.	16,5	129	83
NB	16,5	123	77
2-NT	18,5	120	137
3-NT	19,3	137	120
4-NT	19,9	137	120
1,3-DNB	26,7	168	92
2,6-DNT	26,8	165	89
1,2-DNB	27,3	168	92
2,4-DNT	27,4	165	89
TNT	28,9	210	89
TNB	29,0	213	120
2-ADNT	32,1	197	180
4-ADNT	32,7	197	180
Methode B			
I.S.	42,5	297	251
2-ADNT	43,1	326	206
4-ADNT	44,6	326	224

Tabelle 4: Retentionszeiten und ausgewählte Ionen zur GC-MS-Analytik



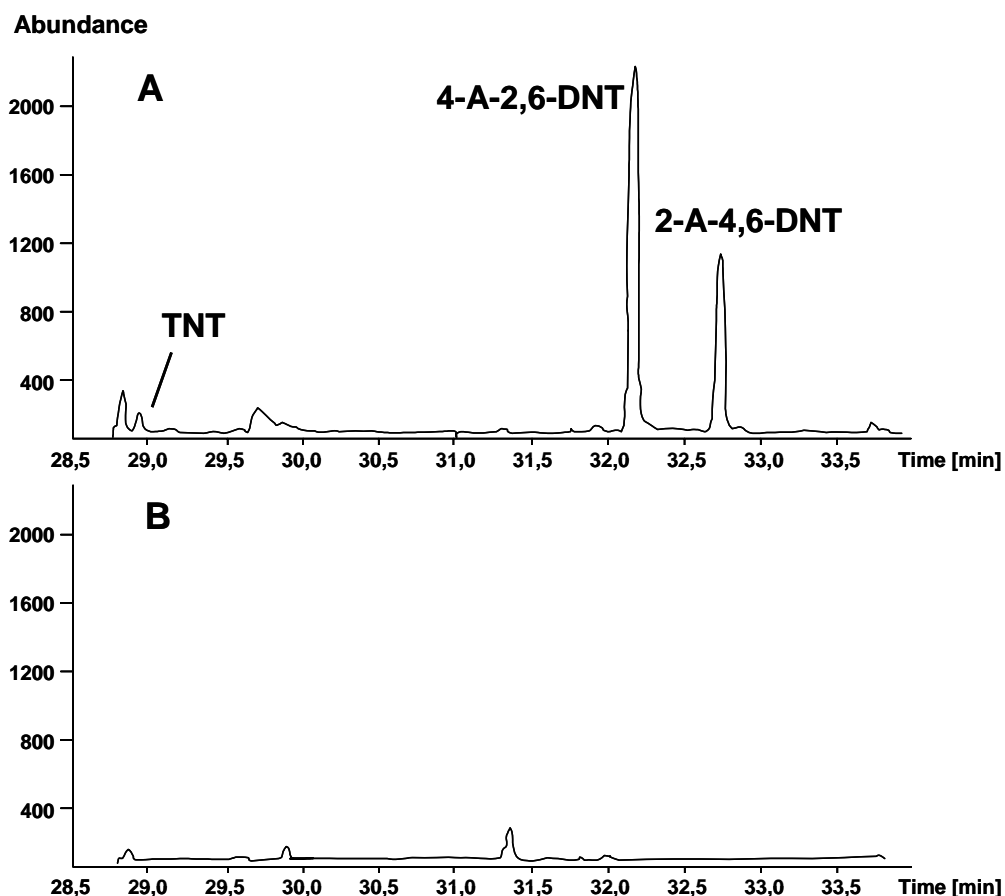


Abbildung 6: Beispielchromatogramme Methode A: (A) eines exponierten Arbeiters (TNT 8 $\mu\text{g/l}$; 4-A-2,6DNT 3455 $\mu\text{g/l}$; 2-A-4,6-DNT 3429 $\mu\text{g/l}$) und (B) einer Kontrollperson

3.3 Sammelmethode zur Bestimmung von nitroaromatischen Verbindungen im Harn

3.3.1 Grundlagen der Verfahrens

Nach einer sauren Hydrolyse von 5 ml Harn werden die Analyten durch pH-Wert-gesteuerte Extraktionen zwischen Harn und n-Hexan isoliert. Nach Derivatisierung mit Pentafluorpropansäureanhydrid und einem anschließenden Waschschrift werden die Analyten kapillargaschromatographisch getrennt und massenspektroskopisch detektiert.

3.3.2 Probenvorbereitung

5 ml Urin werden mit 150 μl interner Standardlösung (4-Amino-5-nitrotoluol in Methanol, 1 mg l^{-1}) und 1 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt und eine Stunde bei 80 $^{\circ}\text{C}$ in einem Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 50 μl Eisessig werden die Proben in einem Eis/Wasser-Bad gekühlt und unter ständigem Umschwenken mit 3,4 ml 10 molarer Natronlauge (3 x 1 ml + 1 x 400 μl), gefolgt von 3 ml MES-Puffer und zusätzlichen 500 μl 10 M NaOH versetzt. Die Proben werden so auf pH 6,4 eingestellt. Anschließend extrahiert man die Urinlösung zweimal mit je 5 ml n-Hexan 10 Minuten auf einem Laborschüttler, zentrifugiert 5 Minuten bei 1.500 g und hebt die organische Phase ab. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 50 μl Pyridin und 25 μl Pentafluorpropansäureanhydrid



versetzt und 1 Stunde bei 75 °C im Wasserbad inkubiert. Um ein Verdampfen des organischen Lösungsmittels zu verhindern, müssen die eingesetzten Probengläschen dicht verschlossen sein. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur werden die Proben mit 1 ml Phosphatpuffer (pH 8) gewaschen und anschließend zentrifugiert. Die organische Phase wird abgehoben und in ein weiteres Gläschen überführt, wo sie vorsichtig im Stickstoffstrom auf 200 µl eingengt wird (Nicht zur Trockene abblasen!!!). Anschließend wird in ein Microinsert umgefüllt und bis auf ca. 50 µl im Stickstoffstrom aufkonzentriert. Zur quantitativen Analyse mittels GC/MS wird jeweils 1 µl injiziert.

Da in die Methode keine Trocknung der organischen Phasen implementiert ist, ist unbedingt darauf zu achten, dass beim Trennen von organischer und wässriger Phasen kein Wasser in die organische Phase verschleppt wird.

3.3.3 Gaschromatographische Arbeitsbedingungen

Kapillarsäule: Material: Quarz
 Stationäre Phase: Phenylmethylpolysiloxan (DB-35)
 Länge: 60 m
 Innerer Durchmesser: 0,22 mm
 Filmdicke: 0,25 µm

Detektor: massenselektiver Detektor (MSD)

Ionisierungsenergie: 70 eV

Multiplierspannung: 1900 V

Temperaturen: Säule: 90 °C, Anstieg 5 °C pro Minute bis 180 °C; isotherm für 5 Minuten; Anstieg auf 200 °C mit 5 °C pro Minute; isotherm für 10 Minuten; Anstieg mit 15 °C auf 260 °C; 25 Minuten isotherm bei Endtemperatur

Injektor: 260 °C

Detektor: 300 °C

Trärgas: Helium 5.0 mit constant flow 1,0 ml pro Minute

Probenmenge: 1 µl

Split: splitless

Analyt	Retentionszeit [Minuten]	Quantifier [m/z]	Qualifier [m/z]
Anilin	11,0	239	120
o-Toluidin	12,5	253	134
m-Toluidin	13,0	253	134
p-Toluidin	13,5	253	134
4-A-5-NT (I.S.)	19,5	252	298
2-A-6-NT	22,9	281	298



Analyt	Retentionszeit [Minuten]	Quantifier [m/z]	Qualifier [m/z]
4-A-2-NT	25,4	281	298
2-A-4-NT	26,2	281	298
4-ABP	32,3	315	168
4-A-2,6-DNT	33,6	326	343
1-NA	24,5	142	289
2-NA	26,5	142	289
3,5-DCIA	18,9	188	307

Tabelle 5: Retentionszeiten und ausgewählte Ionen zur GC-MS-Analytik

3.3.4 Zuverlässigkeitskriterien

	Konzentration (dotiert)	N
Nachweisgrenze		
Anilin, ATs, 4-ADP, NAs	0,1 µg/l	
ANTs	0,5 µg/l	
4-A-2,6-DNT	1 µg/l	
Präzision in der Serie	5,0 – 7,5%	10 µg/l 8
Präzision von Tag zu Tag	6,9- 11,0%	10 µg/l 10
Wiederfindung	82 – 101 %	10 µg/l 8
(Individualharne (Bereich))	87 – 106 %	100 µg/l 8

Tabelle 6: Zuverlässigkeitskriterien Nitroaromaten Sammelmethode

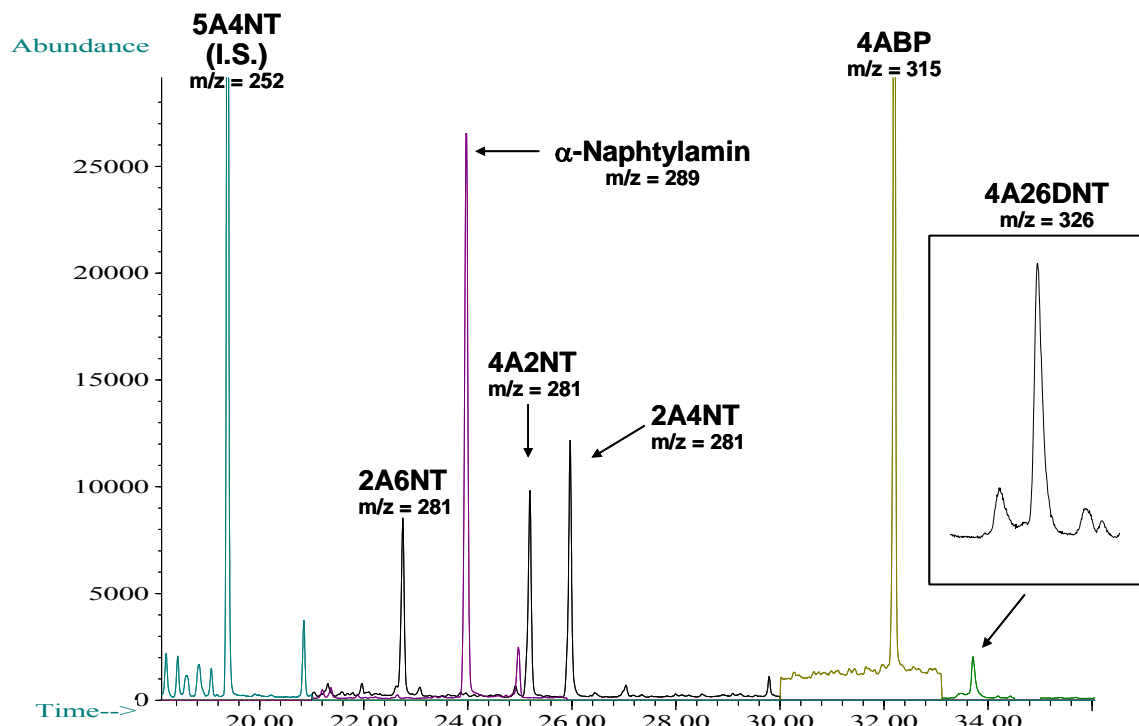


Abbildung 7: Beispielchromatogramm: Mit jeweils 10 µg/l gespikter Poolurin



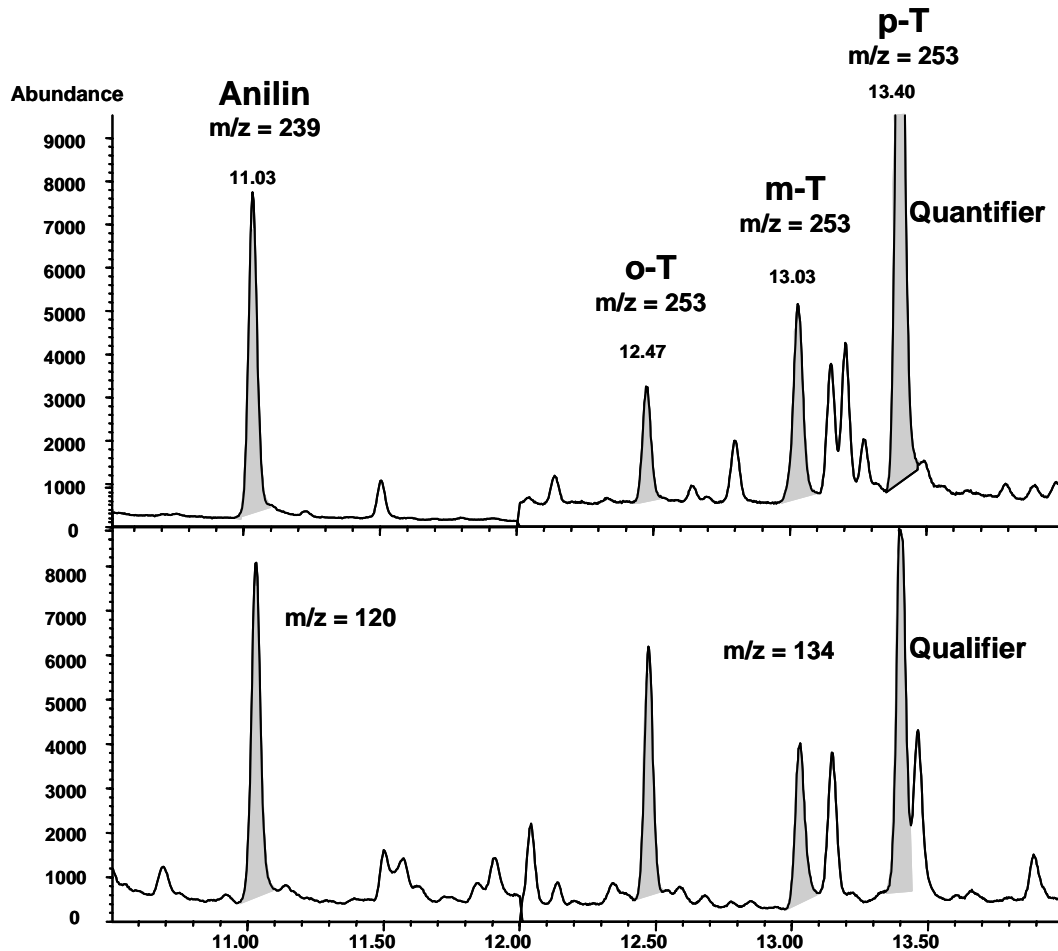


Abbildung 8: Chromatogramm eines Probanden der Allgemeinbevölkerung. Ermittelte Konzentrationen: Anilin = 1,25 µg/l, o-Toluidin (o-T) = 0,55 µg/l, m-Toluidin (m-T) = 0,35 µg/l, p-Toluidin (p-T) = 1,25 µg/l

3.4 Methode zur Bestimmung von Moschus-Xylol in Plasma

Siehe auch KÄFFERLEIN & ANGERER 1997.

3.4.1 Grundlage des Verfahrens

Durch Zentrifugation wird aus Vollblut Plasma gewonnen. Das Plasma wird angesäuert und der Analyt Moschus-Xylol flüssig/flüssig extrahiert. Zur weiteren Aufreinigung wird die organische Phase über eine Silicagel-Säule gegeben. Nach Elution wird der interne Standard ϵ -Hexacyclohexan hinzugefügt und das Eluat im Stickstoffstrom aufkonzentriert. Die quantitative Bestimmung erfolgt nach kapillargaschromatographischer Trennung an einem Elektroneneinfangdetektor (ECD). Positive Befunde werden durch erneute Analyse nach kapillargaschromatischer Trennung mittels eines massenselektiven Detektors (MSD) verifiziert.

3.4.2 Probenvorbereitung

Aus der Armvene werden mittels Einmalentnahmebesteck, das EDTA als Antikoagulans enthält, 10 ml Blut entnommen. Aus dem Blut wird durch Zentrifugation bei 800 g Plasma gewonnen, das bis zur Analyse bei ca. – 20 °C gelagert werden kann.



Zu 2 ml Plasma werden zur Deproteinierung 2 ml konzentrierte Ameisensäure gegeben und die Probe wird durchmischt. Anschließend extrahiert man die Lösung mit 1 ml n-Heptan 10 Minuten auf einem Laborschüttler, zentrifugiert 5 Minuten bei 1000 g. Die Heptanphase wird schließlich abgehoben und langsam über eine mit 700 mg Silicagel (zu 20 % deaktiviert) befüllte Extraktionskartusche gegen. Man eluiert langsam mit 10 ml Petrolether unter Anlegen eines leichten Vakuums (ca. 90.000 Pa). Während der Elution darf das Extraktionsmaterial nicht trocken laufen. Das Eluat wird mit 40 µl internem Standard (40 µg ε-Hexachlorcyclohexan pro Liter n-Heptan) versetzt und anschließend im Stickstoffstrom auf 50 µl eingengt.

3.4.3 Gaschromatographische Arbeitsbedingungen

Kapillarsäule: Material: Quarz
 Stationäre Phase: Dimethylpolysiloxan (DB-5)
 Länge: 60 m
 Innerer Durchmesser: 0,25 mm
 Filmdicke: 0,25 µm

Detektor: Elektroneneinfangdetektor (ECD)

Temperaturen: Säule: 180 °C, 15 min isotherm; dann Anstieg 5 °C pro Minute bis 240 °C; Anstieg auf 320 °C mit 20 °C pro Minute; 15 Minuten isotherm bei Endtemperatur
 Injektor: 260 °C
 Detektor: 320 °C

Trärgas: nachgereinigter Stickstoff mit einem Säulenvordruck von 1,72 bar

Probenmenge: 3 µl
 Split: 20 ml/min.

Retentionszeiten: 21,55 Minuten ε-Hexachlorcyclohexan (I.S.)
 22,49 Minuten Moschus-Xylol

3.4.4 Zuverlässigkeitskriterien

		Konzentration (dotiert)	N
Nachweisgrenze			
GC/ECD	0,1 µg/l		
GC/MSD	0,1 µg/l		
Präzision in der Serie (GC/ECD)	12,7%	0,5 µg/l	8
	2,1 %	5,0 µg/l	8
Präzision von Tag zu Tag (GC/ECD)	14,9 %	0,5 µg/l	8
	3,4 %	5,0 µg/l	8
Aufarbeitungsbedingte Verluste	10 -18 %	5,0 µg/l	8

Tabelle 7: Zuverlässigkeitskriterien Moschus-Xylol-Methoden



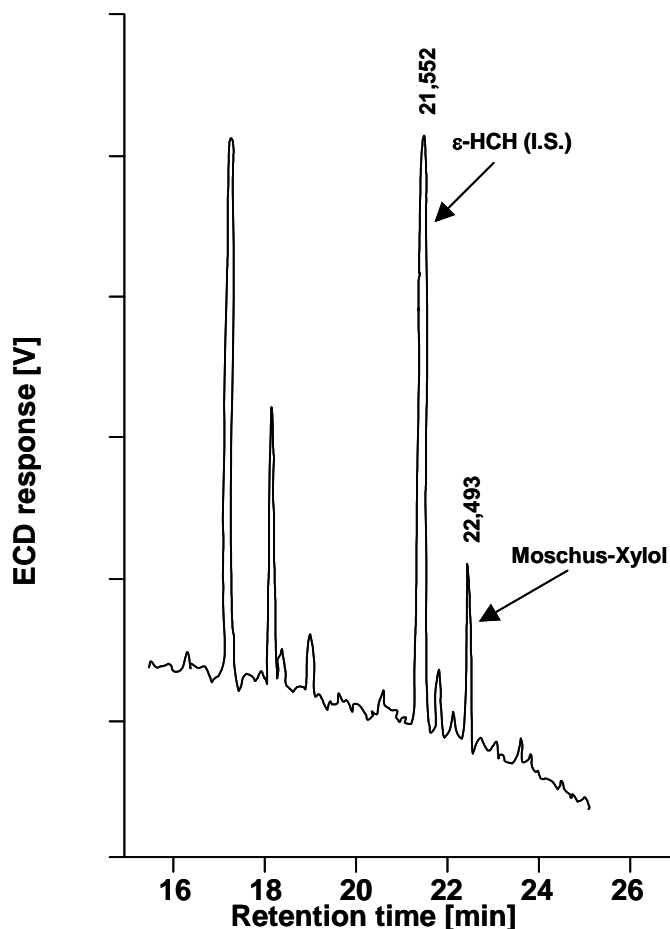


Abbildung 9: GC-ECD-Beispielchromatogramm einer Normalperson (Moschus-Xylol 0,32 µg/l)

3.5 Methode zur Bestimmung von nitroaromatischen Addukten an Hämoglobin

3.5.1 Grundlagen der Verfahrens

Durch alkalische Hydrolyse von 400 mg zuvor isolierten Hämoglobins werden die kovalent in Form von Sulfinsäureamiden ans Hb gebundenen Analyten freigesetzt und anschließend mit n-Hexan extrahiert. Nach Derivatisierung mit Pentafluorpropansäureanhydrid und einem nachgeschalteten Waschschrift werden die Analyten kapillargaschromatographisch getrennt und massenspektroskopisch im SIM-Modus quantifiziert.

3.5.2 Probenvorbereitung

3.5.2.1 Erythrozytenisolierung

Aus der Armvene werden mittels Einmalentnahmebesteck, das EDTA als Antikoagulans enthält, 12 ml Blut entnommen. Aus dem Vollblut müssen innerhalb von 8 Stunden nach der Probennahme Plasma und/oder Erythrozyten gewonnen werden. Das Waschen der Erythrozyten muss unmittelbar nach der Abtrennung vom Plasma durchgeführt werden. Eine Hämolyse der Erythrozyten ist unbedingt zu vermeiden (! Kein Einfrieren des Vollbluts vor der Erythrozyten-Isolierung).



Jeweils 5 ml Vollblut (EDTA) werden mit jeweils 2 ml isotonischer Kochsalzlösung verdünnt, vorsichtig vermischt und 5 min bei 1200 g zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Pipette vorsichtig abgehoben. Man erhält so ca. 4,5 ml Plasmalösung und 2,5 ml Erythrozytenkonzentrat.

Das Erythrozytenkonzentrat wird mit isotonischer Kochsalzlösung auf 5 ml aufgefüllt und bei 1200 g für 5 min erneut zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben und verworfen. Die Erythrozyten werden anschließend noch mindestens 2 mal (bis der Überstand nicht mehr gelblich gefärbt ist), bei akuter Intoxikation bis zu 5 mal, mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen.

Die so isolierten Erythrozyten werden mit 7,5 ml destilliertem Wasser versetzt, homogenisiert und bei – 20 °C eingefroren. Die Proben können beliebig lange gelagert werden.

3.5.2.2 Hämoglobinisolierung

Die eingefrorene 10 ml-Lysat-Probe wird aufgetaut und durch Umschütteln homogenisiert. Zur Entfernung von Zelltrümmern wird die Probe ca. 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben, in zwei Glasröhrchen (50 ml Ø 2,5 cm, H: 15 cm) aufgeteilt und im Wasserbad auf 25°C erwärmt. In beide Röhrchen werden unter Schütteln (Vortex) zügig 12,5 ml Ethanol mittels Dispensette zugeben. Der Schüttelvorgang darf nicht unterbrochen werden, da das Hämoglobin sonst nicht quantitativ ausfällt.

Anschließend muss noch ca. 1 Minute geschüttelt werden (Vortex), wobei sich die Färbung von hellrot nach braunrot vertieft (bis keine weitere Verfärbung mehr zu beobachten ist). Das ausgefällte Hämoglobin sollte nun feinkörnig vorliegen. Man lässt das Hämoglobin absetzen, die obere Ethanol/H₂O-Phase muss farblos sein. Ca. 4/5 des Überstandes werden dekantiert und verworfen. Ein Rest Ethanol/H₂O Phase muss vorhanden sein, da sonst kein Aufschütteln möglich ist. Der Inhalt beider Röhrchen ist unter intensivem Aufschütteln zu vermischen und quantitativ in 125 ml H₂O überzuführen. Das Hämoglobin wird sich nach korrekter Aufarbeitung an dieser Stelle langsam absetzen (ca. 1 h). Die H₂O-Phase sollte wiederum farblos sein.

Anschließend wird das Hämoglobin über einen Schwarzband-Filter abgenutscht. Dabei ist darauf zu achten, dass der Filterkuchen nicht trocken gesaugt wird; er ist zur Entfernung von Glutathion-Resten direkt mit 125 ml H₂O zu waschen. Bei diesem Vorgang sollte das Hämoglobin wiederholt aufgeschlämmt werden.

Das überstehende Wasser wird weitgehend abgesaugt, jedoch ist auch hier darauf zu achten, dass das Hämoglobin stets wasserfeucht bleibt. Zur Entfernung des Wassers wird das Hämoglobin anschließend schrittweise mit jeweils 25 ml Ethanol/Wasser (2:1; v:v) sowie Ethanol/Ether (1:3; v:v) aufgeschlämmt und abgesaugt. Abschließend wird das Hämoglobin ohne Vakuum mit 40 ml Ether (p.a., mit EtOH als Stabilisator) noch einmal aufgeschlämmt. Man lässt dann das Hämoglobin ohne Vakuum sedimentieren und abtropfen.

Nach etwa 5 Minuten Wartezeit wird das Hämoglobin mit Luft unter Vakuum trocken gesaugt und in konische 50ml-Reagenzröhrchen (z.B. Falcon® 2070 Blue Max) überführt und in einem Vakuumexsikkator getrocknet.

3.5.2.3 Hämoglobinaufbereitung

400 mg des nach Abschnitt 3.5.2.2 und 3.5.2.3 gewonnenen Hämoglobins werden in ein verschließbares 15ml-Reagenzröhrchen aus Kunststoff, das zuvor gründlichst mit 5 ml Toluol



gewaschen wurde eingewogen. Unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbads wird das Hämoglobin in 4 ml 0,1 N Natronlauge aufgelöst und zur Hydrolyse 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es werden 50 µl des interne Standards (4-Amino-5-nitrotoluol in Methanol, 1 mg^l⁻¹) zugegeben und vermischt. Anschließend extrahiert man die Lösung mit 6 ml n-Hexan 10 Minuten auf einem Laborschüttler, zentrifugiert 5 Minuten bei 3000 g und friert die Probe zur Emulsionsbrechung für 4 Stunden bei ca. – 20° C ein. Nach dem Auftauen wird die Probe erneut bei 4000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Hexanphase wird schließlich abgehoben und in ein zuvor mit 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan inaktiviertes 25ml-Schraubglas überführt. Die organische Phase wird mit 25 µl Pyridin und 15 µl Pentafluorpropansäureanhydrid versetzt und 1 Stunde bei 75 °C im Wasserbad inkubiert. Um ein Verdampfen des organischen Lösungsmittels zu verhindern, müssen die eingesetzten Probengläschen dicht verschlossen sein. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur werden die Proben mit 1 ml Phosphatpuffer (pH 8) gewaschen und anschließend zentrifugiert. Die organische Phase wird abgehoben und in ein weiteres Gläschen überführt, wo sie vorsichtig im Stickstoffstrom auf 200 µl eingeeengt wird. Anschließend wird in ein Microinsert umgefüllt und bis auf ca. 10 µl im Stickstoffstrom aufkonzentriert. Zur quantitativen Analyse mittels GC/MS wird jeweils 1 µl injiziert. Da in die Methode keine Trocknung der organischen Phasen implementiert ist, ist unbedingt darauf zu achten, dass beim Trennen von organischer und wässriger Phasen kein Wasser in die organische Phase verschleppt wird.

3.5.3 Gaschromatographische Arbeitsbedingungen

Kapillarsäule:	Material:	Quarz
	Stationäre Phase:	Phenylmethylpolysiloxan (DB-35)
	Länge:	60 m
	Innerer Durchmesser:	0,22 mm
	Filmdicke:	0,25 µm
Detektor:	massenselektiver Detektor (MSD)	
Ionisierungsenergie:	70 eV	
Multiplierspannung:	1900 V	
Temperaturen:	Säule:	90 °C, Anstieg 5 °C pro Minute bis 180 °C; isotherm für 5 Minuten; Anstieg auf 200 °C mit 5 °C pro Minute; isotherm für 10 Minuten; Anstieg mit 15 °C auf 260 °C; 25 Minuten isotherm bei Endtemperatur
	Injektor:	260 °C
	Detektor:	300 °C
Trärgas:	Helium 5.0 mit constant flow 1,0 ml pro Minute	
Probenmenge:	1 µl	
Split:	splitless	



Analyt	Retentionszeit [Minuten]	Quantifizier [m/z]	Qualifizier [m/z]
Anilin	11,0	239	120
o-Toluidin	12,5	253	134
m-Toluidin	13,0	253	134
p-Toluidin	13,5	253	134
4-A-5-NT (I.S.)	19,5	252	298
2-A-6-NT	22,9	281	298
4-A-2-NT	25,4	281	298
2-A-4-NT	26,2	281	298
4-ABP	32,3	315	168
4-A-2,6-DNT	33,6	326	343
1-NA	24,5	142	289
2-NA	26,5	142	289
3,5-DCA	18,9	188	307

Tabelle 8: Retentionszeiten und ausgewählte Ionen zur GC-MS-Analytik

3.5.4 Zuverlässigkeitskriterien

	Konzentration (dotiert)	N
Nachweisgrenzen	1-5 pg/g Hb	
Präzision in der Serie	12 – 18%	50 pg/g 10
Präzision von Tag zu Tag	Noch nicht möglich	
Wiederfindung	82 – 109 %	50 pg/g 8

Tabelle 9: Zuverlässigkeitskriterien Hb-Methode

3.6 Untersuchte Bevölkerungsgruppen und Kollektive

Zu allen Probanden liegen umfangreiche expositionsrelevante Informationen vor. In einem Fragebogen wurden neben allgemeinen Informationen wie Alter und Geschlecht auch Lifestylefaktoren wie z.B. Raucherstatus und Ernährungsgewohnheiten erfasst.

3.6.1 Normalpersonen aus städtischen Gebieten

Die Probanden, die keinen beruflichen Umgang mit aromatischen Nitroverbindungen hatten, sind im Ruhrgebiet ansässig. Das Kollektiv umfasst insgesamt 100 Personen, die Altersverteilung ist Tabelle 10 zu entnehmen.

3.6.2 Normalpersonen aus ländlichen Gebieten

Dieses Kollektiv wurde im Münsterländer Raum gewonnen. Es stellten sich insgesamt 101 Personen zur Verfügung. Beruflicher Kontakt zu Nitroaromaten bestand nicht. Die Altersverteilung ist Tabelle 10 zu entnehmen.



Alter	Ruhrgebiet (N = 100)	Münsterland (N = 101)
20 – 30 Jahre	21	21
31 – 40 Jahre	33	33
41 – 50 Jahre	27	27
51 – 60 Jahre	10	16
61 – 70 Jahre	9	4

Tabelle 10: Altersverteilung Normalkollektive

3.6.3 Bewohner Rüstungsaltslasten

Bei den Probanden dieses Kollektivs handelt es sich um 63 Bewohner zweier Rüstungsaltslastenstandorte in Hessen. Auf diesen Geländen wurden TNT-haltige Munition und Sprengstoffe produziert. In einzelnen Bodenproben wurden hier Belastungen von über 250.000 mg TNT-TE kg⁻¹ Boden gefunden [SCHNEIDER et al. 1994]. Expositionsrelevante Begleitumstände wurden probenbezogen in einem umfangreichen Fragebogen erhoben.

3.6.4 Berufliche Belastung

Dieses Kollektiv besteht aus insgesamt 82 Mitarbeitern einer Firma zur Munitionsentsorgung aus Königswartha, Sachsen. In diesem Betrieb wurden zur Zeit der Probennahme verschiedene Typen von Artilleriegeschossen, Fliegerbomben und Handgranaten delaboriert und entsorgt. Dieses Kollektiv unterteilt sich in drei Gruppen. Untergruppe I (N = 34) hatte regelmäßigen Kontakt mit TNT- und DNT-haltigen Explosivstoffen, die Gruppe II war gelegentlichen exponiert und Gruppe III besteht aus Personen des gleichen Betriebs, allerdings ohne bekannten Umgang mit Explosivstoffen. Die Probanden waren zum Zeitpunkt der Probennahmen im Alter zwischen 26 und 60 Jahren mit einem Altersmedian von 46 Jahren.

3.6.5 Moschus-Xylolkollektive (Normalpersonen)

Zu diesen Kollektive zählen insgesamt 114 Personen. Bei 72 dieser Personen wurden Blutproben im den Jahren 1992 und 1993 genommen. Zu diesem Zeitpunkt waren die Probanden dieser Gruppe im Alter zwischen 20 und 58 Jahren. Von 42 weiteren Personen wurden im Jahr 1998 Blutproben genommen. Die Blutabnahme bei diesen Probanden erfolgte somit nach dem freiwilligen Verzicht der deutschen Waschmittelindustrie, Moschus-Xylol als Duftstoff einzusetzen.



4 Untersuchungsergebnisse

4.1 Renale Ausscheidung von Metaboliten der Nitroaromaten

4.1.1 2,4-Dinitrobenzoesäure im Urin beruflich belasteter Personen

	Gruppe		
	I (N=34) µg/l	II (N=22) µg/l	III (N=26) µg/l
Durchschnitt ± σ	12,2 ± 20,4	2,9 ± 4,9	< NWG
Median	5,1	< NWG	< NWG
Bereich	< NWG – 95,0	< NWG – 16,0	< NWG – 5,1
95. Perzentil	73,4	15,7	4,6
Positive Proben	25	8	7

Tabelle 11: Ergebnisse der Bestimmung von 2,4-DNBA im Urin von Arbeitern eines Betriebes zur Munitionsentsorgung; Gruppe I: regelmäßige Exposition, Gruppe II: gelegentliche Exposition, Gruppe III: Kontrollproben diese Betriebs ohne bekannte Exposition, NWG = Nachweisgrenze

Da die gefundenen 2,4-DNBA-Konzentrationen der Gruppe III (Kontrollproben) größtenteils unterhalb der Nachweisgrenze lagen und der Median bei Kontrollproben als auch bei gelegentlich Exponierten (Gruppe II) zu < NWG bestimmt wurden, waren positive Befunde bei den restlichen, beruflich nicht exponierten Kollektiven nicht zu erwarten. Auf die Untersuchung dieser Kollektive auf 2,4-DNBA wurde daher verzichtet.

4.1.2 Nitro- und Aminonitroaromaten im Urin beruflich belasteter Personen

	Gruppe		
	I (N=34) µg/l	II (N=22) µg/l	III (N=26) µg/l
Median			
4-A-2,6-DNT (frei)	30	< NWG	< NWG
4-A-2,6-DNT (total)	317	41	< NWG
2-A-4,6-DNT (frei)	< NWG	< NWG	< NWG
2-A-4,6-DNT (total)	44	< NWG	< NWG
2,4,6-TNT	< NWG	< NWG	< NWG
2,4-DNT	< NWG	< NWG	< NWG
2,6-DNT	< NWG	< NWG	< NWG
Bereich			
4-A-2,6-DNT (frei)	< NWG – 1688	< NWG – 101	< NWG
4-A-2,6-DNT (total)	< NWG – 6693	< NWG – 1212	< NWG – 45
2-A-4,6-DNT (frei)	< NWG – 652	< NWG – 93	< NWG
2-A-4,6-DNT (total)	< NWG – 1464	< NWG – 241	< NWG – 10
2,4,6-TNT	< NWG – 5	< NWG	< NWG
2,4-DNT	< NWG – 2,1	< NWG	< NWG
2,6-DNT	< NWG – 3,6	< NWG	< NWG



	Gruppe		
	I (N=34) µg/l	II (N=22) µg/l	III (N=26) µg/l
Positive Proben			
4-A-2,6-DNT (frei)	19	2	0
4-A-2,6-DNT (total)	32	19	7
2-A-4,6-DNT (frei)	13	2	0
2-A-4,6-DNT (total)	15	8	2
2,4,6-TNT	6	0	0
2,4-DNT	1	0	0
2,6-DNT	5	0	0

Tabelle 12: Ergebnisse der Bestimmung von sprengstofftypischen Verbindungen im Urin von Arbeitern eines Betriebes zur Munitionsentsorgung; Gruppe I: regelmäßige Exposition, Gruppe II: gelegentliche Exposition, Gruppe III: Kontrollproben diese Betriebs ohne bekannte Exposition

Im Laufe der Arbeiten stellte sich heraus, dass diese Methode im unteren für umweltmedizinische Fragestellungen interessanten Konzentrationsbereich durch Coelution unbekannter Urinbestandteile gestört wurde. Auch waren Anilin und o-Toluidin mit dieser Methode nicht zu erfassen. Aus diesen Gründen wurde die Nitroaromaten-Sammelmethode neu entwickelt (Abschnitt 3.3).

4.1.3 Nitroaromaten-Screening im Urin bei Personen der Allgemeinbevölkerung

Die Parameter m-Toluidin, p-Toluidin und 3,5-Dichloranilin wurden erst im Laufe des Projekts in die Analytik mit aufgenommen. Aus diesem Grund reduziert sich die Anzahl der gemessenen Proben für diese Parameter vorerst auf insgesamt 84 (38 Stadtbevölkerung und 46 Landbevölkerung).



[µg/l]	NWG	Städtische Bevölkerung (N = 100/38*)				Ländliche Bevölkerung (N = 100/46*)				Gesamt (N = 200/84*)			
		Median	95 %	Bereich	positive Befunde	Median	95 %	Bereich	positive Befunde	Median	95 %	Bereich	positive Befunde
Anilin	0,1	1,71	9,4	< NWG - 35,5	99 %	1,40	5,4	< NWG - 11,1	93 %	1,51	7,4	< NWG - 35,8	97 %
o-Toluidin	0,05	0,35	2,8	< NWG - 6,0	78 %	0,52	2,4	< NWG - 11,9	92 %	0,44	2,6	< NWG - 11,9	85 %
m-Toluidin *	0,05	0,37	4,1	< NWG - 7,2	92 %	0,22	1,9	< NWG - 18,3	78 %	0,28	3,9	< NWG - 18,3	85 %
p-Toluidin *	0,05	1,21	10,8	< NWG - 10,8	97 %	1,20	11,4	< NWG - 27,1	83%	1,20	11,4	< NWG - 27,1	89 %
3,5-DCA *	0,05	0,48	4,2	< NWG - 54,9	89 %	0,57	3,5	< NWG - 4,4	80 %	0,54	3,9	< NWG - 54,9	85 %

Tabelle 13 Ergebnisse des biologischen Monitorings: Vergleich städtische und ländliche Bevölkerung; NWG = Nachweisgrenze; * Für die Parameter m-Toluidin, p-Toluidin und 3,5-Dichloranilin reduziert sich die Anzahl der gemessenen Proben auf insgesamt 84 (38 Stadtbevölkerung und 46 Landbevölkerung)

[µg/l]	NWG	Allgemeinbevölkerung							
		Median	95 %	Bereich	positive Befunde	Median	95 %	Bereich	positive Befunde
Anilin	0,1	Raucher (N=50)				Nichtraucher (N=149)			
		2,28	7,8	< NWG - 34,6	98 %	1,33	6,6	< NWG - 35,5	95 %
o-Toluidin	0,05	männlich (N=96 /34*)				weiblich (N=104 /50*)			
		0,53	3,9	< NWG - 11,9	85 %	0,38	2,5	< NWG - 6,6	87 %
m-Toluidin*	0,05	0,64	4,4	< NWG - 4,4	91 %	0,17	4,2	< NWG - 18,3	94 %
p-Toluidin*	0,05	3,10	16,9	< NWG - 34,0	94 %	0,69	7,9	< NWG - 21,7	88 %

Tabelle 14 Ergebnisse biologisches Monitoring: Vergleich Raucher/Nichtraucher und männliche/weibliche Allgemeinbevölkerung; NWG = Nachweisgrenze; * Für die Parameter m-Toluidin, p-Toluidin und 3,5-Dichloranilin reduziert sich die Anzahl der gemessenen Proben auf insgesamt 84 (38 Stadtbevölkerung und 46 Landbevölkerung)

[µg/l]	NWG	Bewohner Altlasten (N = 63)				Allgemeinbevölkerung (N = 200)			
		Median	95 %	Bereich	positive Befunde	Median	95 %	Bereich	positive Befunde
4-A-2,6-DNT	1,0	< NWG	2,3	< NWG - 23,4	14 %	< NWG	< NWG	< NWG - 5,3	2 %
2-A-4-NT	0,5	< NWG	< NWG	< NWG	0	< NWG	< NWG	< NWG	0
4-A-2-NT	0,5	< NWG	< NWG	< NWG	0	< NWG	< NWG	< NWG - 7,7	5 %
2-A-6-NT	0,5	< NWG	< NWG	< NWG - 2,2	4 %	< NWG	< NWG	< NWG	0
Anilin	0,1	3,07	21,5	< 0,43 - 400	100 %	1,51	7,4	< 0,01 - 35,8	97 %

Tabelle 15: Ergebnisse Biologisches Monitoring: Vergleich Bewohner Altlasten / Allgemeinbevölkerung

4.1.4 Moschus-Xylol im Plasma von Personen der Allgemeinbevölkerung

<i>[µg/l Plasma]</i>	<i>Median</i>	<i>Bereich</i>	<i>Positive Befunde</i>
Normalpersonen <u>1992/93</u> (N = 72)	0,24	< NWG - 1,12	92 %
Normalpersonen <u>1998</u> (N = 42)	NWG	< NWG - 0,29	12 %

Tabelle 16: Ergebnisse des Biologischen Monitorings von Moschus-Xylol in Urin

5 Ergebnisdiskussion

5.1.1 Sprengstofftypische Nitroaromaten und deren Metaboliten

Berufliche Exposition:

Die renale Ausscheidung von 2,4-Dinitrobenzoesäure als Metabolit des 2,4-Dinitrotoluols wurde bei 34 regelmäßig Exponierten (Gruppe I), 22 gelegentlich Exponierten (Gruppe II) und 26 Kontrollen (Gruppe III) eines Betriebes zur Delaboration von Munition untersucht. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 11 zusammengefasst, ein Chromatogramm eines belasteten Arbeiters kann Abbildung 5 entnommen werden. Während bei Gruppe I noch in 74 % der Fälle eine Belastung mit 2,4-Dinitrotoluol festzustellen war (Median 5,1 µg/l, Maximalwert 95 µg/l), konnten bei den gelegentlich Exponierten (Gruppe II) nur noch bei 36 % eine Exposition gegenüber 2,4-Dinitrotoluol nachgewiesen werden (Median < NWG). Jedoch wurde auch bei 27 % der Kontrollen aus dem gleichen Betrieb (Gruppe III) 2,4-

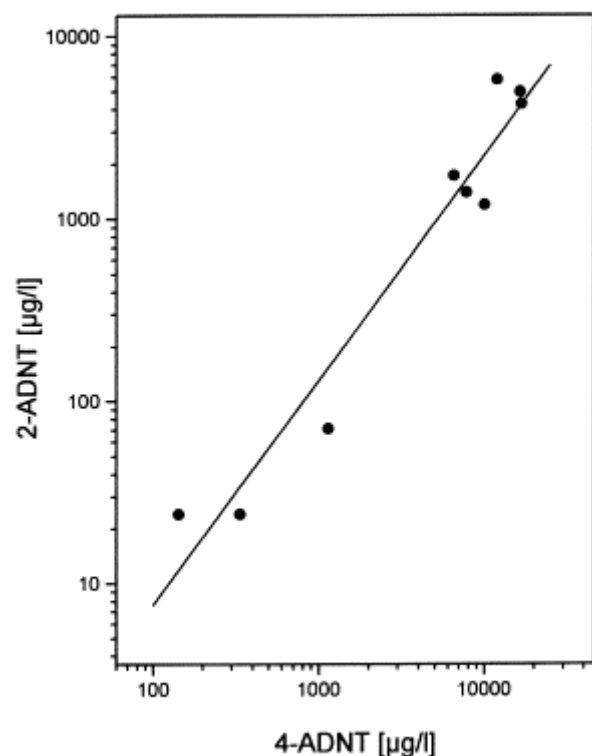


Abbildung 10: Korrelation Aminodinitrotoluole

Dinitrobenzoesäure quantifiziert (Median > NWG). Diese positiven Befunde bei den Kontrollen deuten auf zumindest partiell mit 2,4-Dinitrotoluol-kontaminierte Betriebsteile hin.

Ein Vergleich mit anderen in der Literatur veröffentlichten Studien (Smith et al. 1995, Woollen et al. 1985, Turner et al. 1985, Levine et al. 1985) zeigt, dass die von uns gemessenen Konzentrationen um den Faktor 100 bis 1000 niedriger liegen. Dies hat seine Ursachen in den unterschiedlichen Expositionssituationen der untersuchten Probanden. In den zitierten Studien wurden Arbeiter untersucht, die definitiv bei der technischen Produktion von Dinitrotoluolen (Smith et al. 1995, Turner et al. 1985, Levine et al. 1985) bzw. Explosivstoffen (Woollen et al. 1985) Dinitrotoluolen gegenüber exponiert waren. Informationen über den Dinitrotoluolgehalt der delaborierten Munition und damit die äußere Belastung der von uns

untersuchten Arbeiter lagen nicht vor.

Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass 2,4-Dinitrobenzoesäure als Parameter gut zum Biologischen Monitoring einer beruflichen Dinitrotoluolexposition geeignet ist.

Neben der Untersuchung des oxidativen Stoffwechselfades in Form der 2,4-Dinitrobenzoesäure wurden die beruflich gegenüber sprengstofftypischen Nitroaromaten exponierten Personen auch auf die renale Ausscheidung von unveränderten Nitroaromaten sowie deren auf reaktivem Weg entstehenden Metaboliten untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Nitroaromaten 2,4,6-Trinitrotoluol, 2,4-Dinitrotoluol sowie 2,6-Dinitrotoluol unverändert nur zu einem sehr geringen Anteil ausgeschieden werden. So war 2,4,6-TNT beispielsweise nur bei 18 % der regelmäßig Exponierten (Gruppe I) nachzuweisen, während die reduktiven Metaboliten des TNTs 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol und 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol in 94% bzw. 44% der gleichen Gruppe quantifizierbar waren. 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol war zudem bei 86 % der gelegentlich Exponierten (Gruppe II) nachweisbar, bei Gruppe III waren noch 27% positive Befunde auf 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol zu verzeichnen. Darüber hinaus war festzustellen, dass die renalen Konzentrationen beider Metaboliten des Trinitrotoluols streng miteinander korrelieren (Abbildung 8). Daraus ergibt sich bezogen auf den Median von Gruppe I ein Verhältnis zwischen 4-A-2,6-DNT, 2-A-4,6-DNT und unverändertem 2,4,6-TNT von etwa 100:14:0,3. Dieses Verhältnis ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von AHLBORG et al. 1988, die ein Verhältnis von 100:22:0,7 (n = 41) fanden. Ein ähnliches Verhältnis ist auch von Yao et al. 1989 beschrieben. Diese Arbeitsgruppe berichtet über eine Relation zwischen 4-A-2,6-DNT zu 2-A-4,6-DNT im Blut von 100:31 bei 93 gegenüber TNT exponierten Personen.

Der Vergleich der Ergebnisse aus Methode A und Methode B (zusätzliche Hydrolyse) zeigt zudem, dass die Aminodinitrotoluole im überwiegenden Maß konjugiert ausgeschieden werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei beruflicher Exposition gegenüber 2,4,6-Trinitrotoluol der Parameter 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol in Urin für ein Biologisches Monitoring gut geeignet ist. Bei beruflichen Expositionen gegenüber 2,4-Dinitrotoluol empfiehlt sich ein Biologisches Monitoring über den Parameter 2,4-Dinitrobenzoesäure. Die entsprechenden im Rahmen des Projekts entwickelten quantitativ-analytischen Methoden hierzu sind hinreichend empfindlich, spezifisch und zuverlässig.

Exposition durch Altlasten:

Die Ergebnisse für die Metabolite der sprengstofftypischen Nitroaromaten in Tabelle 15 zeigen, dass trotz einer erheblichen äußeren Belastung im Boden (es wurden hier TNT und Dinitrotoluole bis in den g/kg-Bereich gefunden) im allgemeinen keine entsprechende innere Belastung der Anwohner festzustellen war. Lediglich bei 9 der Altlastenbewohner, das entspricht 14% (Allgemeinbevölkerung 2%), war der Hauptmetabolit des TNT im Harn nachweisbar, wobei das 95. Perzentil mit 2,3 µg/l niedrig liegt. Es ist also davon auszugehen, dass die orale und eine eventuelle dermale Aufnahme sprengstofftypischer Nitroaromaten aus partiell hochkontaminierten Böden wesentlich niedriger liegt als bisher angenommen. Es fällt allerdings auf, dass die Bewohner von Rüstungsaltlasten signifikant mehr Anilin ausscheiden als die Allgemeinbevölkerung. Eine mögliche Ursache wäre die inhalative Aufnahme von Nitrobenzol oder Anilin selbst, die einen wesentlich höheren Dampfdruck als die höher nitrierten Aromaten besitzen. Anilin beispielsweise kann durch den Abbau von 2,4,6-TNT bzw. der Dinitrotoluole durch Mikroorganismen im Boden entstehen [BOPATHY & KULPA 1993, BOOPATHY 2000].

Während 4-Amino-2,6-dinitrotoluol den Hauptmetaboliten des TNT im Urin darstellt, sollte die renale Ausscheidung von Dinitrotoluolen hauptsächlich als entsprechende Dinitrobenzoesäure nach Seitenkettenoxidation (und nicht als Monoaminomononitrotoluol (siehe auch Abbildung 1)) erfolgen. Die negativen Befunde zu den Dinitrotoluolmetaboliten bei den Rüstungsaltestenwohnern stehen hiermit und mit unseren Ergebnissen bei beruflich TNT- und dinitrotoluolexponierten Personen (ANGERER und WEISMANTEL 1998) in Einklang.

Allgemeinbevölkerung:

Sprengstofftypische Nitroaromaten und deren Metaboliten spielen bei der Allgemeinbevölkerung erwartungsgemäß keine Rolle. Siehe dazu auch Tabelle 15.

5.1.2 Moschus-Xylol in der Allgemeinbevölkerung

Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse des Biologischen Monitorings von Moschus-Xylol im Plasma der Allgemeinbevölkerung vor (1992/93) und nach (1998) dem freiwilligen Verzicht der deutschen Waschmittelindustrie Moschus-Xylol als Duftstoff (1993) einzusetzen. Während 1992/93 noch bei 92 % der deutschen Allgemeinbevölkerung Moschus-Xylol im Plasma nachweisbar waren, so war es 1998 nur noch bei 12 % der untersuchten Personen zu quantifizieren. Die starke Verwendungseinschränkung des nitroaromatischen Duftstoffes spiegelt sich in den Biomonitoringergebnissen deutlich wider. Moschus-Xylol wird allerdings bis zum heutigen Zeitpunkt weiterhin als Duftstoff in Parfums, Seifen und Kosmetika verwendet. Hierin ist auch ein Grund für die (wenigen) positiven Befunde im Jahr 1998 zu sehen.

Die Ergebnisse aus den Jahren 1992 und 1993 stehen im Einklang mit einer Schweizer Studie aus dem Jahr 1994 (HELBLING et al. 1994). Hier wurde Moschus-Xylol im Bereich zwischen 0,066 und 0,27 ng/g in insgesamt 9 Plasmaproben von drei Personen quantifiziert. Systematische Unterschiede zwischen männlicher und weiblicher Allgemeinbevölkerung sowie zwischen Rauchern und Nichtrauchern waren in den von uns untersuchten Plasmaproben aus 1992/93 nicht feststellbar. Allerdings fällt bei den Ergebnissen aus 1998 auf, dass die positiven Befunde auf Moschus-Xylol größtenteils von weiblichen Probanden herrühren. Aufgrund der niedrigen Fallzahl positiver Befunde kann dies allerdings statistisch gesehen nur als Trend angesehen werden und ließe sich auf die vermehrte Verwendung von Kosmetika bzw. Parfums zurückführen.

Aufgrund der hohen Lipophilie von Moschus-Xylol ($P_{OW} = 5,2$) und seinem Nachweis in verschiedensten biologischen Proben war zudem eine Anreicherung in der Nahrungskette anzunehmen. So wurde Moschus-Xylol u.a. in verschiedenen Süßwasserfischen nachgewiesen. Aus diesem Grund wurden die Probanden des Kollektivs aus den Jahren 1992/93 zu ihrem Fischkonsum befragt. Ein Einfluss des individuellen Fischkonsums auf die Moschus-Xylol-Konzentration war jedoch nicht festzustellen.

5.1.3 Aromatische Amino- und Nitroverbindungen in der Allgemeinbevölkerung

Die Ergebnisse der Untersuchung der Allgemeinbevölkerung, aufgeteilt nach ländlicher und städtischer Bevölkerung, sind in Tabelle 13 zusammengestellt. Auffällig ist, dass sowohl die städtische als auch die ländliche Allgemeinbevölkerung Anilin, ortho-, meta- und para-Toluidin sowie den Vinclozolin- und Iprodion-Metaboliten 3,5-Dichloranilin (3,5-DCIA, WILL 1995) ausscheidet. Während Anilin in nahezu allen Proben nachgewiesen werden konnte,

wurden die Toluidine und das 3,5-DCIA in mehr als $\frac{3}{4}$ der Proben quantifiziert. Die 95. Perzentile für die Anilinausscheidung für beide Teilkollektive lagen bei 9,4 $\mu\text{g/l}$ (Stadt) bzw. bei 5,4 $\mu\text{g/L}$ (Land). Der derzeitige Biologische Arbeitsstofftoleranzwert (BAT) für Anilin liegt bei 1.000 $\mu\text{g/l}$. Er gilt jedoch nur für Personen, die an ihrem Arbeitsplatz exponiert sind und kann deshalb nicht für die Bewertung umweltmedizinischer Sachverhalte herangezogen werden.

Die von uns ermittelten Konzentrationen des Anilins und der drei Toluidine stimmen gut mit bereits in der Literatur veröffentlichten Werten von RIFFELMANN et al. (1995; Anilin, o-, m-, p-Toluidin) und TEASS et al. (1993; Anilin, o-Toluidin) überein. Allerdings stand der Autorengruppe um RIFFELMANN nur ein relativ kleines Kollektiv von 16 Personen (8 Raucher, 8 Nichtraucher) zur Verfügung. TEASS et al. (1993) untersuchten ein Kollektiv von 31 nicht exponierten Vergleichsprobanden einer Firma in der mit Anilin und o-Toluidin umgegangen wurde. Die Werte dieser Arbeitsgruppe liegen etwas höher. Sie können deshalb nicht zum direkten Vergleich herangezogen werden, da es sich um Personen handelt, die möglicherweise erhöhten Luftkonzentrationen im Umfeld der Produktion ausgesetzt waren. Diese bedingt auch die in dieser Veröffentlichung mitgeteilten höheren Nachschichtwerte im Vergleich zu den Vorschichtwerten der Kontrollgruppe.

Sprengstofftypische Nitroaromaten und deren Metaboliten spielen bei der Allgemeinbevölkerung erwartungsgemäß keine Rolle.

3,5-Dichloranilin war in 85 % der Urine der Allgemeinbevölkerung zu finden. Hauptursache hierfür dürften Rückstände auf oder in Nahrungsmitteln sein. Die Pflanzenschutzmittel Vinclozolin, Iprodion, Chlozolinat und Procymidon enthalten 3,5-DCIA als Struktureinheiten. Vinclozolinrückstände beispielsweise wurde im Rahmen eines bundesweiten Monitorings von 1988 – 1993 vor allem in Erdbeeren (56 % der Proben), Kopfsalat (30 % der Proben) und Tomaten (13 % der Proben) nachgewiesen (ARNOLD 1993). Außerdem waren in 42% der untersuchten Weinproben Vinclozolinrückstände bis 5,8 mg/l zu finden (CHEMISCHE LANDESUNTERSUCHUNGSANSTALT FREIBURG 1990).

α -Naphtylamin sowie β -Naphtylamin konnten bei einer Nachweisgrenze von 100 ng/l in keiner der vermessenen Urinproben nachgewiesen werden. Neuere Arbeiten von Grimmer und Mitarbeiter (GRIMMER et al. 2000) zeigen jedoch, dass auch hier für die Naphtylamine eine Hintergrundbelastung besteht. Diese Arbeitsgruppe stellte mit einer sehr aufwendigen Analytik (Probenmaterial 200 ml) bei 48 Personen Ausscheidungen im Bereich von 35 ng/24h (Median) für β -Naphtylamin und 60 ng/24h (Median) für α -Naphtylamin fest. Obwohl 4-Aminobiphenyl (4-ABP) Bestandteil des Tabakrauches ist und die Messung von 4-ABP-Hämoglobinaddukten zur Objektivierung des Raucherstatus herangezogen werden kann, war es lediglich in einer Urinprobe zu quantifizieren. Der Grund hierfür scheint im Metabolismus dieser Substanz zu liegen, 4-ABP wird also im allgemeinen nicht unverändert mit dem Urin sondern über die Faeces ausgeschieden. Auch RIFFELMANN et al. (1995) fanden 4-ABP in nur einer Urinprobe. Sie erklären sich diese Beobachtung mit einem höheren Hämoglobin-Bindungs-Index dieser Substanz im Vergleich zu den meisten anderen Arylaminen (NEUMANN et al. 1988). GRIMMER et al. (2000) fanden auch hier bei der Allgemeinbevölkerung Hintergrundbelastungen im Median bei 37 ng/24h.

Signifikante Unterschiede in den Ausscheidungsraten für Anilin, o-, m- und p-Toluidin, sowie für 3,5-DCIA in Abhängigkeit vom Wohnort (Stadt / Land) konnten nicht festgestellt werden.

Die statistische Verknüpfung der Messwerte mit den anamnestischen Daten zeigte einen signifikanten Unterschied (Mann-Whitney-U-Test) in den Anilinausscheidungsraten zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Diese Differenzen sind als Zahlenwerte in Tabelle 14 und

graphisch in Abbildung 11 dargestellt. Während Nichtraucher im Median eine Ausscheidung von 1,33 μg Anilin pro Liter Urin zeigten, so lag dieser Median bei Rauchern mit 2,28 $\mu\text{g}/\text{l}$ fast doppelt so hoch. Allerdings überlappen die Anilinkonzentrationen von Rauchern und Nichtrauchern im gesamten Bereich, so dass man lediglich von einer inkrementell höheren Anilinbelastung von Rauchern gegenüber Nichtrauchenden sprechen kann. Die Hauptquellen für die innere Anilinbelastung sind bisher noch unbekannt. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass das aktive Rauchen einen nicht unerheblichen Anteil an der Anilin-Ausscheidung der Allgemeinbevölkerung darstellt. Als weitere Hauptexpositionsquellen für Anilin und seine Vorläufer werden Pestizidrückstände auf Nahrungsmitteln (ARNOLD 1993) und Lederprodukte (LEWALTER und NEUMANN 1998) angenommen. Für die drei Toluidine oder das 3,5-Dichloranilin wurde eine solche systematische Abhängigkeit vom Raucherstatus nicht festgestellt.

Einen hoch signifikanten Unterschied in den Ausscheidungsraten der drei Toluidine (Mann-Whitney-U-Test) fanden wir allerdings zwischen weiblichen und männlichen Probanden. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 14 dargestellt und werden für den Fall des p-Toluidins graphisch in Abbildung 11 veranschaulicht. Wie die entsprechenden Mediane verdeutlichen, scheidet die männliche Allgemeinbevölkerung größere Mengen an Toluidinen aus. Besonders auffällig ist dies für den Fall des p-Toluidins. Solche geschlechtsspezifischen Differenzen wurden bereits bei den renalen Ausscheidungen der Mononitrotoluol-Metabolite, d.h. der Toluidine, in Rattenexperimenten beobachtet (RICKERT und LONG 1981, CHISM und RICKERT 1985). Die Gründe hierfür sind bisher nicht bekannt.

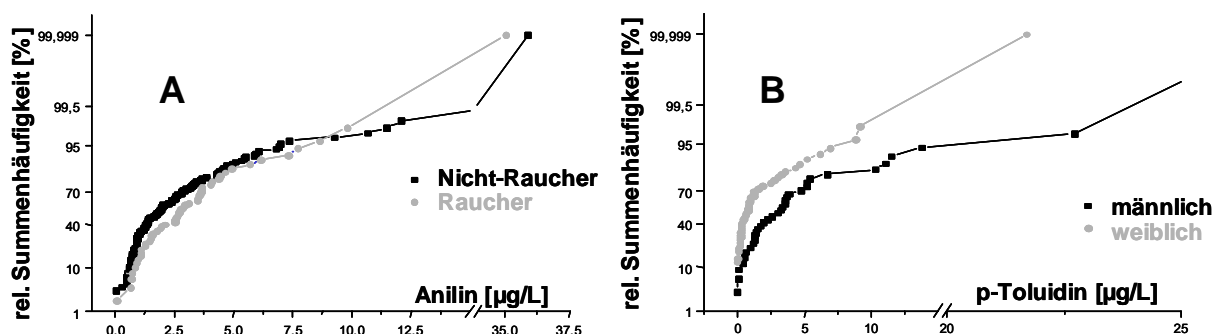


Abbildung 11: Vergleich Anilin: Raucher / Nicht-Raucher (A); geschlechtsspezifischer Unterschied in der Normalausscheidung von p-Toluidin (B)

Zu keinem der restlichen, abgefragten möglichen Einflussfaktoren zeigten sich systematische Auswirkungen auf die Ausscheidungsraten der untersuchten Parameter. Abschließend bleibt zu bemerken, dass die Höhe der in dieser Arbeit festgestellten inneren Belastung an Aminoaromaten nicht als unbedenklich angesehen werden kann. Es ist vielmehr von einer gleichgerichteten, additiven Wirkung dieser Verbindungen auszugehen. Unabdingbar notwendig erscheint es daher, genaue Quellen und Aufnahmewege für diese Belastung aufzuklären, um gegebenenfalls zu einer Reduktion der inneren Belastung gelangen zu können. Tabelle 17 und Abbildung 12 zeigen mögliche zivilisatorisch bedingte Quellen, über die der Mensch mit aromatischen Nitro- und Aminoverbindungen exponiert sein kann. Dazu gehören beispielsweise Pharmaka, Pestizide, Farbstoffe und Kosmetika. Die relativ homogene Verteilung der Metabolitenkonzentration des Anilins, der Toluidine und des 3,5-Dichloranilins (Stadt/Land), der regelmäßige Nachweis von entsprechenden Pflanzenschutzmitteln in Lebensmitteln durch die Landesuntersuchungsämter, sowie auch der Nachweis nicht-aminoaromatischer Pflanzenschutzmittel mit ähnlichen bzw. sogar

geringeren Aufwandmengen (Pyrethroide, Organophosphate etc. z.B.: Maroni et al. 2000; Hardt et al. 1999) geben starke Hinweise darauf, dass die Ausscheidungen an Anilin und der drei Toluidine hauptsächlich durch die Aufnahme von Pflanzenschutzmitteln, bzw. deren Metaboliten mit Lebensmitteln erfolgt. Dies wird indirekt auch durch ein Fallbeispiel (rein vegetarischer Ernährung) in HEUDORF 2000 gestützt. Hier wird berichtet über ein starkes Absenken von mit dem Harn ausgeschiedenen Pflanzenschutzmittelmetaboliten durch die Umstellung auf Lebensmittel aus pestizidfreiem Anbau. Für das 3,5-Dichloranilin scheint die Aufnahme über den Verzehr von Lebensmitteln gesichert. Es sind für diese Verbindung keine weiteren Anwendungen im breiten Maßstab offensichtlich.

	Quellen	Beispiele
Anilin/Nitrotoluol	Rauchen	
	Pharmaka	Novalgin; Phenylbutazon
	Pestizidrückstände	Carboxin, Chloridazon, Carbetamid, Propham, Desmedipham, Pencycuron
	<i>Kosmetika:</i> Farbstoffe	Pigment Red 64:1, Acid Orange 10; Acid Red 1 und 33, Disperse Yellow 16, Acid Yellow 11, Solvent Red 23 und
	Stabilisatoren	73, Acid Black 1, Disperse Violet 23/27, Basic Blue 26
	Oxidationshaarfärbemittel	Acetanilid, N-Phenyl-p-phenylendiamin und Salze
	Kugelschreiberminen	
	Lebensmittelfarbstoffe	Rot 2G
	Schwarzer Tee	
	Aquatische Umwelt	Oberflächengewässer, Deponiesickerwässer, Rüstungsalzlasten
Lederprodukte		
Toluidine	Rauchen	
	Pharmaka	Prilocain, Benzocain
	Aquatische Umwelt	Oberflächengewässer, Deponiesickerwässer, Rüstungsalzlasten
	<i>Kosmetika:</i> Farbstoffe	Solvent Violet 13 und 10, Solvent Green 3, Acid Violet 9
	Kugelschreiberminen	
	Schwarzer Tee	
	Pestizidrückstände	Phenmedipham, Tolyfluamid
3,5-Dichloranilin	Pestizidrückstände	Vinclozolin; Iprodion, Chlozolinat, Procymidon

Tabelle 17: Mögliche Quellen für die im Urin der Allgemeinbevölkerung gefundenen Aminoaromaten

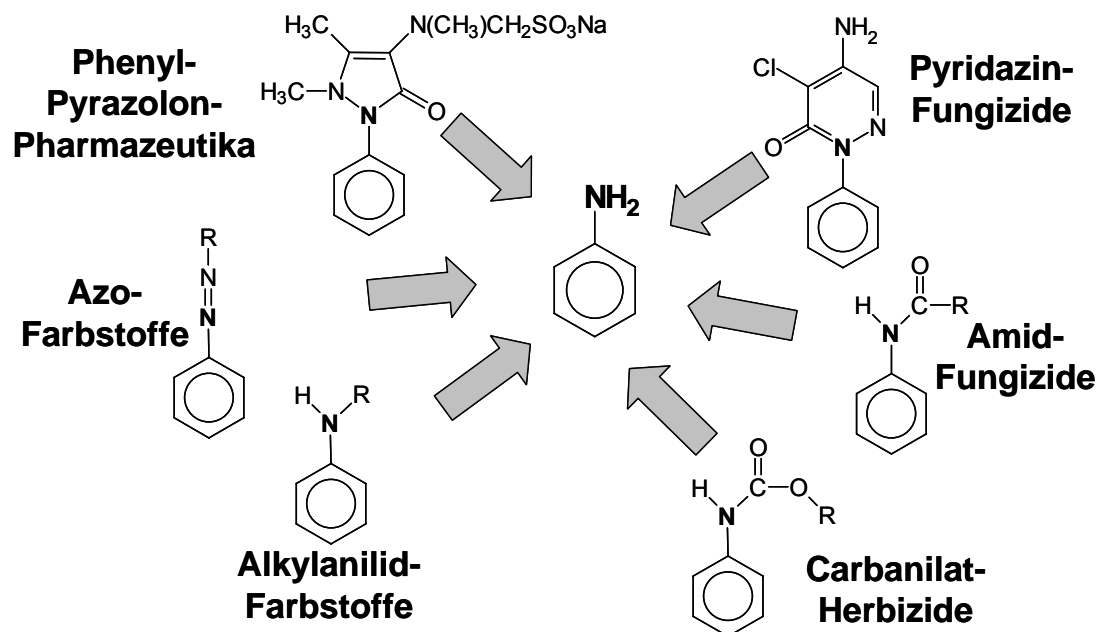


Abbildung 12: Mögliche Quellen am Beispiel Anilin

6 Ausblick

Die bisherigen Arbeiten haben u.a. gezeigt, dass die Allgemeinbevölkerung aromatische Amine bzw. deren metabolische Vorläufer in größerem Umfang aufnimmt, als bisher angenommen.

Es ist daher zu erforschen, ob nicht noch weitere krebserzeugende Aminoaromaten von der Allgemeinbevölkerung ausgeschieden werden. Notwendig ist zudem die Abschätzung eines mit dieser Belastung einhergehenden Krebsrisikos der Allgemeinbevölkerung.

Aus aktueller Literatur [PLATZEK et al. 1999] haben sich weitere Hinweise hinsichtlich einer generellen Belastung der Allgemeinbevölkerung mit aromatischen Aminen ergeben. Es handelt sich hierbei um Benzidin und seine Derivate, die aus in Kleidung befindlichen Farbstoffen durch die dermale Mikroflora freigesetzt werden können und anschließend über die Haut aufgenommen werden. Dies und die eigenen Ergebnisse bzgl. einer inneren Belastung mit aminoaromatischen Rückständen aus Pflanzenschutzmitteln (WEIß et al. 2000, Statusberichte 1999, 2000) waren Anlass, einen Folgeantrag beim FZK unter dem Thema „Belastung der Allgemeinbevölkerung mit aromatischen Aminoverbindungen – Der Einfluss von Ernährung und Bekleidung“ zu stellen. Die Finanzierung dieses Folgeantrags wurde vom Projektträger zum Januar 2001 gebilligt.

Da insbesondere im Zusammenhang mit der Hämoglobinaddukt-Analytik das vorhandene Probenmaterial (Blut) sehr knapp ist, wurde die Quantifizierung der Hb-Addukte zurückgestellt bis Klarheit über das nachzuweisende Substanzspektrum besteht und bis die analytischen Verfahren zu ihrer Bestimmung bezüglich ihrer Zuverlässigkeitskriterien geprüft sind. Im Rahmen der im Folgeantrag noch zu erweiternden Urinanalytik werden zudem die Parameter m- und p-Toluidin sowie 3,5-Dichloranilin auch bei den restlichen Probanden der Kollektive Allgemeinbevölkerung bestimmt.

7 Literatur

Die aus dieser Arbeit hervorgegangenen Publikationen sind fett gedruckt.

- AHLBORG et al. 1988 Ahlborg G. Jr, Einistö P., Sorsa M. (1988) Mutagenic activity and metabolites in the urine of workers exposed to trinitrotoluene (TNT). *Br J Ind Med.* 45(5):353-8.
- ANGERER & KÄFFERLEIN 1997** Angerer J., Käfferlein H.U. (1997) Gas chromatographic method using electron-capture detection for the determination of musk xylene in human blood samples, *J. Chrom. B*, 693, 71 - 78
- ANGERER & WEISMANTEL 1998** Angerer J., Weismantel A. (1998) Biological Monitoring of dinitrotoluene by gas-chromatographic-mass spectrometric analysis of 2,4-dinitrobenzoic acid in human urine, *J. Chrom. B*, 713, 313 - 322
- ANGERER et al. 1994 Angerer J., Mannschreck Ch., Peters M., Lehnert G. (1994) o-Nitrophenol-Ausscheidung von akzidentiell belasteten und unbelasteten Kindern, *Verhandlungen der DGAUM*, 34. Jahrestagung, Gentner Verlag Stuttgart, 117 - 121
- ASCHE & RICHARD 1994 Asche W., Richard H.P. (1994) *Chemische Rundschau* 45,1
- Bader et al. 1996** Bader M., Kraus Th., Letzel S., Müller J., Weihrauch M., Angerer J. (1996) Biomonitoring von Nitrotoluolen und deren Metaboliten im Harn, Dokumentationsband über die Verhandlung der DGAUM, 36. Jahrestagung, Rindt Druck, Fulda, 219 - 223
- Bader et al. 1998** Bader M., Göen T., Müller J., Angerer J. (1998) Analysis of nitroaromatic compounds in urine by gas chromatography-mass spectrometry for the biological monitoring of explosives, *J. Chrom. B*, 710, 91 - 99
- BOOPATHY & KULPA 1993 Boopathy R., Kulpa C.F. (1993) Nitroaromatic compounds serve as nitrogen source for *Desulfovibrio* sp. (B strain). *Can J Microbiol.* 39(4):430-3.
- BOOPATHY 2000 Boopathy R. (2000) Formation of aniline as a transient metabolite during the metabolism of tetryl by a sulfate-reducing bacterial consortium. *Curr Microbiol.* 40(3):190-3.
- CHEMISCHE LANDESUNTERSUCHUNGSANSTALT FREIBURG 1990 Jahresberichte 1986 – 1990 der Chemischen Untersuchungsanstalt Freiburg 1990
- Chism & Rickert 1985 Chism JP, Rickert DE. (1985) Isomer- and sex-specific bioactivation of mononitrotoluenes. Role of enterohepatic circulation. *Drug Metab Dispos*;13(6): 651-657.
- DeBruin et al. 1999 DeBruin LS., Pawliszyn JB., Josephy PD. (1999) Detection of Monocyclic Aromatic Amines, Possible Mammary Carcinogens, in Human Milk, *Chem Res Toxicol* 12(1) 78-82
- EHRENBERG et al. 1974 L. Ehrenberg, K.D. Hiesche, S. Ostermann-Golkar, I. Wennberg. (1974) Evaluation of the genetic risks of alkylating agents: tissue doses in the mouse from air contaminated with ethylene oxide. *Mutat. Res.* 24, 83-103

- GRIMMER et al. 2000 Grimmer G, Dettbarn G, Seidel A, Jacob J. (2000) Detection of carcinogenic aromatic amines in the urine of non-smokers. *Sci. Total Environ.* 247(1):81-90.
- HARDT et al. 1999 Hardt J., Heudorf U., Angerer J. (1999) Zur Frage der Belastung der Allgemeinbevölkerung durch Pyrethroide. *Umweltmed Forsch Prax* 4 (1)
- HEUDORF & PETERS 1994 Heudorf U., Peters M. (1994) Human biomonitoring after a severe chemical accident - results of a study after the Hoechst AG chemical spill 22 February 1993, *Gesundheitswesen* 56(10) 558-62
- HEUDORF 2000 Heudorf U. (2000) Hohe Konzentration von Organophosphatmetaboliten im Urin durch Verzehr großer Mengen Obst? – Eine Kasuistik *Umweltmed. Forsch. Prax.* (4) 189-191
- LEWALTER & NEUMANN 1998 Lewalter J, Neumann HG. (1998) Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte (Biomonitoring) Teil XIII – Die Bedeutung von Referenzwerten für die Bewertung von Fremdstoffbelastungen. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed*; 33: 388-393.
- LIU et al. Liu YY, Yao M, Fang JL, Wang YW. (1995) Monitoring human risk and exposure to trinitrotoluene (TNT) using haemoglobin adducts as biomarkers. *Toxicol Lett.* 77(1-3):281-7.
- MARONI et al. 2000 Maroni M, Colosio C, Ferioli A, Fait A. (2000) Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. *Toxicology* 7;143(1):1-118
- NEUMANN 1984 Neumann HG. (1984) Analysis of hemoglobin as a dose monitor for alkylating and arylating agents. *Arch. Toxicol.* 56, 1-6
- NEUMANN et al. 1995 Neumann HG., van Dorp C., Zwirner-Baier I. (1995) The implications for risk assessment of measuring the relative contribution to exposure from occupation, environment and lifestyle: hemoglobin adducts from amino- and nitro-arenes, *Toxicol Lett* 82-83, 771-778
- PLATZEK ET AL. 1999 Platzeck T, Lang C, Grohmann G, Gi US, Baltés W. (1999) Formation of a carcinogenic aromatic amine from an azo dye by human skin bacteria in vitro. *Hum Exp Toxicol.* 18(9):552-9
- RICKERT & LONG 1981 Rickert DE, Long RM. (1981) Metabolism and excretion of 2,4-dinitrotoluene in male and female Fischer 344 rats after different doses. *Drug Metab Dispos*; 9(3):226-232.
- RIFFELAMNN et al. 1995 Riffelmann M, Müller G, Norpoth K, Popp W, Schmieding W. Biomonitoring of urinary aromatic amines and arylamine hemoglobin adducts in exposed workers and non-exposed control persons. *Int Arch Occup Environ Health* 1995; 68: 36-43.
- Ringe et al. 1988 Ringe D., Turesky R.J., Skipper P.L., Tannenbaum S.R. (1988) Structure of the single stable hemoglobin adduct formed by 4-aminobiphenyl in vivo. *Chem. Res. Toxicol.* 1, 22-24
- Schneider et al. 1994 Schneider K., Hassauer M., Kaberlah F. (1994) Toxikologische Bewertung von Rüstungsalftlasten, UWSF –U. *Umweltchem. Ökotox.* 6, 333 - 340
- SKIPPER & TANNENBAUM 1990 Skipper P.L., Tannenbaum S.R. (1990) Protein adducts in the molecular dosimetry of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 11 (4), 507-518

- TEASS et al 1993 Teass AW, Brown KK, Cheever KL, Dankovic D, DeBord DG, Savage RE, Stettler LE, Ward E, Weigel WW. Biological monitoring for occupational exposures to o-toluidine and aniline. *Int Arch Occup Environ Health* 1993; 65: 115-118.
- TØRNQVIST & LANDIN 1995 Tørnqvist M., Landin H.H. (1995 Hemoglobin adducts for in vivo dose monitoring and cancer risk estimation. *J. Occup. Environ. Med.* 37(9),1077-1085)
- WEIß et al. 2000** Weiß T.; Ewers U.; Flieger A.; Angerer J. (2000) Innere Belastung der Allgemeinbevölkerung mit Amino- und Nitroaromatischen Verbindungen. *Umweltmed. Forsch. Prax.* 5 (2), 101 – 106
- WILL 1995 Will W. (1995) Determination of vinclozolin metabolites in human urine by HPLC and electrochemical detection. *Fresenius J Anal Chem* 1995; 353: 215-218
- WOOLLEN et al. 1985 Woollen BH., Hall MG., Craig R., Steel GT. (1985) Dinitrotoluene: an assessment of occupational absorption during the manufacture of blasting explosives, *Int Arch Occup Environ Health* 55(4) 319-30

Danksagung

Wir danken dem Forschungszentrum Karlsruhe GmbH für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit (PUG U97009). Weiterhin möchten wir Prof. Dr. U. Ewers vom Hygiene-Institut des Ruhrgebiets für die Organisation eines Teils der Kollektive danken.