

**Belastung der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland durch nitroaromatische Verbindungen  
- Der Einfluss von Ernährung und Bekleidung -**

**Tobias Weiß und Jürgen Angerer**

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

Förderkennzeichen: BWB 20007

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

November 2004

# **Inhaltsverzeichnis**

---

## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Aromatische Amine</b>	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Eigenschaften aromatischer Amine</b>	<b>10</b>
<b>3.2</b>	<b>Vorkommen und Verwendung</b>	<b>12</b>
<b>3.3</b>	<b>Aufnahme, Verteilung, Metabolismus</b>	<b>19</b>
<b>3.4</b>	<b>Toxikologie</b>	<b>25</b>
3.4.1	Aromatische Amine und Blasenkrebs	26
<b>4</b>	<b>Kollektive und Methoden</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Kollektive</b>	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>Bestimmung aromatischer Amine im Urin</b>	<b>28</b>
4.2.1	Grundlage des Verfahrens	28
4.2.2	Geräte, Chemikalien und Lösungen	28
4.2.2.1	Geräte	28
4.2.2.2	Chemikalien	29
4.2.2.3	Lösungen	30
4.2.2.4	Vergleichsstandards	31
4.2.2.5	Qualitätskontrollmaterial	33
4.2.2.6	Interne Standards	33
4.2.3	Probennahme und Probenvorbereitung	33
4.2.3.1	Probenname und Lagerung	33
4.2.3.2	Probenaufarbeitung	34
4.2.4	Gaschromatographisch-massenspektroskopische Arbeitsbedingungen	35
4.2.5	MS – Arbeitsbedingungen	35
4.2.6	Analytische Bestimmung	36
4.2.7	Kalibrierung	38
4.2.8	Berechnung des Analysenergebnisses	38
4.2.9	Standardisierung und Qualitätssicherung	38
4.2.10	Beurteilung des Verfahrens	39
4.2.10.1	Präzision	39
4.2.10.2	Richtigkeit	40

## ***Inhaltsverzeichnis***

---

4.2.10.3	Nachweisgrenzen	41
4.2.10.4	Störeinflüsse	41
4.2.11	Diskussion der Methode	43
<b>4.3</b>	<b>Bestimmung von Cotinin im Urin</b>	<b>49</b>
<b>4.4</b>	<b>Bestimmung aromatischer Amine im Blut als Addukte am Hämoglobin</b>	<b>49</b>
4.4.1	Grundlage des Verfahrens	49
4.4.2	Geräte, Chemikalien und Lösungen	50
4.4.2.1	Geräte	50
4.4.2.2	Chemikalien	51
4.4.2.3	Lösungen	52
4.4.2.4	Vergleichsstandards	52
4.4.2.5	Interne Standards	54
4.4.3	Probennahme und Probenvorbereitung	55
4.4.3.1	Probenahme	55
4.4.3.2	Lagerung	55
4.4.3.3	Erythrozytenisolierung	56
4.4.3.4	Hämoglobin-Isolierung	56
4.4.3.5	Probenaufarbeitung	57
4.4.4	Gaschromatographisch-massenspektroskopische Arbeitsbedingungen	58
4.4.5	MS – Arbeitsbedingungen	59
4.4.6	Analytische Bestimmung	59
4.4.7	Kalibrierung	61
4.4.8	Berechnung des Analysenergebnisses	62
4.4.9	Standardisierung und Qualitätssicherung	62
4.4.10	Beurteilung des Verfahrens	62
4.4.10.1	Präzision	62
4.4.10.2	Richtigkeit	64
4.4.10.3	Nachweisgrenzen	65
4.4.10.4	Störeinflüsse	65
4.4.11	Diskussion der Methode	66
<b>4.5</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>74</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>74</b>
<b>5.1</b>	<b>Biological Monitoring</b>	<b>74</b>

## ***Inhaltsverzeichnis***

---

5.1.1	Einflussfaktor Tabakrauchen	79
5.1.2	Einflussfaktor Ernährung	82
5.1.3	Einflussfaktor Bekleidung	84
5.1.4	Weitere Einflussfaktoren	84
<b>5.2</b>	<b>Biochemical Effect Monitoring</b>	<b>85</b>
5.2.1	Einflussfaktor Tabakrauchen	90
5.2.2	Einflussfaktor Ernährung	94
5.2.3	Einflussfaktor Bekleidung	95
5.2.4	Weitere Einflussfaktoren	95
<b>5.3</b>	<b>Korrelation Biochemical Effect Monitoring, Biological Monitoring</b>	<b>96</b>
<b>5.4</b>	<b>Quellenbetrachtung und Modellrechnung</b>	<b>99</b>
5.4.1	Aromatische Amine und Tabakrauch (Anilin, Toluidine, o-Anisidin, 4ADP, 2NA)	104
5.4.2	Aromatische Amine und Pflanzenschutzmittel (Monochloraniline, Dichloraniline, Anilin, Toluidine)	108
<b>5.5</b>	<b>HERP-Index</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>127</b>
<b>8.1</b>	<b>Expositionskontrolle</b>	<b>127</b>
8.1.1	Ambient Monitoring	128
8.1.2	Biological Monitoring	129
8.1.2.1	Dosismonitoring	130
8.1.2.2	Biochemisches Effektmonitoring	131
8.1.2.3	Biologisches Effektmonitoring	133
8.1.2.4	Biochemisches Effektmonitoring unter Verwendung von Hämoglobin-Addukten im Blut	133
<b>8.2</b>	<b>Einzelbefunde</b>	<b>135</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

---

### Abkürzungsverzeichnis

2NA	2-Naphtylamin
34DCIA	3,4-Dichloranilin
35DCIA	3,5-Dichloranilin
3BrA	3-Bromanilin
3CIA	3-Chloranilin
4ADP	4-Aminodiphenyl
4CIA	4-Chloranilin
A	Anilin
AA	Aromatische Amine
ADI	Acceptable daily intake
BAT	Biologischer Arbeitsstofftoleranzwert
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (Jetzt Bundesamt für Risikobewertung (BfR))
BLW	Biologischer Leitwert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTA	Duldbare tägliche Aufnahme
ECD	Elektroneneinfangdetektor
ED	Elektrochemischer Detektor
EI	Elektronenstoßionisation
EKA	Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie, Gaschromatograph
HFBA	Heptafluorbuttersäureanhydrid
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie
IS	Interner Standard
KG	Körpergewicht
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MS	Massenspektroskopie
MSD	Massenselektiver Detektor
m-T	m-Toluidin, 2-Methylanilin
MW	Mittelwert

## **Abkürzungsverzeichnis**

---

n	Anzahl
NAT	<i>N</i> -Acetyltransferase
NCI	Negative chemische Ionisation
o-A	o-Anisidin, 2-Methoxyanilin
o-T	o-Toluidin, 1-Methylanilin
PFPA	Pentafluorpropionsäureanhydrid
PSM	Pflanzenschutzmittel
p-T	p-Toluidin, 3-Methylanilin
RT	Raumtemperatur
SIM	Single Ion Monitoring
SPE	Festphasenextraktion
TRGS	Technische Richtlinie für Gefahrstoffe
TRK	Technische Richtkonzentration
TIC	Total Ion Count
UBA	Umweltbundesamt

### **1 Einleitung**

Durch militärische Altlasten, durch Aktiv- und Passivrauchen, durch Kfz-Emissionen, durch Aufnahme von Pflanzenschutzmitteln mit Nahrungsmitteln und dergleichen mehr nimmt die Allgemeinbevölkerung oder Teile davon aromatische Amine bzw. aromatische Nitroverbindungen bzw. deren metabolische Vorläufer auf.

Aromatischen Nitro- und Aminoverbindungen kommt seit über 100 Jahren eine Schlüsselstellung in der organischen Chemie zu. Über sie als Zwischenprodukte ist eine Vielzahl von Substanzen zugänglich, die Anwendung finden als Farbstoffe, Pflanzenschutzmittel (z.B. Vinclozolin, Phenmedipham), Pharmaka (z.B. Paracetamol, Lidocain), Kunststoffe (Polyurethane) und auch als Explosivstoffe (TNT, Dinitrotoluole).

Obwohl Nitroaromaten in der Regel aber keine Endprodukte der chemischen Industrie darstellen, zeigten neuere Untersuchungen, dass eine Reihe von Nitroaromaten bzw. deren Metaboliten bei Normalpersonen im Harn oder in Form von Hämoglobin-Addukten in unterschiedlichen Konzentrationen nachweisbar sind (z.B. Angerer et al. 1994, Heudorf et al 1994, Neumann et al. 1995). Aufnahmewege und Expositionsquellen sind hier noch weitestgehend unbekannt. Diese Untersuchungen lassen darauf schließen, dass der Mensch in größerem Umfang als bisher angenommen mit aromatischen Nitro- und Aminoverbindungen in Kontakt kommt. Dies ist aufgrund der Toxizität und des mutagenen Potentials etlicher Amino- und Nitroaromaten von großer umweltmedizinischer Bedeutung. Eine Vielzahl aromatischer Amine (z.B. Anilin, Toluidine, Naphtylamine, 4-Aminobiphenyl, etc.) sind integrale Bestandteile des Tabakrauchs. Auch wurden aromatische Amine in der Außen- als auch Innenluft in ländlichen und städtischen Gegenden Italiens ubiquitär nachgewiesen (z.B. Palmiotto et al. 2001). Zudem wurden Anilin und o-Toluidin in der Muttermilch kanadischer Frauen gefunden (DeBruin et al. 1999). Darüber hinaus enthält eine Vielzahl in Deutschland zugelassener und teilweise in großen Mengen angewandter Pflanzenschutzmittel aromatische Amine als Strukturbestandteile.

### **2 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel des Vorhabens ist die Anwendung valider Verfahren des Biologischen Monitorings und des Biochemischen Effektmonitorings von umweltbedingten und anthropogenen Belastungen gegenüber Aminoaromaten auf Personen unterschiedlicher regi-

## **Zielsetzung der Arbeit**

---

onaler Herkunft und unterschiedlicher Lebensgewohnheiten. Dabei sollen entsprechende Substanzen identifiziert und deren Grundausscheidung quantifiziert werden. Unsere bisherigen Ergebnisse konnten zeigen, dass Pflanzenschutzmittelrückstände in und auf Nahrungsmitteln eine Expositionsquelle für den Menschen darstellen können. Weitere Informationen hierzu liegen kaum vor. Ziel ist es daher eine solche Belastung ausgehend von unterschiedlichsten aminhaltigen Pestiziden und Bioziden zu objektivieren. Des Weiteren sollen entsprechende Kenntnislücken auf dem Gebiet der aminhaltigen Azo-Farbstoffe aus Textilien, Lederprodukten und Bedarfsgegenständen geschlossen werden.

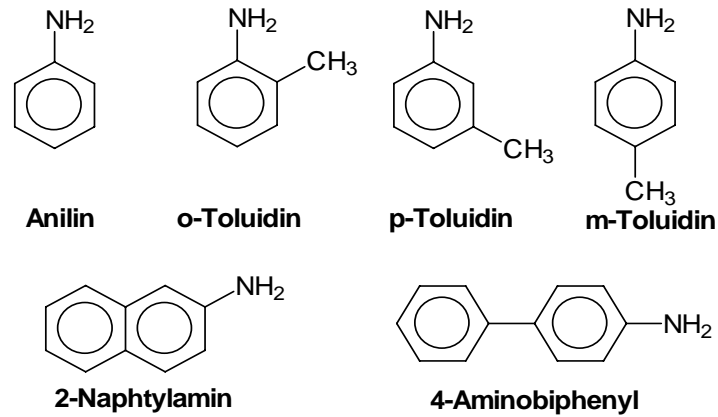
Die Anwendung von Biomonitoringverfahren erlaubt es schließlich, tatsächlich vom Menschen aufgenommene biorelevante Mengen zu quantifizieren (Zur Rolle des Biomonitoring im Rahmen der Expositionskontrolle siehe Anhang). Dies ist durch die alleinige Bestimmung in Lebensmitteln bzw. Kleidungsstoffen nicht möglich. Die Ergebnisse hierzu könnten schließlich Grundlage für die Abschätzung eines von Pflanzenschutzmitteln sowie von Bekleidungsfarbstoffen und Lederprodukten ausgehenden Risikos für die Allgemeinbevölkerung darstellen. Hier soll der sog. HERP-Index Anwendung finden.

Die Untersuchungsparameter sind in den Abbildungen 1-3 zu finden. Hierzu zählen aus dem Bereich „Lifestyle und Umwelt“ Anilin, ortho-, meta- und para-Toluidin, 2-Naphtylamin, sowie das 4-Aminobiphenyl. Im Rahmen des Projekts wurden darüber hinaus aus dem Bereich „Ernährung und Bekleidung“ die Parameter o-Anisidin, 3- und 4-Chloranilin, 4-Bromanilin, 3,4-Dichloranilin, 3,5-Dichloranilin, 4-Isopropylanilin, 2,4- und 2,6-Dimethylanilin sowie 2,4-Difluoranilin bearbeitet. Ebenso wurden in Azo-Farbstoffen enthaltene zweikernige, bifunktionelle aromatische Amine untersucht.

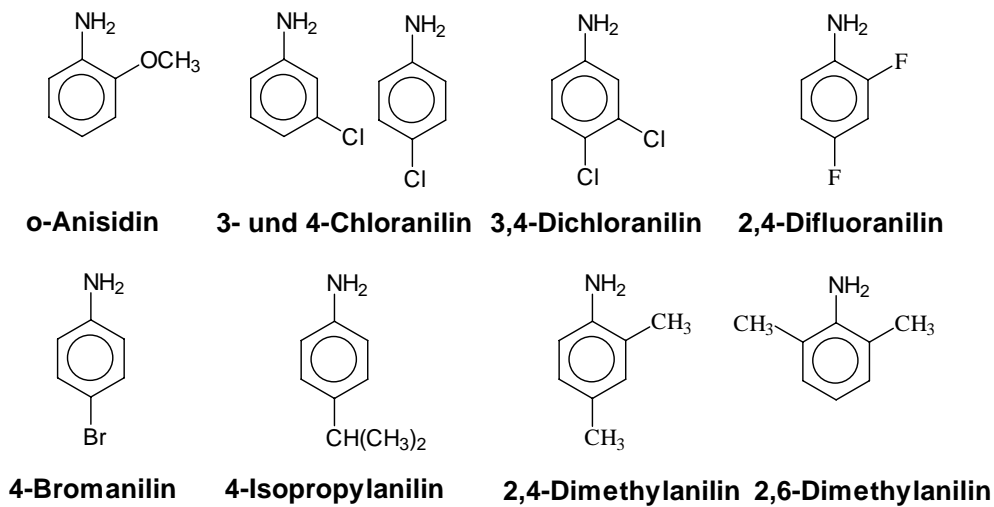
Von den untersuchten Parametern sind 4-Aminobiphenyl, 2-Naphtylamin, o-Toluidin, 4-Chloranilin, o-Anisidin sowie Benzidin und seine Abkömmlinge Substanzen, die beim Menschen Krebs erzeugen können (DFG 2003). Für Anilin und para-Toluidin gibt es aus in-vitro und/oder Tierversuchen (DFG 2003) Anhaltspunkte für eine krebserzeugende Wirkung beim Menschen (siehe auch Tabelle 7).



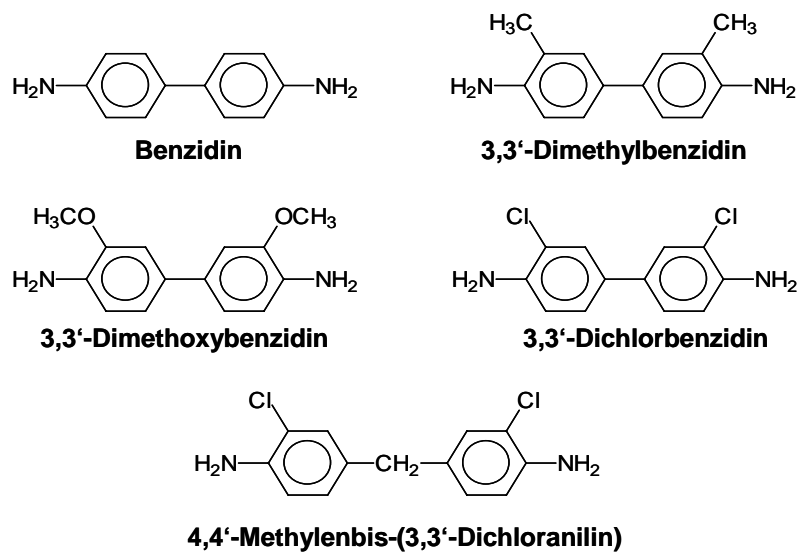
## Zielsetzung der Arbeit



**Abbildung 1:** Tabakrauch-assoziierte Untersuchungsparameter



**Abbildung 2:** Untersuchungsparameter: mögliche Pflanzenschutzmittel-Metabolite (o-Anisidin sowie die Dimethylaniline wurden ebenfalls im Tabakrauch nachgewiesen)



**Abbildung 3:** Untersuchungsparameter Azo-Farbstoff-Metabolite

### 3 Aromatische Amine

#### 3.1 Eigenschaften aromatischer Amine

In den nachfolgenden Kapiteln finden sich ausgewählte Angaben zu denjenigen aromatischen Aminen, die im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet. Das Spektrum reicht dabei von unterschiedlich substituierten, monofunktionellen, monocyclischen Aminoaromaten, über monofunktionelle, bicyclische Aromaten bis hin zu bifunktionellen zweikernigen Aminoaromaten.

**Tabelle 1:** Physikalisch-chemische Daten ausgewählter aromatischer Amine

<b>Einkernige Aminoaromaten</b>					
	<b>Anilin</b>	<b>o-Toluidin</b>	<b>m-Toluidin</b>	<b>p-Toluidin</b>	<b>o-Anisidin</b>
CAS-Nr.	62-53-3	95-53-4	108-44-1	106-49-0	90-04-0
Aggregatzustand	flüssig	flüssig	flüssig	fest	flüssig
Farbe	farblos	farblos	farblos/gelblich	farblos/gelblich	gelblich
rel. Molekülmasse	93,13 g/mol	107,16 g/mol	107,16 g/mol	107,16 g/mol	123,15 g/mol
Schmelzpunkt	-5,98 °C	-16 °C	-31,5 °C	45 °C	6,22 °C
Siedepunkt	184,4 °C	200,3 °C	203,4 °C	200,5 °C	224 °C
Löslichkeit in H <sub>2</sub> O	löslich	wenig löslich	wenig löslich	schwer löslich	wenig löslich
Dampfdruck 20 °C	3,14 mbar	0,18 mbar	0,2 mbar	0,2 mbar	0,05 mbar
Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	1,02173	0,9989	0,99	1,05	1,0923
pKs	4,61	4,53	4,81	5,15	4,52
<b>Einkernige halogenierte Aminoaromaten</b>					
	<b>3-Chloranilin</b>	<b>4-Chloranilin</b>	<b>3,4-Dichloranilin</b>	<b>3,5-Dichloranilin</b>	
CAS-Nr.	108-42-9	106-47-8	95-76-1	626-43-7	
Aggregatzustand	flüssig	fest	fest	fest	
Farbe	farblos/gelblich	farblos/gelblich	farblos	farblos	
rel. Molekülmasse	127,57 g/mol	127,57 g/mol	162,02 g/mol	162,02 g/mol	
Schmelzpunkt	-10,4 °C	72,5 °C	72,5 °C	52 °C	
Siedepunkt	230,5 °C	232,3 °C	272 °C	1,58	
Löslichkeit in H <sub>2</sub> O	schwer löslich	schwer löslich	schwer löslich	sehr schwer löslich	
Dampfdruck 20 °C	0,03 mbar	0,014 mbar	0,1 mbar	30 mbar bei 150 °C	
Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	1,22	1,429	1,37	1,58	
pKs	3,46	4,05	2,97	2,51	

## Aromatische Amine

<b>Mehrkernige Aminoaromaten</b>			
	<b>2-Naphtylamin</b>	<b>4-Aminodiphenyl</b>	<b>Benzidin</b>
CAS-Nr.	91-59-8	92-67-1	98-87-5
Aggregatzustand	fest	fest	fest
Farbe	farblos/rötlich	farblos	farblos bis leicht rötlich
rel. Molekülmasse	143,19 g/mol	169,23 g/mol	184,24 g/mol
Schmelzpunkt	110,2 °C	55 °C	128 °C
Siedepunkt	306,1 °C	302 °C	402 °C
Löslichkeit in H <sub>2</sub> O	schwer löslich	unlöslich	wenig löslich
Dampfdruck 20 °C	0,007 mbar	20 mbar bei 191 °C	k.A.
Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	1,220	1,16	1,251
pKs	3,89	4,38	k.A.
	<b>3,3'-Dimethylbenzidin</b>	<b>3,3'-Dimethoxybenzidin</b>	<b>3,3'-Dichlorbenzidin</b>
CAS-Nr.	119-93-7	119-90-4	91-94-1
Aggregatzustand	fest	fest	fest
Farbe	farblos bis bräunlich	braun	hellbraun-violett
rel. Molekülmasse	212,29 g/mol	244,29 g/mol	253,13 g/mol
Schmelzpunkt	129 °C	137 °C	132,4°C
Siedepunkt	200°C	zersetzt sich	zersetzt sich
Löslichkeit in H <sub>2</sub> O	schwer löslich	unlöslich	schwer löslich
Dampfdruck 20 °C	k.A.	k.A.	k.A.
Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	1,0	k.A.	k.A.
pKs	k.A.	k.A.	k.A.
	<b>4,4'-Methylenbis-(2-chloranilin)</b>		
CAS-Nr.	101-14-4		
Aggregatzustand	fest		
Farbe	farblos		
rel. Molekülmasse	267,16 g/mol		
Schmelzpunkt	110 °C		
Siedepunkt	zersetzt sich		
Löslichkeit in H <sub>2</sub> O	schwer löslich		
Dampfdruck 60 °C	0,0017 mbar		
Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	1,44		
pKs	k.A.		

### **3.2 Vorkommen und Verwendung**

Die Stoffgruppe der aromatischen Amine spielt eine wichtige Rolle in vielen chemisch-industriellen Prozessen z.B. bei der Herstellung von Farbstoffen, Pharmazeutika (z.B. Paracetamol, Lidocain), Kunststoffen (Polyurethane), Gummiprodukten und Pflanzenschutzmitteln (z.B. Vinclozolin, Phenmedipham). Dabei ist die Rolle der aromatischen Amine auch eng verknüpft mit ihren Nitroanaloga. In der Regel treten die aromatischen Amine oder Nitroverbindungen nur als Zwischenprodukte in den entsprechenden Prozessen auf. Allerdings gibt es auch einige Beispiele des direkten Einsatzes aromatischer Amine in Verbrauchsprodukten (z.B. Schuhcremes, Tinten) bzw. als Endprodukte (z.B. Sprengstoffe: TNT, Dinitrotoluole).

Eine Vielzahl aromatischer Amine (z.B. Anilin, Toluidine, Naphtylamine, 4-Aminobiphenyl, etc.) sind integrale Bestandteile des Tabakrauchs (Tabelle 3). Dabei besteht eine klare Abhängigkeit zwischen dem Gehalt der Amine und dem Teergehalt einer Zigarette, Light-Zigaretten weisen im Hauptstromrauch in der Regel geringerer Amin-Konzentrationen auf herkömmliche Filterzigaretten (Stabbert et al. 2003, Luceri et al. 1993).

Auch wurden aromatische Amine in der Außen- als auch Innenluft in ländlichen und städtischen Gebieten ubiquitär nachgewiesen (Tabelle 2).

Darüber hinaus enthält eine Vielzahl in Deutschland zugelassener und teilweise in großen Mengen angewandter Pflanzenschutzmittel (PSM) aromatische Amine als Strukturbestandteile (Tabelle 4). Weitere Hinweise auf Expositionsquellen sind in Tabelle 5 zu finden.

Von etwa 4000 im Colour-Index gelisteten Farbstoffen gehören etwa 50% zur Gruppe der Azo-Farbstoffe. Etwa 500 Farbstoffe werden auf der Basis von krebserzeugenden Aminen hergestellt. Ca. 150 Aminhaltige sind auch heute noch kommerziell erhältlich. Nach unserer Kenntnis sind derzeit etwa 800 Farbmittel für Textilien in Verwendung. Obwohl seit Ende 1996 nach der Bedarfsgegenständeverordnung (BGVO) die Verwendung von Azo-Farbstoffen, die krebserregende aromatische Amine abspalten können in Deutschland untersagt ist, muss davon ausgegangen werden, dass in importierten Textilien und Lederprodukten problematische Farbstoffe enthalten sind. Auch gelten hier Übergangsfristen. Zusätzlich können auch Kosmetika und Bedarfsgegenstände wie z.B. Kinderspielzeug aminhaltige Farbstoffe freisetzen. In

## Aromatische Amine

den Medien wird immer wieder darüber berichtet, bisher liegen Daten zur Belastung des Menschen aber nicht vor.

Informationen aus Untersuchungsämtern zufolge werden trotz des Verbots von 1996 regelmäßig entsprechende Azo-Farbstoffe in Textilien, Lederprodukten und weiteren Bedarfsgegenständen nachgewiesen.

**Tabelle 2:** Aromatische Amine in Innenräumen und der Außenluft in ng/m<sup>3</sup> (MW = Mittelwert)

<i>ng/m<sup>3</sup></i>	<i>Innenraum</i>	<i>Außenluft</i>	<i>Referenz</i>
<b>Anilin</b>	20-193	14,6	Luceri et al. 1993
	<10 -1700	<50 - 420	Palmiotto et al. 2000
	MW:11	MW:11	Zhu und Aikawa 2004
	Max: 54		
<b>o-Toluidin</b>	3-17	2,5	Luceri et al. 1993
	23	7	Palmiotto et al. 2000
<b>m-Toluidin</b>	0,15-21	<NWG	Luceri et al. 1993
	12	19	Palmiotto et al. 2000
<b>p-Toluidin</b>	<NWG-11,3	<NWG	Luceri et al. 1993
	9	21	Palmiotto et al. 2000
<b>4-Aminodiphenyl</b>	<NWG-0,2	<NWG	Luceri et al. 1993
	-	<1	Palmiotto et al. 2000
<b>2-Naphtylamin</b>	<NWG-0,47	<NWG	Luceri et al. 1993
	-	<1	Palmiotto et al. 2000

**Tabelle 3:** Aromatische Amine im Tabakrauch in ng/Zigarette

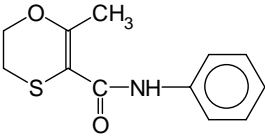
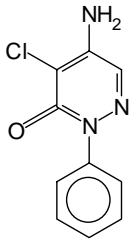
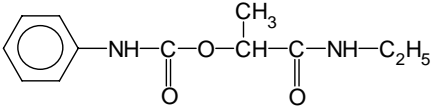
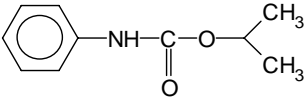
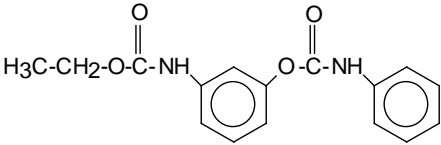
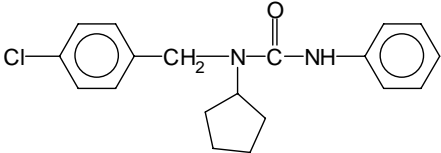
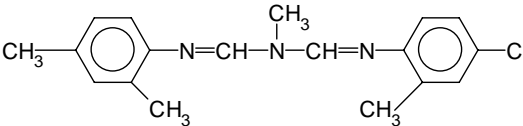
<i>ng/Filterzigarette</i>	<i>Hauptstrom- rauch</i>	<i>Nebenstrom- rauch</i>	<i>Referenz</i>
<b>Anilin</b>	364	1080	Patrianakos und Hoffmann 1979
	252-331	-	Smith et al. 2003
	35-563	-	Forhand et al. 2000
	120-300	9500-17000	Luceri et al. 1993
<b>o-Toluidin</b>	161	3030	Patrianakos und Hoffmann 1979
	30-200	3000	Hoffmann und Wynder 1994
	42-50	-	Smith et al. 2003
	9-144	-	Stabbert et al. 2003
	6-96	-	Forhand et al. 2000
	30-110	2000-3200	Luceri et al. 1993
	32-162	3300	Bolm-Audorf 1992

## Aromatische Amine

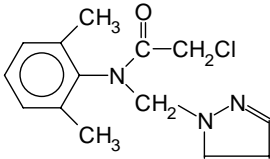
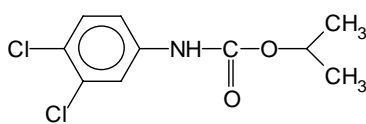
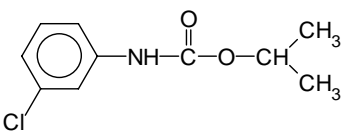
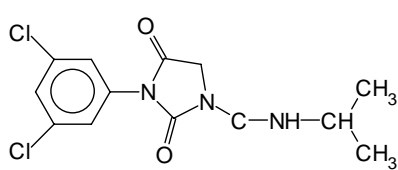
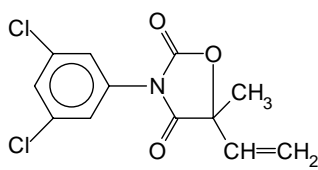
<i>ng/Filterzigarette</i>	<i>Hauptstrom- rauch</i>	<i>Nebenstrom- rauch</i>	<i>Referenz</i>
<b><i>m-Toluidin</i></b>	30	2080	Patrianakos und Hoffmann 1979
	46-55	-	Smith et al. 2003
	8-135	-	Forhand et al. 2000
	25-45	1100-2900	Luceri et al. 1993
<b><i>p-Toluidin</i></b>	34	1730	Patrianakos und Hoffmann 1979
	30-42	-	Smith et al. 2003
	7-112	-	Forhand et al. 2000
	14-26	580-2400	Luceri et al. 1993
<b><i>o-Anisidin</i></b>	0,5-5,1	-	Stabbert et al. 2003
<b><i>4-Aminodiphenyl</i></b>	5	143	Patrianakos und Hoffmann 1979
	2-5	140	Hoffmann und Wynder 1994
	2	-	Smith et al. 2003
	0,3-2,3	-	Stabbert et al. 2003
	1-13	-	Forhand et al. 2000
	0,1-0,4	3,5-6,9	Luceri et al. 1993
	2,4-4,6	143	Bolm-Audorf 1992
<b><i>2-Naphtylamin</i></b>	1-22	70	Hoffmann und Wynder 1994
	1,7	67	Patrianakos und Hoffmann 1979
	1,5-14,0	-	Stabbert et al. 2003
	2-24	-	Forhand et al. 2000
	1,3-2,5	19-35	Luceri et al. 1993
	1,0-1,7	67	Bolm-Audorf 1992

## Aromatische Amine

**Tabelle 4:** PSM, die aromatische Amine freisetzen können; jährliche Aufwandmengen in Deutschland nach Industrieverband Agrar 1999

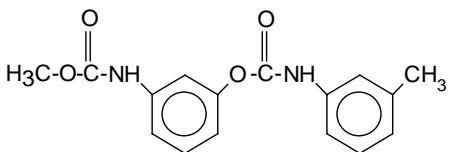
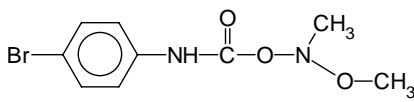
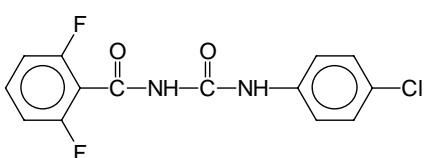
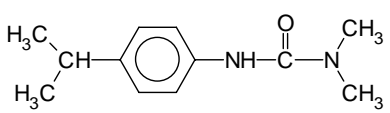
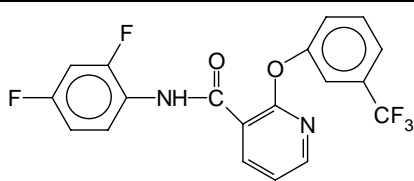
<b>Wirkstoff</b>	<b>Handelsname</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
<b>Anilin bildende PSM</b>			
 <p>Carboxin (&gt; 100 t/a)</p>	Abavit, Arbosan, Prelude	Uniroyal (Schering)	Fungizid: Weizen Gerste Roggen Hafer
 <p>Chloridazon (&gt; 100 t/a)</p>	Largo Pyramin Rebell	BASF AG	Herbizid: Rüben
 <p>Carbetamid</p>	Pradone Kombi	Aventis	Herbizid: Raps Futtererbse
 <p>Propham</p>	Agermin Detia Tixit	Bayer AG	Wachstums- regulator: Kartoffeln
 <p>Desmedipham</p>	Betanal Progress	Schering	Herbizid: Zuckerrüben Futterrüben
 <p>Pencycuron</p>	BAY12980 F Monceren	Bayer AG	Fungizid: Kartoffeln
Fenuron*, Siduron*, Proxyphan*, Diclofluamid*, Fenfuram*, Carboxin*			
<b>2,4-Dimethylanilin bildende PSM</b>			
 <p>Amitraz</p>	Mitac	Schering	Akarizid, Insektizid: Obstbau Hopfenbau

## Aromatische Amine

Wirkstoff	Handelsname	Hersteller	Anwendung
<b>2,6-Dimethylanilin bildende PSM</b>			
 <p>Metazachlor (&gt;500 t/a)</p>	Butisan Nimbus	BASF AG	Herbizid: Winterraps
<b>3,4-Dichloranilin bildende PSM</b>			
 <p>Diuron</p>	Adimitrol Rapir Unkraut-Ex Vorox ...	Bayer AG Du Pont	Herbizid: Kernobst Weinbau Wege und Plätze
Linuron*, Neburon*, Propanil*			
<b>3-Chloranilin bildende PSM</b>			
 <p>Chlorpropham</p>	Tixit Luxan MitoFOG Pulsfog	Elf Ato- chem, PPG	Wachstums- regulator: Kartoffeln
Barbam*			
<b>3,5-Dichloranilin bildende PSM</b>			
 <p>Iprodion</p>	Gralan Granit Rovral Verisan	Aventis	Fungizid: Weizen Gerste Roggen Hafer Salat, Kohl Zierpflanzen
 <p>Vinclozolin</p>	Konker Ronilan	BASF AG	Fungizid: Weinbau Winterraps Salat, Obstbau Zierpflanzen
Procymidone*, Chlozolinat*			



## Aromatische Amine

Wirkstoff	Handelsname	Hersteller	Anwendung
<b>m-Toluidin bildende PSM</b>			
 <p>Phenmedipham (&gt; 100 t/a)</p>	Betanal, Betosip, Betaren, Pistol, Largo	Schering	Herbizid: Zuckerrübe Futterrübe Spinat Erdbeeren Rote Beete
<b>4-Bromanilin bildende PSM</b>			
 <p>Metobromuron</p>	Patoran	Ciba-Geigy, BASF AG	Herbizid: Kartoffeln Tabak Feldsalat
<b>4-Chloranilin bildende PSM</b>			
 <p>Diflubenzuron</p>	Dimilin	Philips- Duhar (Schering)	Insektizid: Nadelholz Laubholz Champignons
Monulinuron*, Monuron*, Monalid*, Buturon*			
<b>4-Isopropylanilin bildende PSM</b>			
 <p>Isoproturon (&gt; 1000 t/a)</p>	Affinity, Agrilon, Hora, Stefes	Ciba-Geigy, Aventis	Herbizid: Weizen Roggen Gerste
<b>2,4-Difluoranilin bildende PSM</b>			
 <p>Diflufenican (&gt; 200 t/a)</p>	Azur, Bacara, Herold, Loredo, Orkan	Aventis	Herbizid: Weizen Roggen Gerste Hafer

\* in Deutschland nicht zugelassen

## Aromatische Amine

**Tabelle 5:** Mögliche Expositionsquellen einiger aromatischer Amine

<b>Quellen</b>	<b>Beispiele (aromatische Amine per se oder als Struktureinheiten in genannten Stoffen enthalten)</b>
<b>Anilin/Nitrotoluol</b>	
Tabakrauch	
Pharmazeutika	Novalgin; Phenylbutazon
Pestizidrückstände	Carboxin, Chloridazon, Carbetamid, Propham, Desmedipham, Pencycuron
Farbstoffe in Kosmetika	Pigment Red 64:1, Acid Orange 10; Acid Red 1 und 33, Disperse Yellow 16, Acid Yellow 11, Solvent Red 23 und 73, Acid Black 1, Disperse Violet 23/27, Basic Blue 26
Stabilisatoren in Kosmetika	Acetanilid
Oxidationshaarfärbemittel	N-Phenyl-p-phenylendiamin und Salze
Tinten/Kugelschreiberminen	
Lebensmittelfarbstoffe	Rot 2G
Schwarzer Tee	
Aquatische Umwelt	Oberflächengewässer, Deponiesickerwässer, Rüstungsalzlasten
Lederprodukte	
Gummiprodukte/Reifen	
<b>Toluidine</b>	
Tabakrauch	
Pharmaka	Prilocain, Benzocain
Aquatische Umwelt	Oberflächengewässer, Deponiesickerwässer, Rüstungsalzlasten
<i>Kosmetika:</i> Farbstoffe	Solvent Violet 13 und 10, Solvent Green 3, Acid Violet 9
Tinten/Kugelschreiberminen	
Schwarzer Tee	
Pestizidrückstände	Phenmedipham, Tolyfluanid
Gummiprodukte/Reifen	
<b>4ADP</b>	
Tabakrauch	
Rückstände in Haarfärbemittel	

## 3.3 Aufnahme, Verteilung, Metabolismus

Aromatische Amine werden über den Gastrointestinaltrakt, die Atemwege und zumeist auch über die Haut sehr gut resorbiert (Kennzeichnung "H" in der MAK- und BAT-Liste Tabelle 7) und verteilen sich im ganzen Organismus relativ schnell. Die Ausscheidung erfolgt zum größten Teil nach Metabolisierung über die Nieren (einkernige Amine) und die Faeces (mehrkernige Amine). Die meisten aromatischen Amine werden mit Halbwertszeiten im Bereich von 3-4 Stunden innerhalb von 2-3 Tagen nahezu vollständig eliminiert. Vor allem die Benzidinanaloga besitzen aber Eliminationshalbwertszeiten im Bereich von einigen Tagen.

Im Vordergrund der Metabolisierung aromatischer Amine steht zumeist die Oxidation des aromatischen Rings durch das Cytochrom-P-450-Monooxygenase-System. Dies geschieht im Nebenpfad direkt, im Hauptpfad nach Acetylierung der Aminfunktion. Dabei werden als mengenmäßig bedeutendste Metaboliten *N*-acetylierte Aminophenole gebildet, die zumeist als O-Konjugate (Sulfate bzw. Glucuronide) mit dem Urin ausgeschieden werden. Eine Ausnahme hinsichtlich des Nebenpfads stellt hier das Benzidin dar, da es kein Substrat für das CYP 1A2 ist. Erst nach Acetylierung kann es von CYP 1A2 weiter verstoffwechselt werden.

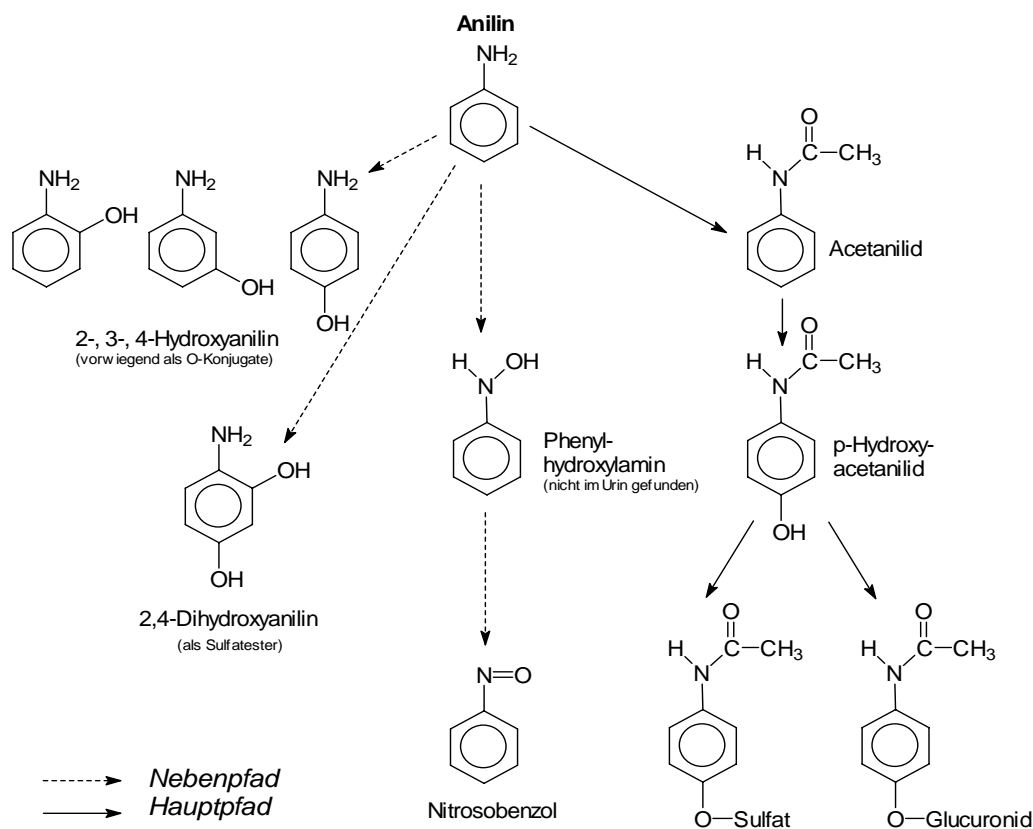
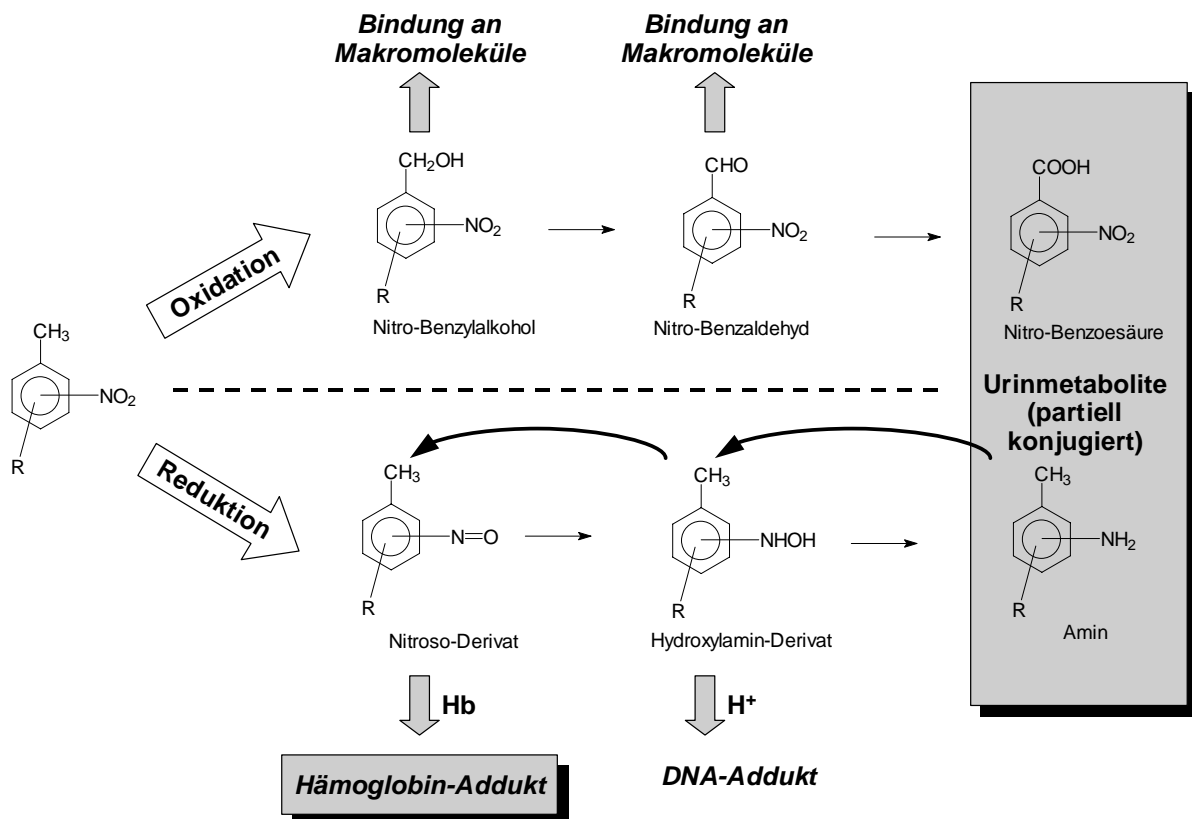


Abbildung 4: Vereinfachter Metabolismuspfad am Beispiel des Anilins

## Aromatische Amine

Aromatische Amine sind mit aromatischen Nitroverbindungen eng über ihre Stoffwechselung verknüpft. Dieser Zusammenhang ist vereinfacht in Abbildung 5 dargestellt. Als ultimative Kanzerogene werden die im Verlauf entstehenden Hydroxylaminverbindungen angesehen. Die aus Nitroaromaten entstandenen aromatischen Amine werden in Abhängigkeit von ihrer Menge, der Verteilungsgeschwindigkeit im Organismus und dem Polymorphismus der beteiligten Enzyme (siehe unten) 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 *in vivo* an der Thiolfunktion des Cysteins ( $\beta$ -93) des Hämoglobins stabile 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.



**Abbildung 5:** Metabolische Verknüpfung aromatischer Amine mit aromatischen Nitroverbindungen

## Aromatische Amine

---

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 (Abbildung 5 oben). 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).

Der Verstoffwechslung aromatischer Amine hinsichtlich der Ausscheidung des unverändertenamins bzw. seiner Konjugate und der Bildung von Hämoglobinaddukten wird unter anderem von der *N*-Acetyltransferase 2 moduliert, einem Enzym, das einem ausgeprägten Polymorphismus (schneller Acetylierer, langsamer Acetylierer) unterliegt. Dieser hat großen Einfluss darauf, welche Anteile der Amine jeweils über die beiden konkurrierenden Stoffwechselfade (Phase I (Oxidation über CYP) bzw. Phase II (Acetylierung über NAT)) umgesetzt werden.

Die *N*-Acetyltransferase 2 (NAT2) katalysiert den *N*-Acetyltransfer aus Acetyl-Coenzym A auf den Stickstoff von primären Aminen, Arylaminen, Hydrazinen und Hydraziden, sowie den *O*-Acetyltransfer auf den Sauerstoff von Hydroxylaminen. Beim Menschen kommen zwei polymorphe *N*-Acetyltransferasen vor (NAT1 und NAT2), die sich stark in ihrer Substratspezifität unterscheiden. Zu den Substraten der NAT2 gehören eine Vielzahl von Arzneimitteln, wie z.B. Isoniazid, Sulfamethazin, Sulfapyridin, Hydralazin, Procainamid, Dapson und Coffein. Ebenso sind die human-toxikologisch bedeutsamen aromatischen Amine, wie 2-Naphthylamin, 4-Aminobiphenyl und Benzidin, aber auch 2-Aminofluoren, 4,4'-Methylen-bis-(2-chloranilin) und *N*-Hydroxy-2-aminofluoren (*O*-Acetylierung) Substrate der NAT2.

NAT2 ist im Cytosol der Leber und der Dünndarmepithelien lokalisiert. Die NAT2 zeigt vier beim Menschen relevante Polymorphismen M1, M2, M3 und M4 mit unterschiedlichen Allelfrequenzen. Abhängig von der genetischen Determinierung wird in der Regel zwischen "langsamen Acetylierern" und "schnellen Acetylierern" unterschieden. Eine zusätzliche Differenzierung in „mittlere Acetylierer“ wird nur von einzelnen Autoren beschrieben (Lewalter und Neumann 1998).

Durch die Messung des molaren Verhältnisses der Coffeinmetabolite AFMU zu 1-MX im Urin kann die individuelle Aktivität der NAT2 abgeschätzt (Blaszekwicz et al. 2004)

## **Aromatische Amine**

---

und somit zwischen "langsamen" und "schnellen Acetylierern" differenziert werden (Bieger und Knabenschuh 2001, Lewalter et al. 1992).

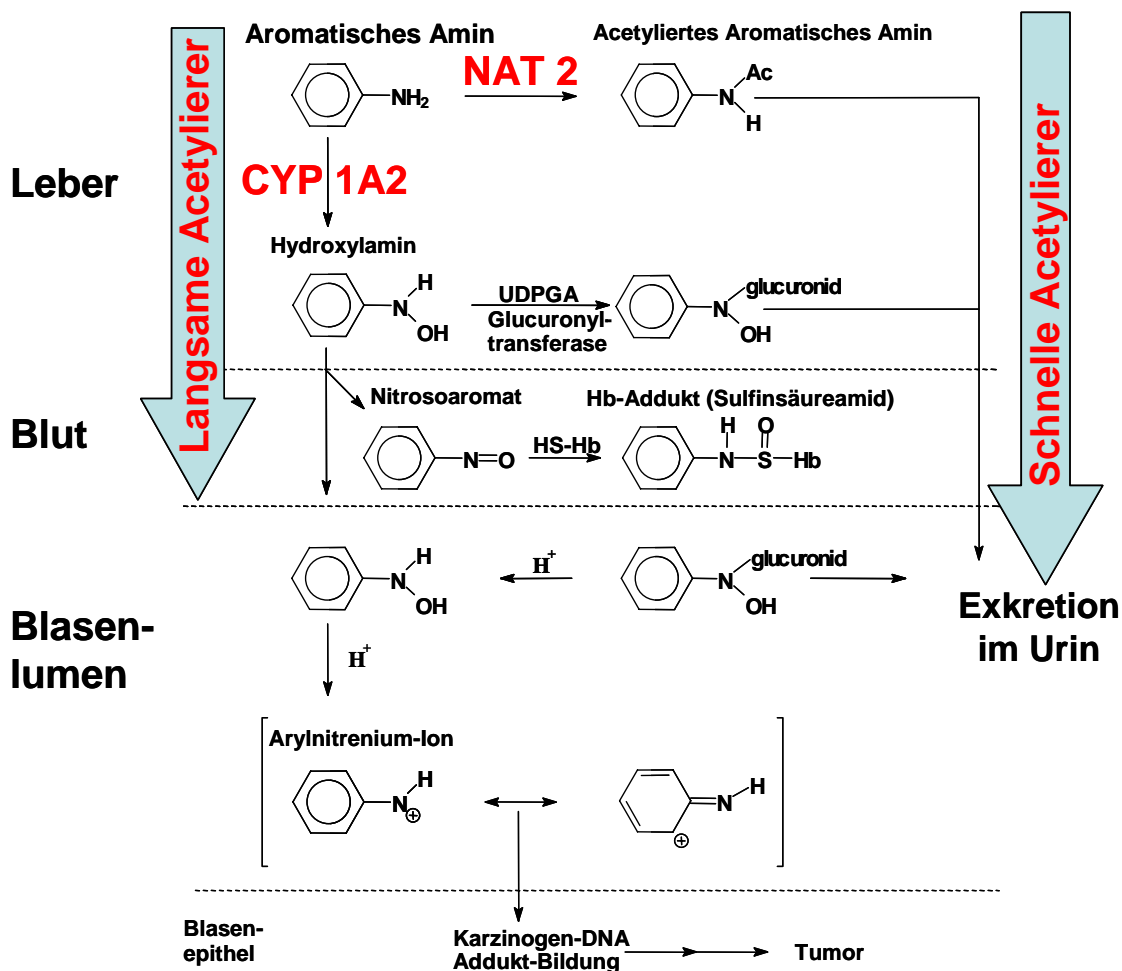
Im Fall der aromatischen Amine konnte z.B. bei Anilinexposition festgestellt werden, dass schnelle Acetylierer einen großen Anteil der aufgenommenen Dosis in relativ kurzer Zeit renal (in Form des *N*-Acetyl-Konjugats) ausscheiden und somit im Vergleich zu langsamen Acetylierern geringere Adduktraten aufwiesen. Der Grad der Adduktbildung war umgekehrt proportional zum Acetylierungspotential der untersuchten Personen und war abhängig von der Konzentration des freien, nicht-acetylierten Amins (Lewalter und Korallus 1985). Während also schnelle Acetylierer nach längerer Exposition (siehe Lebensdauer Erythrozyten) relativ geringe Adduktraten bei gleichzeitig höheren renalen Ausscheidungsraten aufweisen, kehrt sich dieses Verhältnis bei langsamen Acetylierern in einem gewissen Grad um.

In Studien konnte gezeigt werden, dass langsame Acetylierer statistisch häufiger an Blasenkrebs erkranken, wenn sie mit Karzinogenen wie 2-Naphthylamin, 4-Aminobiphenyl oder Benzidin in Kontakt kommen. Schnelle Acetylierer besitzen nachweislich eine höhere Toleranzschwelle unter Belastung mit aromatischen Aminen und erkrankten statistisch weniger häufig an Blasenkarzinomen (Bieger und Knabenschuh 2001).

Die *N*-Acetyltransferasen katalysieren die also Übertragung der Acetylgruppe des Acetyl-Coenzym A auf den Stickstoff der aromatischen Amine, aber auch auf den Sauerstoff von Hydroxylaminen (*O*-Acetyltransfer). Bei Betrachtung des Metabolismus-Schemas in Abbildung 6 wird deutlich, dass dem inkorporierten aromatischen Amin also prinzipiell zwei konkurrierende Stoffwechselfade offen stehen. Beim schnellen Acetylierer wird hierbei die NAT-modulierte Phase-II-Reaktion bei weitem schneller beschritten als dies beim langsamen Acetylierer der Fall ist. Beim langsamen Acetylierer hingegen steht aufgrund der vergleichsweise eingeschränkten Kapazität der NAT pro Zeiteinheit eine größere Dosis an Aminen zur Verfügung, die dann nach oxidativer Funktionalisierung über CYP 1A2 schließlich zur Adduktbildung beitragen kann. Das bedeutet aber, dass der schnelle Acetylierer nach Inkorporation eines aromatischen Amins, dieses relativ schnell über die genannte Phase-II-Reaktion konjugieren und über die Nieren ausscheiden kann. Er sollte daher bei vergleichbarer Exposition in der Regel auch geringere Adduktkonzentration aufweisen

## Aromatische Amine

als der langsame Acetylierer. Diese Effekte zeigen sich auch im Tierversuch (langsam und schnell acetylierende Mäuse: Zwirner-Baier und Neumann 1998, Tabelle 6). Es gilt in diesem Zusammenhang jedoch auch zu beachten, dass die NAT 1 in diesem Wechselspiel ebenfalls involviert ist. Ihre genaue Rolle wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Die Substratspezifität der beiden NATs überlappt nämlich erheblich (Levy und Weber 2002), eine eindeutige Abgrenzung der beiden Enzyme hinsichtlich des Metabolismus aromatischer Amine voneinander gestaltet sich daher schwierig.



**Abbildung 6:** Vereinfachtes Metabolismusschema und Beteiligung von NAT und CYP am Beispiel Anilin

In Tabelle 6 sind tierexperimentell ermittelte Daten angegeben, die zum einen den mit dem Urin ausgeschiedenen, unveränderten Anteil an Amin angeben und zum anderen über die Hämoglobinbindungsindices (HBI) die Potentiale zur Bildung von Hb-Addukten anzeigen. Der HBI (mmol Addukt/mol Hb/Dosis) gibt dabei die Menge gebildeten Addukts pro einmal verabreichter Dosis (in mmol/kg Körpergewicht) an.

## Aromatische Amine

**Tabelle 6:** Toxikokinetische Daten aus Tierversuchen (Ratte): Ausscheidung im Urin und Hämoglobinbindungsindex

Substanz	prozentuale Ausscheidung im Urin <sup>a</sup>	HBI (Ratte)	Referenz
		mmol Addukt/mol Hb Dosis (mmol/kg KG)	
Anilin	3%	22; 2,2*	Birner und Neuman 1988
		11 ( <i>N,N</i> -Dimethylanilin)	
		16 ( <i>N</i> -Methylanilin)	
		2,4 (Propham)	Sabbioni und Neumann 1990
		45 ( <i>N</i> -Ethylanilin)	Bayerbach und Sabbioni 1999
		79 (Nitrobenzol)	Suzuki et al. 1989
		60 (Nitrobenzol)	Sabbioni 1994B
		73 (Nitrobenzol)	Albrecht und Neumann 1985
o-Toluidin	3,6 % 5,3 % 21 % 5 %	4,0	Neumann 1991
		0,72 (2-Nitrotoluol)	Sabbioni 1994B
			Kulkarni et al. 1983
			Son et al. 1980
			Cheever 1980
			Kulkarni et al. 1983
m-Toluidin	2,5 %	4,9	Neumann 1991
		1,03 (3-Nitrotoluol)	Sabbioni 1994B
			Cheever 1980
p-Toluidin	2,5%	4,3	Birner und Neumann 1988, Neumann 1991
		0,43 (4-Nitrotoluol)	Sabbioni 1994B
			Cheever et al. 1980
o-Anisidin	0,6% (2-Nitroanisol)		Miller et al. 1985
3-Chloranilin		2,9 (Chlorpropham)	Sabbioni und Neumann 1990
		12,5	Sabbioni 1994
		54,2 (3-Chlornitrobenzol)	Sabbioni 1994B



## Aromatische Amine

Substanz	prozentuale Ausscheidung im Urin <sup>a</sup>	HBI (Ratte)	Referenz
		mmol Addukt/mol Hb Dosis (mmol/kg KG)	
4-Chloranilin	6% **	569	Birner und Neumann 1988
		39 (Monuron)	Sabbioni und Neumann 1990
		55 (Monolinuron)	
		215,4 (4-Chlornitrobenzol)	Sabbioni 1994B
		112* (schnelle Acetylierer) 5* (langsame Acetylierer)	Zwirner-Baier und Neumann 1998
3,5-Dichloranilin		0 (Vinclozolin, Iprodion)	Sabbioni und Neumann 1990
		0,6	Sabbioni 1994
3,4-Dichloranilin		0,8 (Linuron)	Sabbioni und Neumann 1990
		4,5 (Diuron)	
		9,0	Neumann 1991
2-Naphtylamin		0,14	Suzuki et al. 1989
		0,65 (2-Nitronaphtalin)	
4-Aminodiphenyl		344	Neumann 1991
		725	Zwirner-Baier und Neumann 1998
		445 (N-Acetyl-4ADP)	
		2,9 (Benzidin)	
		177,1 (4-Nitrodiphenyl)	Sabbioni 1994B
4,4'-Methyldianilin		3,7	Sabbioni und Schütze 1998

\*Maus; \*\*Kaninchen; <sup>a</sup> unverändert bzw. konjugiert

### 3.4 Toxikologie

Im Vordergrund der akuten Toxizität aromatischer Amine steht die Induktion von oxidiertem Hämoglobin (Met-Hb), das dann nicht mehr zum Transport von Sauerstoff für die Zellatmung zur Verfügung steht. Dabei werden erhebliche Unterschiede festgestellt in Abhängigkeit von Art und Position der Substituenten am aromatischen Ring. So ist das Potential Met-Hb zu bilden beim 4-Chloranilin im Vergleich zu anderen aromatischen Aminen besonders hoch. Für Anilin und Nitrobenzol wurde äquivalent zu einem 5%igen Methämoglobinspiegels zunächst ein BAT-Wert in Höhe von 1 mg/L Urin evaluiert. Die durchschnittliche Belastung am Arbeitsplatz und damit auch die Gesamtbeanspruchung am Arbeitsplatz wird jedoch über den entsprechenden

## Aromatische Amine

Adduktspiegel besser abgebildet als durch die Konzentration im Urin. Daher wurde später für Anilin bzw. Nitrobenzol erstmals ein BAT-Wert auf Basis von Hämoglobinnaddukten aufgestellt (100 µg Addukt pro L Blut), der den früheren BAT-Wert auf Basis der Urinausscheidung ersetzte. Dies ist insbesondere wichtig vor dem Hintergrund der Modulation des Stoffwechsels durch den NAT-Polymorphismus (siehe unten). Der langsame Acetylierer wird durch den BAT-Wert auf Basis der Hb-Addukte besser geschützt.

**Tabelle 7:** Eigenschaften und Grenzwerte aromatischer Amine, H = hautgängig

Substanz	hautgängig	Kategorie zur Einstufung kanzerogener Substanzen (DFG 2003)	Grenzwerte
Anilin	H	3B	MAK: 7,7 mg/m <sup>3</sup> BAT: 100 µg/l aus Hb
o-Toluidin	H	2	TRK: 0,5 mg/m <sup>3</sup>
m-Toluidin	Nicht in der MAK- und BAT-Werte-Liste aufgeführt		
p-Toluidin	H	3B	TRK: 1 mg/m <sup>3</sup>
o-Anisidin	H	2	TRK: 0,5 mg/m <sup>3</sup>
3-Chloranilin	H	noch kein MAK-Wert evaluiert	
4-Chloranilin	H	2	TRK: 0,2 mg/m <sup>3</sup>
3,4-Dichloranilin	Nicht in der MAK- und BAT-Werte-Liste aufgeführt		
3,5-Dichloranilin	Nicht in der MAK- und BAT-Werte-Liste aufgeführt		
2-Naphthylamin	H	1	Vgl. MAK-Liste IX 2
4-Aminodiphenyl	-	1	Vgl. MAK-Liste IX 2
Dinitrotoluole	H	2	siehe 2,6- und 3,4- Dinitrotoluol
2,6-Dinitrotoluol	H	2	TRK: 0,05 mg/m <sup>3</sup>
3,4-Dinitrotoluol	H	2	TRK: 1,5 mg/m <sup>3</sup>
Trinitrotoluol	H	3	MAK: 0,011 mg/m <sup>3</sup>
4,4'-Methyldianilin	H	2	TRK: 0,1 mg/m <sup>3</sup>

### 3.4.1 Aromatische Amine und Blasenkrebs

Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts basierend auf dem saarländischen Krebsregister erkranken in Deutschland jährlich etwa 15.000 - 16.000 Menschen neu an Blasenkrebs (RKI 2002, Zahlen aus 1998). Dabei sind Männer mit etwa 2/3 der

## **Aromatische Amine**

---

Fälle doppelt so stark betroffen wie Frauen. Bei Männern rangiert diese Krebsform mit einem Anteil von 6,3 % an 5. Stelle aller Krebsneuerkrankungen. Sowohl bei Männern als auch bei Frauen ist der Blasenkrebs eine Erkrankung des höheren Alters. So entfallen etwa 80-90 % der Neuerkrankungen auf Personen, die älter als 60 Jahre sind (RKI 2002, Zahlen aus 1998).

Bei den durch die Berufsgenossenschaften als Berufskrebse anerkannten Fällen nehmen die der ableitenden Harnwege durch aromatische Amine (BK 1301, 1978-1997) etwa 5% ein. Damit liegt diese Art der Krebserkrankung an 4. Stelle der anerkannten Krebsfälle (Popp et al. 2003).

Tabakrauchen ist der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung von Blasenkarzinomen aus umweltmedizinischer Sicht. In zahlreichen Arbeiten seit den 1980er Jahren wurden Odds ratios für das Tabakrauchen ermittelt. Dabei ist das relative Risiko zu erkranken abhängig von der Zahl gerauchter Zigaretten und der Dauer seit Beginn des Rauchens. So steigt das Odds ratio von 2,2 bei maximal 14 (sowie 24) Zigaretten pro Tag auf 2,8 bei mehr als 24 Zigaretten pro Tag (Doll et al. 1994); bzw. von 2,0 nach 20 Jahren Rauchen auf 5,6 nach 60 Jahren Rauchen (Brennan et al. 2000). Kürzlich konnten darüber hinaus Pesch et al. in einer bevölkerungsbasierten Studie Odds ratios in Abhängigkeit von einer kumulativen Dosis (Packungsjahre, pack years) ermitteln. Dabei zeigte sich bei Männern mit 40 Packungsjahren oder mehr ein Odds ratio von 3,4 und bei Frauen von 4,8. Nach Aufgabe des Rauchens sank die Odds ratio nach 20 oder mehr Jahren auf 1,4 bei Männern bzw. 1,5 bei Frauen (Pesch et al. 2002).

Weitere gesicherte Risikofaktoren hinsichtlich des Blasenkrebses sind ionisierende Strahlungen (IARC 2000) sowie Behandlungen mit dem Cytostatikum Cyclophosphamid (Schottenfeld & Fraumeni 1996). Darüber hinaus wird Kaffeekonsum (Morrison et al. 1982) mit einem erhöhten Risiko in Verbindung gebracht.

Berufsbedingte Risiken sind vielfältig. Neben erhöhter Blasenkrebsinzidenzen bei Arbeitern aus der Gummiindustrie werde sie berichtet bei Beschäftigten aus den Bereichen Druckerei, Leder/Textilfärbung, Teer-, Pech- und Bitumenproduktion, Aluminiumherstellung und beim beruflichen Umgang mit ionisierender Strahlung (IARC, Pesch et al. 2000). Oftmals werden hierfür die humankanzerogenen aromatischen Amine 4-Aminodiphenyl (4ADP) oder 2-Naphtylamin (2NA) bzw. das als Humankanzerogen im Verdacht stehende o-Toluidin verantwortlich gemacht (Übersicht z.B. bei Vineis & Pirastu 1997).

## **4 Kollektive und Methoden**

### **4.1 Kollektive**

Zur Untersuchung der Allgemeinbevölkerung auf die entsprechenden Aminoaromaten standen zwei Studienkollektive ohne berufliche Belastung gegenüber diesen Verbindungen oder ihren Vorläufern zur Verfügung. Das Kollektiv „Stadtbevölkerung“ bestand aus 100 im Ruhrgebiet wohnenden Personen (Altersmedian: 38,5 Jahre, Bereich 22 – 73 Jahre, Gewichtsmedian 73 kg), für das Kollektiv „Landbevölkerung“ konnten 100 Personen aus dem Münsterland gewonnen werden (Altersmedian: 40 Jahre, Bereich: 20 – 68 Jahre, Gewichtsmedian 71 kg). Von beiden Personengruppen lagen Urin- und Blutproben vor. Diese wurden bei – 18 °C im Tiefkühlschrank bis zur Probenaufbereitung gelagert.

In einem Fragebogen wurden ferner eventuell expositionsrelevante Lifestyle-Faktoren abgefragt. Hierzu zählten unter anderem Gewicht, Raucherstatus, Art und Menge von Alkoholkonsum, Kaffee- und Teekonsum, Medikamenteneinnahme sowie Ernährungsgewohnheiten (siehe Anhang).

### **4.2 Bestimmung aromatischer Amine im Urin**

#### **4.2.1 Grundlage des Verfahrens**

Die teilweise als Konjugate vorliegenden Aminoaromaten werden nach saurer Hydrolyse mit n-Hexan bei pH 6 extrahiert und nach einem ersten Aufkonzentrierungsschritt mit Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPA) zu Pentafluorpropionsäureamiden derivatisiert. Nach einem Waschschrift zur Entfernung überschüssigen Derivatisierungsmittels werden die Proben bis auf 15 µL aufkonzentriert und anschließend im EI-Modus per GC/MS vermessen. Zur Kalibrierung wird dotierter Poolurin verwendet. Als interne Standards dienen deuterierte Analoga der Analyten sowie 4-Amino-5-Nitrotoluol.

#### **4.2.2 Geräte, Chemikalien und Lösungen**

##### **4.2.2.1 Geräte**

Gaschromatograph, massenselektiver Detektor mit der Möglichkeit zur negativen chemischen Ionisation und automatischer Probengeber.

## **Kollektive und Methoden**

---

Fused Silica Kapillarsäule 50 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 65% Dimethyl-35% Diphenyl-Polysiloxan (z.B. DB35 MS J&W Scientific)

20 mL Schraubgläschen mit Deckel und gummifreien, teflonkaschierten Septen

200 µL konische Microvials (z.B. Chromacol<sup>®</sup> 02-CTV6)

Bechergläser

Eismaschine

GC-Vials mit Bördelkappe

konische GC-Microvials für kleine Volumina

Laborschüttler

Labor-Zentrifuge

Magnetrührer

Messkolben 10 mL, 100 mL

Mikroliterpipetten variabel einstellbar zwischen 1 und 10; 10 und 100, sowie 100 und 1000 µL (z.B. von Eppendorf)

Multipipetten (z.B. von Eppendorf)

pH-Meter

Rüttler (z.B. Vortex von Cenco, Niederlande)

Schütteltrichter

Trockenschrank

Vakuumzentrifuge

Wasserbad, thermostatisierbar bei 80°C

### **Vorbereitung der Probengläschen**

Die Gläschen werden mit etwa 2 mL Toluol gefüllt, verschlossen und 10 Minuten am Laborschüttler geschüttelt. Das Toluol wird verworfen. Die Gläschen werden im Trockenschrank bei mind. 100 °C ausgeheizt, Deckel und Septen können bei RT trocknen. Die Gläschen werden erst kurz vor der Verwendung aus dem Trockenschrank entnommen.

#### **4.2.2.2 Chemikalien**

2-(*N*-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES) z.B. von Sigma-Aldrich

2-Naphtylamin z.B. von Sigma-Aldrich

2-Naphtylamin-d<sub>7</sub> z.B. von CDN Isotopes

3,4-Dichloranilin z.B. von Riedel-de Haën

## **Kollektive und Methoden**

---

3,5-Dichloranilin z.B. von Riedel-de Haën  
3-Chloranilin z.B. von Riedel-de Haën  
4,4'-Methyldianilin z.B. von Fluka  
4-Amino-5-Nitrotoluol z.B. von Sigma-Aldrich  
4-Aminodiphenyl z.B. von Sigma-Aldrich  
4-Aminodiphenyl-d<sub>9</sub> z.B. von CDN Isotopes  
4-Chloranilin z.B. von Riedel-de Haën  
Anilin z.B. von Sigma-Aldrich  
Anilin-d<sub>5</sub> z.B. von CDN Isotopes  
Kaliumphosphat Trihydrat p.a. Merck  
Methanol Suprasolv z.B. von Merck  
m-Toluidin z.B. von Fluka  
Natriumhydroxid p. a. z. B. on Merck  
n-Hexan Suprasolv z.B. von Merck  
o-Anisidin z.B. von Sigma-Aldrich  
*ortho*-Phosphorsäure p.a. (85%) z.B. von Merck  
o-Toluidin z.B. von Fluka  
o-Toluidin-d<sub>7</sub> z.B. von CDN Isotopes  
Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPA) z.B. von Fluka  
p-Toluidin z.B. von Riedel-de Haën  
Salzsäure rauchend p. a. (37%) z.B. von Merck  
Salzsäure, 1 N z.B. von Merck  
Stickstoff 6.0 z.B. von Linde  
Toluol Suprasolv z.B. von Merck  
Wasser für die HPLC z.B. von Merck

### **4.2.2.3 Lösungen**

#### **10 N Natronlauge**

In einen 1000 ml-Messkolben werden 400,0 g NaOH eingewogen und unter Kühlung in einem Eisbad in ca. 500 mL Wasser gelöst. Anschließend wird der Kolben mit Wasser unter gelegentlichem Umschwenken bis zur Eichmarke aufgefüllt. Analysenwöchentlich benötigte Mengen an 10 N Natronlauge werden 3 x mit jeweils dem gleichen Volumen an n-Hexan in einem Schütteltrichter ausgeschüttelt.

### **0,5 M MES-Puffer pH 6**

In einen 1000 mL-Messkolben werden 107,2 g 2-(*N*-Morpholino)-ethansulfonsäure eingewogen und in ca. 500 mL Wasser gelöst. Anschließend wird der Kolben mit Wasser unter gelegentlichem Umschwenken bis zur Eichmarke aufgefüllt. Die Lösung wird in eine braune Vorratsflasche überführt. Der pH-Wert wird unter ständigem Rühren und pH-Kontrolle (pH-Meter) mittels 10 M Natronlauge (ca. 20 mL) auf pH 6 eingestellt. Analysenwöchentlich benötigte Mengen an MES-Puffer werden 3 x mit jeweils dem gleichen Volumen an n-Hexan in einem Schütteltrichter ausgeschüttelt.

### **0,02 M Phosphat-Puffer pH 8**

In einen 1000 mL-Meßkolben werden 5,4 g Kaliumphosphat Trihydrat eingewogen und in ca. 300 mL Wasser gelöst. Anschließend wird der Kolben mit Wasser unter gelegentlichem Umschwenken bis zur Eichmarke aufgefüllt. Die Lösung wird in eine braune Vorratsflasche überführt. Der pH-Wert wird unter ständigem Rühren und pH-Kontrolle (pH-Meter) mittels *ortho*-Phosphorsäure (85%, ca. 750 µL) auf pH 8 eingestellt. Analysenwöchentlich benötigte Mengen an Phosphat-Puffer werden 3 x mit jeweils dem gleichen Volumen an n-Hexan in einem Schütteltrichter ausgeschüttelt.

### **n-Hexan zur Extraktion**

Das für eine Aufarbeitungsserie benötigte Volumen an n-Hexan wird 3 x mit jeweils dem gleichen Volumen an 1 N HCl im Schütteltrichter ausgeschüttelt.

### **4.2.2.4 Vergleichsstandards**

Aromatische Amine sind in Abhängigkeit vom pH-Wert (> pH 6) in wässrigen Lösungen nicht stabil. Aus diesem Grund sollte der zum Ansetzen der Kalibrierstandards einzusetzende Poolurin auf seinen pH-Wert überprüft werden und ggf. durch Zugabe von Eisessig leicht sauer eingestellt werden (pH 4-5). Dies gilt gleichwohl für das Qualitätskontrollmaterial. Bei Lagerung im Tiefkühlschrank (-18°C) wurde über einen Zeitraum von 6 Monaten bei dem für die Kalibrierstandards eingesetzten Poolurin (pH 5,1) keine Abnahme der Aminkonzentrationen festgestellt.

### **Stammlösungen (500 mg/L)**

Von den aromatischen Aminen werden getrennte methanolische Stammlösungen hergestellt. Dazu wiegt man ca. 25 mg der Substanzen in einen 50 mL-Kolben genau

## **Kollektive und Methoden**

---

ein und füllt den Kolben mit Methanol bis zur Marke auf. Die Lösungen werden in 20 mL Schraubgläschen mit gummifreien Teflon-Septen und Deckel aliquotiert und bei - 18 °C im Tiefkühlschrank gelagert. Unter diesen Bedingungen sind die Stammlösungen mindestens 1 Jahr haltbar.

### **Zwischenverdünnung (10 mg/L)**

In einen 50 mL-Messkolben werden nacheinander jeweils 1 mL der Stammlösungen pipettiert. Anschließend wird der Kolben mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird in 20 mL Schraubgläschen mit gummifreien Teflon-Septen und Deckel aliquotiert und bei - 18 °C im Tiefkühlschrank gelagert. Unter diesen Bedingungen ist die Zwischenverdünnung mindestens 1 Jahr haltbar.

### **Arbeitslösung (1 mg/L)**

In einen 10 mL-Messkolben wird 1 mL der Zwischenverdünnung pipettiert. Anschließend wird der Kolben mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Diese Lösung wird nach dem Ansetzen der Kalibrierstandards verworfen.

### **Kalibrierstandard A (3 µg/L):**

In einen 500 mL-Messkolben werden etwa 100 mL Poolurin (Nichtraucher) vorgelegt. Man pipettiert 1500 µL der Arbeitslösung hinzu und füllt unter Umschwenken den Kolben bis zur Marke auf. Von diesem Material werden 6 mL-Aliquote in geeignete Kunststoffröhrchen aliquotiert und bei ca. - 18° C gelagert. Unter diesen Bedingungen ist der Standard 6 Monate haltbar.

### **Kalibrierstandard B (0,8 µg/L)**

In einen 500 mL-Messkolben werden etwa 100 mL Poolurin (Nichtraucher) vorgelegt. Man pipettiert 400 µL der Arbeitslösung hinzu und füllt unter Umschwenken den Kolben bis zur Marke auf. Von diesem Material werden 6 mL-Aliquote in geeignete Kunststoffröhrchen aliquotiert und bei ca. - 18° C gelagert. Unter diesen Bedingungen ist der Standard 6 Monate haltbar.

### **Kalibrierstandard C (0,3 µg/L; 1,5 µg/L bei den ADNTs)**

In einen 500 mL-Messkolben werden etwa 100 mL Poolurin (Nichtraucher) vorgelegt. Man pipettiert 150 µL der Arbeitslösung hinzu und füllt unter Umschwenken den Kol-



ben bis zur Marke auf. Von diesem Material werden 6 mL-Aliquote in geeignete Kunststoffröhrchen aliquotiert und bei ca. - 18° C gelagert. Unter diesen Bedingungen ist der Standard 6 Monate haltbar.

### **4.2.2.5 Qualitätskontrollmaterial**

In einen 500 mL-Messkolben werden etwa 100 mL Poolurin von Nichtrauchern vorgelegt. Man pipettiert 300 µL der Arbeitslösung hinzu und füllt unter Umschwenken den Kolben bis zur Marke auf. Von diesem Material werden 6 mL-Aliquote in geeigneten Kunststoffröhrchen bei ca. - 18° C gelagert. Unter diesen Bedingungen ist das Kontrollmaterial mindestens 1 Jahr haltbar.

### **4.2.2.6 Interne Standards**

#### **Stammlösungen der internen Standards**

Es ist mit mehreren internen Standards zu arbeiten. Verwendet werden Anilin-d<sub>7</sub>, o-Toluidin-d<sub>7</sub>, 4-Aminodiphenyl-d<sub>9</sub>, 2-Naphtylamin-d<sub>7</sub> und 4-Amino-5-Nitrotoluol.

Je ca. 25 mg der internen Standards werden in je einem 50 mL Messkolben genau eingewogen, mit Methanol gelöst und bis zur Eichmarke aufgefüllt. Diese Lösungen sind im Tiefkühlschrank bei – 18 °C mindestens 1 Jahr haltbar. Die Konzentrationen dieser Lösungen betragen jeweils 500 mg/L.

#### **Dotierlösung Interner Standard**

Je 50 µL der Stammlösungen der internen Standards werden in einen 50 mL Messkolben pipettiert und mit Methanol bis zur Eichmarke aufgefüllt. Die Konzentration dieser Lösung beträgt 50 µg/L je internem Standard. Diese Lösung kann im Kühlschrank bei 6 °C gelagert werden und kann mindestens 1 Jahr verwendet werden.

Von dieser Lösung werden jeder Probe 50 µL zugesetzt.

## **4.2.3 Probennahme und Probenvorbereitung**

### **4.2.3.1 Probenahme und Lagerung**

Zur Bestimmung der aromatischen Amine wird Spontanurin, 12 bzw. 24 h Sammelurin in verschließbaren Polyethylen-Flaschen gesammelt und bis zur Probenaufbereitung in der Tiefkühltruhe bei ca. - 18 °C gelagert. Auf diese Weise ist der Urin mehrere Jahre haltbar. Es wurde jedoch nicht überprüft, ob mit der Dauer der Lagerung die Aminkonzentrationen in den Proben abnehmen.

### **4.2.3.2 Probenaufarbeitung**

5 mL Aliquote der zu untersuchenden Urinproben werden in zuvor mit Toluol gespülte und bei 100 °C ausgeheizte 20 mL Schraubdeckelgläschen mit gummifreien, ebenfalls gespülten Teflonsepten pipettiert.

Anschließend werden 1 mL konzentrierte Salzsäure (37%) sowie 50 µL der Lösung der internen Standards hinzugefügt. Zur Hydrolyse der säurelabilen Konjugate werden die Proben 1 Stunde bei 80 °C im Wasserbad inkubiert.

Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden die Proben in einem Eisbad auf etwa 0 °C weiter abgekühlt. Man fügt nun nacheinander unter Umschwenken 600 µL 10 N NaOH, 3 mL MES-Puffer sowie weitere 550 µL 10 N NaOH hinzu. Der pH-Wert der Proben sollte jetzt zwischen 6,0 und 6,4 liegen (pH-Meter). Falls notwendig wird der pH-Wert durch Zugabe kleiner Mengen an Eisessig bzw. 10 N NaOH nachjustiert.

Die Urinproben werden jetzt aus dem Eisbad genommen und mit 6 mL n-Hexan extrahiert. Dazu pipettiert man das n-Hexan hinzu und schüttelt die Proben für 20 Minuten an einem Laborschüttler, zentrifugiert 10 Minuten bei 2100 g und transferiert mit einer geeigneten Pipette die obere, organische Phase in ein frisches, gereinigtes und ausgeheiztes 20 mL Schraubdeckelglas. In der Vakuumzentrifuge werden die Proben nun auf ca. 1 mL eingeeengt. Anschließend werden 30 µL Pentafluorpropionsäureanhydrid hinzupipettiert. Die Gläschen werden gasdicht verschlossen und nach intensivem Umschwenken 1 Stunde bei 80 °C in einem Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird jeweils 1 mL Phosphatpuffer (pH 8) hinzugefügt. Man schüttelt intensiv an einem Vortex-Mixer, zentrifugiert 10 Minuten bei 2100 g und transferiert die obere organische Phase in ein 2 mL-GC-Gläschen, in dem 100 µL Toluol vorgelegt sind. In einer Vakuumzentrifuge werden die Proben auf ca. 150 µL aufkonzentriert. Das Konzentrat wird in ein GC-Microinsert transferiert und darin auf ein Volumen von ca. 20 µL in einer Vakuumzentrifuge weiter aufkonzentriert.

Es wird jeweils 1 µL in den Gaschromatographen injiziert.

### 4.2.4 Gaschromatographisch-massenspektroskopische Arbeitsbedingungen

Kapillarsäule:	Material:	Fused Silica
	Stationäre Phase:	DB35-MS (35 % phenyl)methylpolysiloxan)
	Länge:	60 m
	Innerer Durchmesser:	0,25 mm
	Filmdicke:	0,25 µm
Detektor:	Massenselektiver Detektor (MSD)	
Temperaturen:	Säule:	2,5 Minuten bei 80 °C; dann Anstieg mit 20 °C/Minute bis 125 °C; konstant für 9 Minuten, dann Anstieg mit 25 °C/Minute bis 200°C, konstant für 10 Minuten, dann Anstieg mit 25 °C auf 290 °C, 29 Minuten bei Endtemperatur
	Injektor:	260 °C
	Transfer Line:	300 °C
Trägergas:	He 5.0 mit einem constant flow von 1,3 mL/min.	
Split:	splitless, split on nach 1 Minute	
Septumspülung:	3 mL/Minute	
Probenmenge:	1 µL	

### 4.2.5 MS – Arbeitsbedingungen

Ionisations-Modus:	Elektronenstoßionisation (EI) mit 70 eV
Multiplifier-Spannung:	relativ 200 V (1900 V + 200 V)
Dwell-Time	60 ns

### 4.2.6 Analytische Bestimmung

Die angegebenen Geräteparameter werden eingestellt und je 1 µL der Analysenprobe wird in den Gaschromatographen injiziert. In Abbildung 7 wird ein GC-MS-Chromatogramm eines mit 0,8 µg/L gespiketen Poolurins gezeigt.

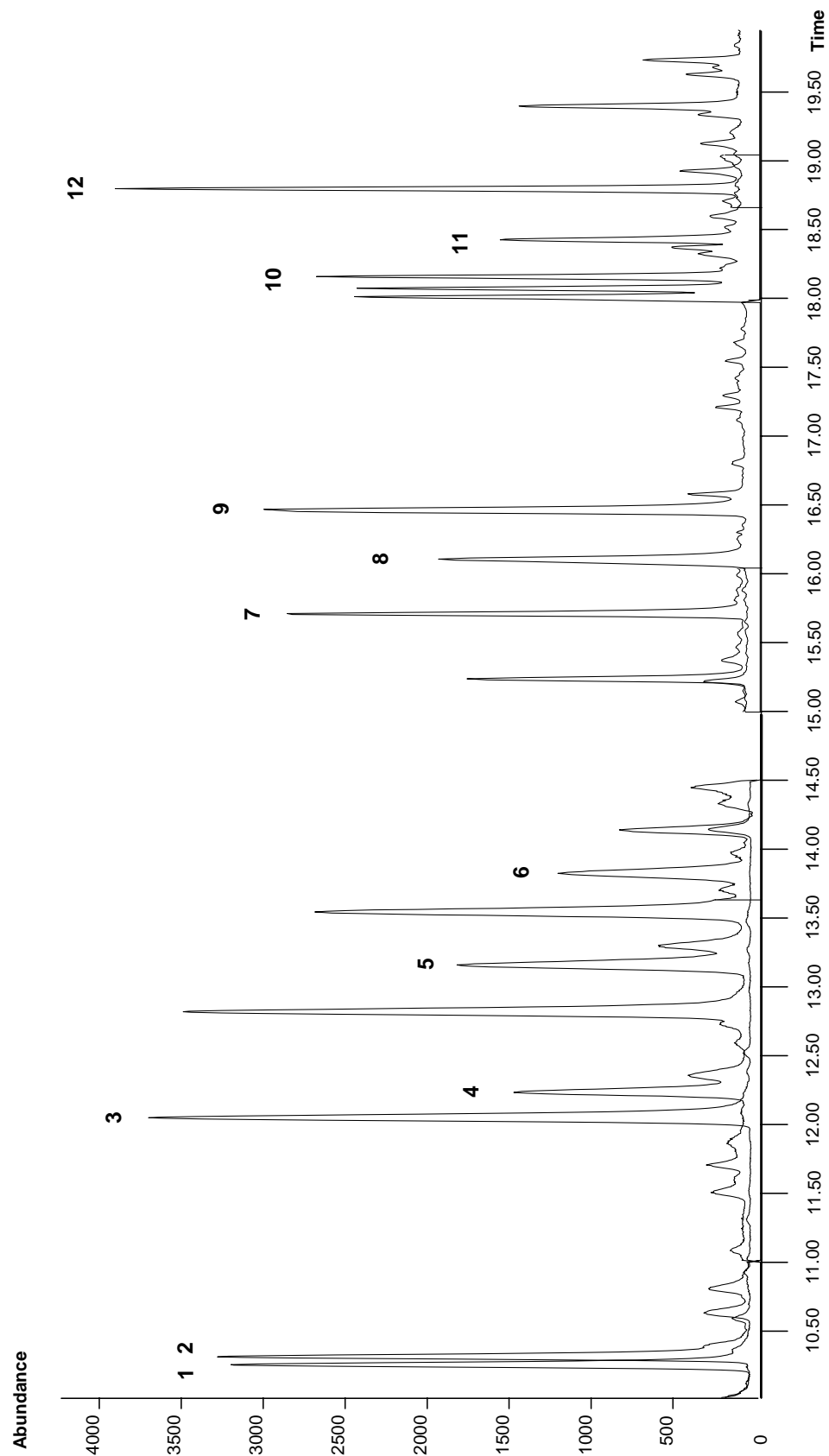
Liegen die Messwerte oberhalb des Bereichs der Kalibriergeraden werden die Urinproben mit MES-Puffer im Verhältnis 1:10 verdünnt (pH-Wert überprüfen), erneut aufgearbeitet und analysiert. Bei jeder Analysenserie wird eine Qualitätskontrollprobe mitanalysiert. Es ist mit Reagenzienleerwerten für Anilin zu rechnen. Daher ist ebenfalls bei jeder Analysenserie eine Leerprobe (5 mL Wasser: 3 x mit je 5 mL n-Hexan ausgeschüttelt) nach Vorschrift aufzuarbeiten und zu analysieren.

Die einzelnen Aminoaromaten werden über die in Tabelle 8 aufgeführten Massen quantifiziert.

**Tabelle 8:** Retentionszeiten und zur Quantifizierung verwendete Massen

<i>Parameter</i>	<i>Quantifier Ion</i>	<i>Qualifier Ion</i>	<i>Retentions-</i>	<i>Peak</i>
	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>	<i>zeit</i>	<i>Nr.</i>
Anilin-PFPA	239 [M] <sup>+</sup>	120 [M-C <sub>2</sub> F <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	10,31 min	2
Anilin-d <sub>5</sub> -PFPA (IS)	244 [M] <sup>+</sup>	-	10,25 min	1
o-Toluidin-PFPA	253 [M] <sup>+</sup>	134 [M-C <sub>2</sub> F <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	12,24 min	4
o-Toluidin-d <sub>7</sub> -PFPA (IS)	260 [M] <sup>+</sup>	-	12,05 min	3
m-Toluidin-PFPA	253 [M] <sup>+</sup>	134 [M-C <sub>2</sub> F <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	13,16 min	5
p-Toluidin-PFPA	253 [M] <sup>+</sup>	134 [M-C <sub>2</sub> F <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	13,83 min	6
o-Anisidin-PFPA	269 [M] <sup>+</sup>	150 [M-C <sub>2</sub> F <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	15,72 min	7
3-Chloranilin-PFPA	273 [M( <sup>35</sup> Cl)] <sup>+</sup>	275 [M( <sup>37</sup> Cl)] <sup>+</sup>	16,12 min	8
4-Chloranilin-PFPA	273 [M( <sup>35</sup> Cl)] <sup>+</sup>	275 [M( <sup>37</sup> Cl)] <sup>+</sup>	16,48 min	9
3,5-Dichloranilin-PFPA	307 [M(2 <sup>35</sup> Cl)] <sup>+</sup>	309 [M( <sup>35</sup> Cl, <sup>37</sup> Cl)] <sup>+</sup>	18,19 min	10
3,4-Dichloranilin-PFPA	307 [M(2 <sup>35</sup> Cl)] <sup>+</sup>	309 [M( <sup>35</sup> Cl, <sup>37</sup> Cl)] <sup>+</sup>	19,46 min	11
4-Amino-5-nitrotoluol-PFPA (IS)	298 [M] <sup>+</sup>	-	18,83 min	12
2-Naphtylamin-PFPA	289 [M] <sup>+</sup>	142 [M-COC <sub>2</sub> F <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	22,8 min	-
2-Naphtylamin-d <sub>7</sub> -PFPA (IS)	296 [M] <sup>+</sup>	-	22,75 min	-
4-Aminodiphenyl-PFPA	315 [M] <sup>+</sup>	168 [M-COC <sub>2</sub> F <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	28,3 min	-
4-Aminodiphenyl-d <sub>9</sub> -PFPA (IS)	324 [M] <sup>+</sup>	-	28,2 min	-
4,4'-Methyldianilin-PFPA	490 [M] <sup>+</sup>	343 [M-COC <sub>2</sub> F <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	32,9 min	-

IS = interner Standard



**Abbildung 7:** Beispielchromatogramm eines mit jeweils 0,8 µg/L gespiketen und aufgearbeiteten Nichtraucher-Poolurins, die Peakzuordnung ist Tabelle 8 zu entnehmen

### **4.2.7 Kalibrierung**

Die Urin-Vergleichsstandards werden wie die zu untersuchenden Proben aufgearbeitet und entsprechend analysiert. Man erstellt die Kalibrierfunktionen, indem man die Quotienten der Peakflächen jedes aromatischen Amins und des jeweiligen inneren Standards gegen die eingesetzten Konzentrationen aufträgt.

Der interne Standard Anilin-d<sub>5</sub> wird zur Quantifizierung von Anilin verwendet; für o-, m- und p-Toluidin wird o-Toluidin-d<sub>7</sub> verwendet; o-Anisidin, die Mono- und Dichloraniline werden über 4-Amino-5-nitrotoluol als internem Standard quantifiziert; 2-Naphtylamin wird anhand von 2-Naphtylamin-d<sub>7</sub> und 4-Aminodiphenyl anhand von 4-Aminodiphenyl-d<sub>9</sub> bestimmt.

Die Kalibrierfunktionen der aromatischen Amine sind jeweils im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und mindestens 500,0 µg/L linear. Dies wurde anhand von dotierten, wässrigen Standardlösungen und dotierten Urinproben überprüft.

### **4.2.8 Berechnung des Analysenergebnisses**

Die ermittelte Peakfläche jedes Analyten wird durch die Peakfläche des jeweiligen inneren Standards dividiert. Mit den so erhaltenen Quotienten geht man in die entsprechende Kalibrierkurve ein und ermittelt die zugehörige Konzentration in µg/L Urin. Da der zur Herstellung der Vergleichsstandards eingesetzte Poolurin in der Regel Hintergrundbelastungen aufweist, ist die resultierende Kalibriergerade parallel so zu verschieben, dass sie durch den Koordinatenursprung verläuft. (Die Konzentrationen der Hintergrundbelastung können jeweils am Achsenabschnitt vor der Parallelverschiebung abgelesen werden.) Ermittelte Reagenzienleerwerte (Anilin) sind von den Analysenergebnissen der Realproben zu subtrahieren.

### **4.2.9 Standardisierung und Qualitätssicherung**

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse wird eine Kontrollprobe mit untersucht, die eine konstante Konzentration der einzelnen aromatischen Amine aufweist. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden. Dazu versetzt man Poolurin von Nichtrauchern mit einer definierten Menge der einzelnen aromatischen Amine. Von diesem Kontrollmaterial wird ein Halbjahresbedarf hergestellt, in Stechampullen aliquotiert und tiefgefroren aufbewahrt. Die Konzentration dieses Kontrollmaterials sollte im entscheidungsrele-

## Kollektive und Methoden

vanten Konzentrationsbereich liegen. Der Sollwert und die Toleranzbereiche des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode ermittelt.

### 4.2.10 Beurteilung des Verfahrens

#### 4.2.10.1 Präzision

Die Ermittlung der Präzision in der Serie erfolgte durch wiederholte Aufarbeitung zweier unterschiedlich dotierter Urinproben und die Bestimmung der Peakflächen der Analyten im Verhältnis zu den Peakflächen der entsprechenden internen Standards an einem einzigen Tag (n = 8). Die relative Standardabweichung lag hier zwischen 7,5 % für Anilin und 9,8 % für o-Anisidin (Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Präzisionen

<i>Parameter</i>	<i>dotierte Konzentration</i> [ $\mu\text{g/L}$ ]	<i>Präzision</i>	
		<i>von Tag zu Tag (N=6)</i>	<i>in der Serie (N=8)</i>
Anilin	2,0	7.5%	7.5%
	10	13.7%	8.3%
o-Toluidin	2,0	14.1%	7.3%
	10	10.6%	7.0%
m-Toluidin	2,0	16.2%	9.7%
	10	11.2%	7.7%
p-Toluidin	2,0	14.4%	3.0%
	10	13.8%	3.1%
o-Anisidin	2,0	13.6%	9.8%
	10,0	14.6%	9.8%
3-Chloranilin	2,0	13.5%	2.2%
	10	12.7%	3.4%
4-Chloranilin	2,0	11.8%	2.5%
	10	12.9%	3.3%
3,5-Dichloranilin	2,0	11.8%	7.4%
	10	9.9%	5.1%
3,4-Dichloranilin	2,0	12.4%	5.0%
	10,0	10.9%	3.3%
4-Aminobiphenyl	2,0	15.1%	5.9%
	10,0	9.8%	2.7%
2-Naphtylamin	2,0	13.0%	6.3%
	10,0	12.9%	2.6%

## Kollektive und Methoden

Darüber hinaus wurde die Präzision von Tag zu Tag bestimmt. Hierzu wurde das gleiche Qualitätskontrollmaterial wie zur Bestimmung der Präzision in der Serie eingesetzt. Diese Urinproben wurden an 6 verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Es ergab sich dabei Präzisionen zwischen 7,5 und 18,6 % (vgl. Tabelle 9).

### 4.2.10.2 Richtigkeit

Es wurde untersucht, welche Verluste an aromatischen Aminen während der Probenaufarbeitung auftraten. Hierzu wurden die dotierten und aufgearbeiteten Proben anhand von Standards in organischem Lösungsmittel ausgewertet, die keiner Aufarbeitung unterworfen waren. Die aufarbeitungsbedingten Verluste sind in Tabelle 10 dokumentiert. Darüber hinaus wurde auch die relative Wiederfindung ermittelt. Dazu wurde Poolurin ohne weiteren Zusatz sowie dotiert mit zwei verschiedenen Konzentrationen aufgearbeitet und vermessen. Diese Zuverlässigkeitsdaten sind ebenfalls Tabelle 10 zu entnehmen.

**Tabelle 10:** Aufarbeitungsbedingte Verluste, Wiederfindungen und Nachweisgrenzen

<b>Parameter</b>	<b>relative Wiederfindung</b>	<b>dotierte Konzentration [µg/L]</b>	<b>Aufarbeitungsbedingte Verluste</b>	<b>NWG [ng/L]</b>
Anilin	100%	2.0	< 10 %	50
	101%	10		(400)*
o-Toluidin	106%	2.0	< 10%	50
	95%	10		
m-Toluidin	102%	2.0	< 10%	50
	121%	10		
p-Toluidin	110%	2.0	< 15%	50
	105%	10		
o-Anisidin	81%	2.0	< 5%	50
	100%	10.0		
3-Chloranilin	96 %	2.0	< 5%	50
	103%	10		
4-Chloranilin	96%	2.0	< 5%	50
	105%	10		
3,5-Dichloranilin	100%	2.0	< 7 %	50
	101%	10		
3,4-Dichloranilin	94%	2.0	< 5%	50
	109%	10.0		



## Kollektive und Methoden

<i>Parameter</i>	<i>relative Wieder- findung</i>	<i>dotierte Konzentration [µg/L]</i>	<i>Aufarbeitungs- bedingte Ver- luste</i>	<i>NWG [ng/L]</i>
4-Aminobiphenyl	100%	2.0	< 10%	50
	108%	10.0		
2-Naphtylamin	90%	2.0	< 10%	75
	90%	10.0		

\* Bestimmungsgrenze, siehe Abschnitt 4.2.10.3

### 4.2.10.3 Nachweisgrenzen

Legt man ein Signal-Rausch-Verhältnis von 1:3 zugrunde, so ergeben sich für die hier gemessenen aromatischen Amine Nachweisgrenzen im Urin zwischen 0,05 und 2 µg/L. Die entsprechenden Werte sind Tabelle 10 zu entnehmen. Für einige aromatische Amine lag die Nachweisgrenze unterhalb der Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung und konnte deshalb nicht in dotierten Poolurinproben direkt bestimmt werden. In diesen Fällen wurde die Nachweisgrenze aus den Kalibrierfunktionen berechnet. Dazu wurde die Höhe des Rauschens in der nahen Umgebung des betreffenden Analytenpeaks ermittelt. Der dreifache Wert des Rauschens wurde dann herangezogen, um damit unter Annahme einer idealen Gaußschen Peakform aus der Kalibrierfunktion die theoretisch Nachweisgrenze zu berechnen.

Im Falle des Anilins konnte die theoretisch berechnete Nachweisgrenze (50 ng/L) in praxi nicht überprüft werden, da sie unterhalb des Reagenzienleerwerts liegt. Es wird daher für Anilin eine Bestimmungsgrenze in Höhe von 400 ng/L angegeben. Dieser Wert repräsentiert den 2fachen Wert des während der Validierung für Anilin ermittelten maximalen Reagenzienleerwerts.

### 4.2.10.4 Störeinflüsse

Es wurde beobachtet, dass der Gehalt an aromatischen Aminen in dotierten wässrigen Lösungen innerhalb von 4 Wochen bei Lagerung bei Raumtemperatur auf etwa 20 % absinkt. Vermutlich werden die aromatischen Amine unter diesen Bedingungen oxidiert. In dotierten Urinstandards (pH 5,1), die tiefgefroren gelagert waren, war mit Ablauf von 6 Monaten keine Abnahme der Analytkonzentrationen festzustellen. Wurden solche Proben jedoch zwischenzeitlich mehrfach eingefroren und wieder aufgetaut, war auch hier eine leichte Konzentrationsabnahme in Höhe von etwa 10-15 % zu beobachten. Aus diesem Grund sollten die Poolurin-Kalibrierstandards unmittelbar nach ihrem Ansetzen tiefgefroren werden und erst kurz vor der Analyse auf Raum-

## **Kollektive und Methoden**

---

temperatur wieder aufgetaut werden. Aus Sicherheitsgründen sind nach einer Lagerzeit von 6 Monaten die Poolurinstandards frisch anzusetzen. Poolurin, dessen pH-Wert oberhalb von pH 5 liegt, sollte durch Zugabe von Eisessig auf pH 4-5 eingestellt werden. In Realproben ist mit einer Abnahme der Konzentrationen nicht zu rechnen, da die Amine hier überwiegend konjugiert vorliegen und sich damit einer Oxidation an der Aminfunktion entziehen.

Anilin kann als Reagenzienleerwert eindeutig aus wässrigen Proben identifiziert werden. Experimente zur Methodenoptimierung haben gezeigt, dass diese Reagenzienleerwerte an Anilin auf Werte zwischen 100 und 200 ng/L gesenkt werden können, wenn die zur Aufarbeitung eingesetzten Lösung wie in Abschnitt 4.2.2.3 beschrieben aufgereinigt werden (n-Hexan, NaOH und Pufferlösungen).

So sollten sämtliche verwendeten Glasgeräte mit Toluol gespült und bis zu ihrem Einsatz im Trockenschrank bei mindestens 100 °C gelagert werden. Darüber hinaus sind alle zu verwendenden Lösungen nach Vorschrift analysenwöchentlich aufzureinigen. Diese dürfen keinesfalls mit der Umgebungsluft in Kontakt kommen, da bereits in einem Liter Raumluft Aminkonzentrationen vorliegen können, die Reagenzienleerwerte für Anilin von etwa 300 ng/L und für o-Toluidin im Bereich um 50 ng/L hervorrufen können. Das gilt insbesondere auch für das Derivatisierungsmittel. Es darf keinesfalls mit der Umgebungsluft in Kontakt kommen. Es empfiehlt sich daher, auf PFPA zurückzugreifen, das in 1mL Glasampullen am Markt erhältlich ist. Diese Menge reicht aus, um damit eine Analysenserie von 30 Proben zu derivatisieren.

Eine wichtige Kontaminationsquelle für Anilin (und auch für o-Toluidin) können Gummi-haltige Produkte darstellen. Es ist daher auf Gummi- bzw. Kautschuk-haltige Septen zum Verschluss der Reaktionsgläschen zu verzichten, auch wenn diese mit einer Teflonschicht überzogen sind. Es wird empfohlen stattdessen, wie beschrieben, Teflon-kaschierte Septen auf Silikonbasis oder Septen, die ausschließlich aus Teflon bestehen, auszuweichen. Das Arbeiten mit Gummi-Handschuhen kann ebenso eine Kontaminationsquelle darstellen. Es sind daher z.B. Vinyl-Handschuhe zu verwenden.

Um die externe Kontamination mit Anilin zu beobachten, muss bei jeder Analysenserie ein Reagenzienleerwert mitgeführt werden (siehe Abschnitt 4.2.6). Die darin jeweils bestimmte Konzentration muss bei der entsprechenden Analysenserie von den berechneten Anilin-Konzentrationen der vermessenen Proben subtrahiert werden. Bei den restlichen Analyten werden in der Regel keine Reagenzienleerwerte beo-

bachtet. Sollte dies dennoch der Fall sein, ist nach der Quelle der Kontamination zu suchen und diese zu eliminieren.

Die Derivatisierung verläuft nur in nicht-wässriger Umgebung vollständig und reproduzierbar, beim Trennen der wässrigen von der organischen Phase darauf zu achten, dass kein Wasser in die organische Phase eingeschleppt wird.

Die Hexan-Extrakte (vor und nach der Derivatisierung) dürfen nicht vollständig zur Trockene eingengt werden. Dabei werden erhebliche Analytverluste beobachtet. Der Einsatz von Toluol als Keeper bei den Hexan-Extrakten nach Derivatisierung mindert das Risiko des Trockenlaufens jedoch zu einem gewissen Grad.

In den Chromatogrammen werden jeweils in zeitlicher Nähe zum o- und p-Toluidin eine Störkomponente beobachtet, die sowohl die Quantifizier- wie auch die Qualifizierungsspur betreffen. Diese kann unter den angegebenen Bedingungen nur (vollständig) vom Analytenpeak abgetrennt werden, wenn das GC-System in optimalen Zustand ist (Trennleistung der Säule, Sauberkeit des Liners im Injektor). Bei nicht optimalen Trennungsbedingungen können diese Störkomponente im Chromatogramm mit dem Signal des o- bzw. p-Toluidins zusammenfallen und so zu falsch zu hohen Analyseergebnissen führen. Die Verwendung kürzerer Trennsäulen als angegeben ist daher nicht zu empfehlen.

### **4.2.11 Diskussion der Methode**

Die vorliegende Methode gestattet die spezifische, zuverlässige und reproduzierbare Quantifizierung einer Vielzahl aromatischer Amine sowohl im arbeitsmedizinisch- wie auch im umweltmedizinisch relevanten Bereich. Mit diesem Verfahren sollten nicht nur die hier erwähnten Aminoaromaten, sondern eine Vielzahl weiterer aromatischer Amine bis in den umweltrelevanten Bereich analysierbar sein. Die Eignung der Methode ist jedoch im Einzelfall insbesondere im Hinblick auf die Zuverlässigkeitskriterien zu überprüfen. Neben den oben angegebenen Parametern gestattet das Verfahren zusätzlich auch die quantitative Bestimmung der Pflanzenschutzmittelmetaboliten 4-Bromanilin, 4-Isopropylanilin sowie von 2,4-Dimethylanilin. Diese Analyten werden jedoch nicht in Urinproben der Allgemeinbevölkerung gefunden (siehe Abschnitt 3.9.1), auf die Angabe der Zuverlässigkeitskriterien wurde deshalb verzichtet. Eine zuverlässige Quantifizierung der möglichen PSM-Metaboliten 2,4-Difluoranilin- und 2,6-Dimethylanilin ist mit diesem Verfahren nicht möglich. Diese Analyten entzogen sich, wahrscheinlich aus elektronischen bzw. sterischen Gründen einer reproduzier-

## **Kollektive und Methoden**

---

baren Derivatisierung. Darüber hinaus lassen sich Benzidin und seine Derivate (3,3'-Dimethylbenzidin, 3,3'-Dichlorbenzidin, 3,3'-Dimethoxybenzidin) mit dem vorliegenden Verfahren nicht hinreichend zuverlässig bestimmen. Ggf. könnten hier isotopenmarkierte interne Standards der Benzidine Abhilfe schaffen. Mit diesem Verfahren sollten nicht nur die hier erwähnten Aminoaromaten, sondern eine Vielzahl weiterer aromatischer Amine bis in den umweltrelevanten Bereich analysierbar sein. Die Eignung der Methode ist jedoch im Einzelfall insbesondere im Hinblick auf die Zuverlässigkeitskriterien zu überprüfen.

Ein Verfahren, mit dem in der hoch-komplexen Matrix Urin ein so breites Spektrum an Analyten unterschiedlicher physikalisch-chemischer Eigenschaften über einen weiten Konzentrationsbereich bestimmbar ist, stellt letztlich immer einen Kompromiss dar hinsichtlich der Ansprüche an Zuverlässigkeitskriterien (Präzisionen, Wiederfindungen, aufbereitungsbedingte Verluste) und der Praktikabilität in der Laborroutine. Dies wird allein schon deutlich, wenn man die pKs-Werte der Aminfunktionen der jeweiligen Analyten betrachtet. Diese reichen von 0,03 im Falle des 2A46DNT bis zu 5,15 beim p-Toluidin. Gerade vor diesem Hintergrund sind die Zuverlässigkeitskriterien der hier beschriebenen Methode als gut zu bezeichnen. Die Präzision ist aber teilweise schlechter als 15 % (m-Toluidin). Unterhalb von 100 ng/L muss mit höheren Fehlern gerechnet werden. Mit Ausnahme der Amine mit mindestens einer Nitrofunktion sind die aufarbeitungsbedingten Verluste als gering zu bezeichnen. Matrixeffekte erschweren vor allem die Quantifizierung von mehrkernigen aromatischen Aminen im Ultraspurenbereich. Durch den Einsatz zusätzlicher spezifischer deuterierter interner Standards könnten hier Verbesserungen erzielt werden.

Da die mit dem Urin ausgeschiedenen Amine größtenteils als verschiedenartige Konjugate vorliegen, muss der Urin hydrolysiert werden. Prinzipiell ist es möglich, die Konjugate durch alkalische bzw. saure Hydrolyse zu spalten. Wie Schütze et al. 1995 in einer Arbeit zur Bestimmung von MDA im Urin berichten, wird bei saurer Hydrolyse etwa 3x mehr MDA im Urin gefunden, als es die Summe von MDA und Monoacetyl-MDA nach alkalischer Hydrolyse erwarten ließe. Die Ursache hierfür könnte zwei Gründe haben: 1) Bei Hydrolyse im Alkalischen besteht bei aromatischen Aminen die Gefahr, dass sie zu den entsprechenden Nitroverbindungen oxidiert werden und sich so einer Quantifizierung entziehen. 2) Die verschiedenen konjugierten aromatischen Amine werden im Alkalischen nicht vollständig hydrolysiert. Um die Möglichkeit einer Oxidation bzw. die nicht vollständige Hydrolyse von Konjugaten auszuschließen,

## **Kollektive und Methoden**

---

wurde zur Freisetzung der Konjugate die saure Hydrolyse gewählt. Es ist allerdings insbesondere bei den dichlorierten Aminen zu beachten, dass hier zusätzlich zur Freisetzung der entsprechenden Amine aus ihren Konjugaten auch eine Freisetzung aus Metaboliten von Dicarboximidpflanzenschutzmitteln (Tabelle 4) erfolgen kann (Will et al. 2001). Es kann also letztlich keine Aussage getroffen werden, ob im Urin die dichlorierten Amine als die entsprechenden unveränderten Dicarboximid-PSM bzw. deren Metabolite vorliegen oder als freie Dichloramine bzw. deren Konjugate. Ähnliches dürfte für PSM gelten, in denen entsprechenden Aromatische Amine als Amide (z.B. Carboxin), Carbamine (z.B. Propham) oder auch in Farbstoffen N-alkyliert vorliegen.

Als Hydrolysereagenzien wurden Salzsäure und Schwefelsäure getestet. Bei vergleichbaren Hydrolyseausbeuten waren jedoch die Extrakte bei Hydrolyse mit HCl weniger verunreinigt als unter Verwendung von Schwefelsäure. Das betrifft insbesondere die Quantifizierung der Toluidine.

Als Extraktionsmittel wurden verschiedene organische Lösungsmittel unterschiedlicher Polaritäten bei variierenden pH-Werten getestet (n-Hexan, n-Heptan, Ethylacetat, Diethylether, Dichlormethan, pH 6-12). n-Hexan sowie Dichlormethan bei pH 6 stellten sich dabei heraus als die besten Kompromisse bezüglich der Extraktionsausbeuten und der Spezifität der Extraktion vor dem Hintergrund der hoch-komplexen Matrix Urin. Dichlormethan als Extraktionsmittel ist jedoch im Routinebetrieb relativ schwer handhabbar. Es besitzt eine größere Dichte als Wasser, ein Trennen von organischer und wässriger Phase mittels Pipette ist daher wenig praktikabel. Darüber hinaus besitzt n-Hexan gegenüber Dichlormethan den großen Vorteil, praktisch nicht mit Wasser mischbar zu sein (n-Hexan zu ca. 0,05 %; Dichlormethan zu ca. 2%). D.h. ein ansonsten notwendiger Trocknungsschritt (z.B. mit NaSO<sub>4</sub>) für eine nachgeschaltete Derivatisierung mit einem Anhydrid kann entfallen.

Auf einen zweiten Extraktionsschritt wurde aus Praktikabilitätsgründen verzichtet. Wie Vorversuche zeigten, ist ein erster Extraktionsschritt bei pH 6 hinreichend erschöpfend. Beim Vergleich zwischen erster und zweiter Extraktion lagen Ausbeuten hier in der Regel weit über 90. Im Falle der Amine mit mindestens einer Nitrofunktion könnte also die Nachweisempfindlichkeit durch eine zweite Extraktion noch etwas gesteigert werden.

Um den pH-Wert der Proben auf 6 einzustellen wird das saure Hydrolysat schrittweise unter intensivem Umschütteln mit Natronlauge versetzt. Dabei wird die Probe im

## **Kollektive und Methoden**

---

Eisbad gekühlt, um die Gefahr einer möglichen Oxidation der Analyten in sog. Hot-spots so gering wie möglich zu halten.

An die Extraktion schließt sich im vorgelegten Verfahren ein erster Aufkonzentrierungsschritt (6 mL -> 800 µL) an. Dieser Schritt ist notwendig, um eine vollständige und reproduzierbare Derivatisierung mit einem Minimum an Derivatisierungsmittel zu erreichen. So reichen in der vorliegenden Fassung 30 µL an PFPA aus. Erfolgt ein solcher erster Aufkonzentrierungsschritt nicht, müssten etwa 150 µL eingesetzt werden. Diese relativ große Menge an Derivatisierungsmittel würde aber auch ein erhöhtes Risiko einer externen Kontamination (siehe Abschnitt 4.2.10.4) in sich bergen und würde darüber hinaus die Analysenkosten erheblich erhöhen.

Prinzipiell ist es möglich aromatische Amine auch ohne eine Derivatisierung gaschromatographisch-massenspektroskopisch zu bestimmen. Jedoch kann durch Funktionalisierung der Aminfunktion das bei aromatischen Aminen bekannte Peak-tailing weitestgehend reduziert werden und dadurch sowie durch einen anderen Zerfall der Analyten nach Derivatisierung eine Empfindlichkeitssteigerung bei der Detektion erreicht werden. Bei bereits in der Literatur beschriebenen GC/MS-Verfahren erfolgt eine Derivatisierung zumeist mit perfluorierten Säureanhydriden oder perfluorierten Imidazolen (Perfluorpropionsäure- bzw. Perfluorbuttersäureanhydrid oder -imidazol). Neben den perfluorierten Anhydriden und Imidazolen wurde als weitere Alternativen die Derivatisierungen mit *N*-Methylbis(trifluoroacetamid), Pentafluorbenzaldehyd, Benzaldehyd, *o*-, *m*- und *p*-Tolylaldehyd sowie *p*-Nitrobenzaldehyd getestet. Die besten Ausbeuten hinsichtlich Effektivität und größtem Response bei der massenspektroskopischen Detektion wurden mit PFPA und HFBA erreicht. Die über das HFPA erhaltenen Säureamide zeigten zwar einen etwa 20%ig größeren Response als die PFPA-Derivate, die Analyten waren jedoch hier nach Extraktion aus der Matrix Urin weniger gut von störenden Matrixkomponenten kapillargaschromatographisch abzutrennen.

An die Derivatisierung schließt sich ein Waschschrift mit einem Phosphatpuffer (pH 8) an, um überschüssiges Derivatisierungsmittel, das das GC/MS-System stark belasten würde, und weitere Störkomponenten zu entfernen. Im Anschluss an die Waschprozedur werden die Proben ohne weiteren Trocknungsschritt auf ein Endvolumen von 20 µL aufkonzentriert. Dazu werden den Proben zuvor 100 µL Toluol als Keeper zugesetzt. Die Aufkonzentrierung sowohl im ersten Schritt vor der Derivatisierung als auch im zweiten Schritt nach erfolgter Derivatisierung und dem zusätzlichen

## **Kollektive und Methoden**

---

Waschschrift darf keinesfalls mit einer herkömmlichen Stickstoffabblas-Station vorgenommen werden. Bei der Aufkonzentrierung im Stickstoffstrom wurden große Verluste vor allem der leichter-flüchtigen, einkernigen Amine beobachtet.

Da bereits in einem Liter Raumluft Aminkonzentrationen vorliegen können, die Reagenzienleerwerte für Anilin von etwa 300 ng/L und für o-Toluidin im Bereich um 50 ng/L hervorrufen können, ist besonderes Augenmerk auf die Reagenzienleerwerte zu richten. Das Verfahren wurde in seiner Gesamtheit dahingehend ausgerichtet, dass die Gefahr einer externen Kontamination möglichst gering gehalten wird (Aufreinigung von Lösungen und Geräten, Verzicht auf Gummihaltige Materialien, 1fache Extraktion, Verfahren der Aufkonzentrierung zur Reduzierung des Derivatisierungsmittelbedarfes, Verzicht auf Trocknungsschritt). Dennoch war es nicht möglich, den Anilin-Leerwert sämtlicher Reagenzien unter die Nachweisgrenze zu senken. Neben Anilin wurden keine weiteren Reagenzienleerwerte beobachtet.

Die Abtrennung sämtlicher Analytenpeaks (Quantifier- und Qualifier-Ionenspurten) von Störkomponenten aus der Urinmatrix gelang nur unter Einsatz einer relativ langen 60m DB35-Kapillarsäule. Dabei muss das GC-System hinsichtlich der Trennleistung in optimalen Zustand sein, da ansonsten insbesondere die Bestimmung von o- und p-Toluidin gestört sein kann.

In der vorliegenden Form gestattet die Methode die Analyse selbst größerer Probenreihen. So ist es einer versierten Laborkraft ohne weiteres möglich pro Arbeitstag etwa 30 Proben aufzuarbeiten.

In der Literatur sind mehrere Verfahren zur Bestimmung aromatischer Amine aus Urin beschrieben (Tabelle 11). Mit Ausnahme der Verfahren von Wittke 2001 bzw. Wittke et al. 2001 und Grimmer et al. 2000 sind diese Verfahren hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit für den arbeitsmedizinischen Bereich ausgelegt und können somit die Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung nicht zuverlässig erfassen. Darüber hinaus sind die in der Literatur zu findenden Verfahren oftmals nur auf einige, wenige Analyten optimiert und erfassen somit nicht ein so breites Spektrum wie die in dieser Arbeit beschriebene Methode. Zusätzlich werden in den in der Tabelle aufgeführten Verfahren häufig relativ unspezifische Detektionsverfahren eingesetzt wie die UV-, elektrochemische oder die Elektroneneinfangdetektion. Dies birgt gerade im Ultraspurenbereich die Gefahr der Ermittlung falsch zu hoher Analyseergebnisse in sich (siehe hierzu auch Abschnitt 4.5).

## Kollektive und Methoden

Das Verfahren von Wittke (und Mitarbeitern) ist zwar hinsichtlich der Erfassung der Hintergrundbelastungen von 3,4- und 3,5-Dichloranilin empfindlich genug, jedoch beinhaltet es eine äußerst aufwendige Probenvorbereitung. So wird hier jede Probe einer Wasserdampfdestillation in einer Bleidner-Apparatur mit anschließender Hin- und Rückextraktion unterworfen. Es erscheint somit weniger geeignet, größere Probenreihen in der Routine zu analysieren. Auch das hochempfindliche Verfahren zur Bestimmung von u.a. 4-Aminodiphenyl und Naphtylaminen von Grimmer und Mitarbeitern ist wenig routinetauglich. Hier werden jeweils 200 mL Urin mit 100 mL Benzol flüssig/flüssig extrahiert, der Extrakt an einem Rotationsverdampfer auf 2 mL aufkonzentriert und weiter an einer Festphase aufgereinigt. Das Festphaseneluat wird anschließend nochmals mit Benzol (50 mL) extrahiert und auf 2 mL aufkonzentriert. Es schließt sich eine Derivatisierung mit erneutem Waschschrift an bevor die Proben schließlich nach einem dritten Aufkonzentrierungsschritt an einem GC/MS vermessen werden können.

**Tabelle 11:** In der Literatur beschriebenen Verfahren zur Bestimmung aromatischer Amine aus Urin

Prinzip	Extraktion	NWG [µg/L]	Parameter	Referenz
GC/MS	fl/fl Hexan	0,05 - 2	siehe oben	diese Arbeit, Weiss und Angerer 2000, Weiss und Angerer 2002
GC/MS, GC/MS-MS, GC/ECD	Wasserdampf und fl/fl Cyclohexan (Hin- und Rückextraktion)	0,03 - 0,05	34DCIA, 35DCIA	Wittke et al. 2001, Wittke 2001
HPLC/ED	fl/fl Toluol/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Hin- und Rückextraktion)		A, o-,m-T, 4CIA, 2NA	Riffelmann et al. 1995
HPLC/UV	fl/fl Diethylether/ HCl/Diethylether	2 - 5	NA, Benzidine	Angerer et al. 1985
GC/ECD	fl/fl Toluol/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /Toluol	1	A, Toluidine, 4ADP, etc.	Lewalter und Biedermann 1994
GC/MS	fl/fl Benzol + SPE	< 0,001	NA, 4ADP	Grimmer et al. 2000
HPLC/ED	Wasserdampf und fl/fl Diethylether	5	35DCIA	Will 1995, Will 2001
HPLC/ED	fl/fl Butylchlorid/HCl	0,6 - 1,4	A, o-T	Teass et al. 1993



### **4.3 Bestimmung von Cotinin im Urin**

Zur differentialdiagnostischen Abklärung des individuellen Raucherstatus der Probanden wurde Cotinin, ein Hauptmetabolit des Nikotins im Urin mit einer kürzlich in unserem Hause entwickelten HPLC-Methode quantitativ bestimmt (Eichhorn et al. 2004). Dabei wird Cotinin im Urin durch Zugabe von Kaliumcyanid, Chloramin-T und 1,3-Diethylthiobarbitursäure in einen roten Farbkomplex überführt. Die Reaktion, die dieser Derivatisierung zugrunde liegt, ist die sog. König-Reaktion. Quantifiziert wird nach hochleistungsflüssigchromatographischer Trennung an einem UV/VIS-Detektor. Die Kalibrierung erfolgt mit wässrigen Vergleichsstandards, die in der gleichen Weise behandelt werden, wie die zu untersuchenden Harnproben.

Die Methode arbeitet mit einer Nachweisgrenze von 5 µg Cotinin pro Liter Harn und gestattet die zuverlässige Unterscheidung zwischen Nichtrauchern, Passivrauchbelasteten Personen und Rauchern.

### **4.4 Bestimmung aromatischer Amine im Blut als Addukte am Hämoglobin**

#### **4.4.1 Grundlage des Verfahrens**

Das hier beschriebene Verfahren erlaubt die Bestimmung der Hämoglobin-Addukte verschiedener aromatischer Amine. Es können sowohl arbeitsmedizinisch relevante als auch umweltbedingte Ausscheidungen der aromatischen Amine erfasst werden.

Hierzu werden aus EDTA-stabilisiertem Vollblut Erythrozyten separiert. Das in den Erythrozyten enthaltene Hämoglobin wird isoliert. Die in Form von Sulfinsäureamiden an  $\beta$ -Cysteinyll-Reste des Hb gebundenen Addukte werden mittels alkalischer Hydrolyse abgespalten. Die Amine werden in n-Hexan extrahiert und nach einem ersten Aufkonzentrierungsschritt mit Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) zu Heptafluorbuttersäureamiden derivatisiert. Nach einem Waschschrift zur Entfernung überschüssigen Derivatisierungsmittels werden die Proben bis auf 15 µL aufkonzentriert und anschließend im NCI-Modus per GC/MS vermessen. Zur Kalibrierung wird Rinder-Hb verwendet, das in 1 N Natronlauge gelöst wird und anschließend mit methanolischen Aminstandards dotiert wird. Als interne Standards dienen deuterierte Analoga der Analyten sowie 4-Amino-5-Nitrotoluol.

### **4.4.2 Geräte, Chemikalien und Lösungen**

#### **4.4.2.1 Geräte**

Gaschromatograph, massenselektiver Detektor mit der Möglichkeit zur negativen chemischen Ionisation und automatischer Probengeber.

Fused Silica Kapillarsäule 60 m x 0,32 mm x 0,35 µm, 14% Cyanopropyl-phenyl-86% Dimethyl-Polysiloxan (z.B. DB1701 Agilent)

20 mL Schraubgläschen mit Deckel und gummfreien, teflonkaschierten Septen

Bechergläser

Dispensoren mit Einstellung von 0-25 mL (z.B. von Brandt)

Einmalentnahmebestecke mit Antikoagulans z.B. Kalium-EDTA-Monovetten von Sarstedt

Festphasenextraktions-Leersäulen mit Weithals (z.B. von ICT)

GC-Vials mit Bördelkappe

Glasröhrchen (50 mL Ø 2,5 cm, Höhe: 15 cm)

konische GC-Microvials (200 µL) für kleine Volumina

Laborschüttler

Labor-Zentrifuge

Magnetrührer

Messkolben 10 mL, 100 mL

Mikroliterpipetten variabel einstellbar zwischen 1 und 10; 10 und 100, sowie 100 und 1000 µL (z.B. von Eppendorf)

Multipipetten (z.B. von Eppendorf)

pH-Meter

Rüttler (z.B. Vortex von Cenco, Niederlande)

Schütteltrichter

Trockenschrank

Ultraschallbad

Vakuumsikkator

Vakuumpumpe

Vakuumstation zur Festphasenextraktion (z.B. von Baker)

Vakuumzentrifuge

Wasserbad, thermostatisierbar bei 80°C

### **Vorbereitung der Probengläschen**

Die Gläschen werden mit etwa 2 mL Toluol gefüllt, verschlossen und 10 Minuten am Laborschüttler geschüttelt. Das Toluol wird verworfen. Die Gläschen werden im Trockenschrank bei mind. 100 °C ausgeheizt, Deckel und Septen können bei RT trocknen. Die Gläschen werden erst kurz vor der Verwendung aus dem Trockenschrank entnommen und auf Raumtemperatur gebracht.

### **4.4.2.2 Chemikalien**

2-Naphtylamin z.B. von Sigma-Aldrich

2-Naphtylamin-d<sub>7</sub> z.B. von CDN Isotopes

3,4-Dichloranilin z.B. von Riedel-de Haën

3,5-Dichloranilin z.B. von Riedel-de Haën

3-Chloranilin z.B. von Riedel-de Haën

4-Amino-5-Nitrotoluol z.B. von Sigma-Aldrich

4-Aminodiphenyl z.B. von Sigma-Aldrich

4-Aminodiphenyl-d<sub>9</sub> z.B. von CDN Isotopes

4-Chloranilin z.B. von Riedel-de Haën

Anilin z.B. von Sigma-Aldrich

Anilin-d<sub>5</sub> z.B. von CDN Isotopes

Diethylether Suprasolv (mit EtOH als Stabilisator) z.B. von Merck

Ethanol, p.a. z.B. von Merck

Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) z.B. von Fluka

Kaliumphosphat Trihydrat p.a. Merck

Methan 4.6 z.B. von Linde

Methanol Suprasolv z.B. von Merck

m-Toluidin z.B. von Fluka

Natriumhydroxid p. a. z. B. von Merck

n-Hexan Suprasolv z.B. von Merck

o-Anisidin z.B. von Sigma-Aldrich

*ortho*-Phosphorsäure p.a. (85%) z.B. von Merck

o-Toluidin z.B. von Fluka

o-Toluidin-d<sub>7</sub> z.B. von CDN Isotopes

physiologische Kochsalzlösung

p-Toluidin z.B. von Riedel-de Haën

## **Kollektive und Methoden**

---

Rinder-Hämoglobin z.B. von Sigma-Aldrich

Salzsäure, 1N z.B. von Merck

Stickstoff 6.0 z.B. von Linde

Toluol Suprasolv z.B. von Merck

Wasser für die HPLC z.B. von Merck

### **4.4.2.3 Lösungen**

#### **1 N Natronlauge**

In einen 1000-mL-Meßkolben werden 40,0 g NaOH eingewogen und unter Kühlung in einem Eisbad in ca. 500 mL Wasser gelöst. Anschließend wird der Kolben mit Wasser unter gelegentlichem Umschwenken bis zur Eichmarke aufgefüllt.

Analysenwöchentlich benötigte Mengen an 1 N Natronlauge werden 3 x mit jeweils dem gleichen Volumen an n-Hexan in einem Schütteltrichter ausgeschüttelt.

#### **0,02 M Phosphat-Puffer pH 8**

In einen 1000-mL-Meßkolben werden 5,4 g Kaliumphosphat Trihydrat eingewogen und in ca. 300 mL Wasser gelöst. Anschließend wird der Kolben mit Wasser unter gelegentlichem Umschwenken mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Die Lösung wird in eine braune Vorratsflasche überführt. Der pH-Wert wird unter ständigem Rühren und pH-Kontrolle (pH-Meter) mittels *ortho*-Phosphorsäure (85%, ca. 750 µL) auf pH 8 eingestellt.

Analysenwöchentlich benötigte Mengen an Phosphat-Puffer werden 3 x mit jeweils dem gleichen Volumen an n-Hexan in einem Schütteltrichter ausgeschüttelt.

#### **n-Hexan zur Extraktion**

Das für eine Aufarbeitungsserie benötigte Volumen an n-Hexan wird 3 x mit jeweils dem gleichen Volumen an 1 N HCl im Schütteltrichter ausgeschüttelt.

### **4.4.2.4 Vergleichsstandards**

#### **Stammlösungen (500 mg/L)**

Von den aromatischen Aminen werden getrennte methanolische Stammlösungen hergestellt. Dazu wiegt man ca. 25 mg der Substanzen in einen 50 mL-Kolben genau ein und füllt den Kolben mit Methanol bis zur Marke auf. Die Lösungen werden in 20 mL Schraubgläschen mit gummifreien Teflon-Septen und Deckel aliquotiert und bei -

## **Kollektive und Methoden**

---

18 °C im Kühlschrank gelagert. Unter diesen Bedingungen sind die Stammlösungen mindestens 1 Jahr haltbar.

### **Arbeitslösung Anilin (500 mg/L)**

Es wird die Anilin-Stammlösung mit einer Konzentration von 500 mg/L Methanol eingesetzt.

### **Arbeitslösung Gruppe B (Toluidine, Monochloraniline, 3,5-Dichloranilin: 50 mg/L)**

Jeweils 1 mL der Stammlösungen wird in einen 10 mL Kolben vorgelegt. Der Kolben wird bis zur Eichmarke mit Methanol aufgefüllt. Diese Lösung wird bei - 18 °C tiefgekühlt gelagert und ist so mindestens 1 Jahr haltbar.

### **Arbeitslösung Gruppe C (3,4-Dichloranilin, o-Anisidin, 4ADP, 2-Naphtylamin: 10 mg/L)**

Jeweils 200 µL der Stammlösungen werden in einen 10 mL Kolben vorgelegt. Der Kolben wird bis zur Eichmarke mit Methanol aufgefüllt. Diese Lösung wird bei - 18 °C tiefgekühlt gelagert und ist so mindestens 1 Jahr haltbar.

### **Zwischenverdünnung**

Jeweils 600 µL der drei Arbeitslösungen werden in einen 100 mL Kolben vorgelegt. Der Kolben wird bis zur Marke mit Methanol aufgefüllt. Diese Lösung wird bei - 18 °C tiefgekühlt gelagert und ist so mindestens 1 Jahr haltbar. (Anilin: 3000 µg/L; Gruppe B: 300 µg/L; Gruppe C: 60 µg/L)

### **Dotierlösung 1 (Gruppe A: 30 µg/L; Gruppe B: 3 µg/L; Gruppe C: 600 ng/L)**

100 µL der Zwischenverdünnung werden in einen 10 mL Kolben vorgelegt. Der Kolben wird bis zur Marke mit Wasser (HPLC-grade) aufgefüllt. Diese Lösung wird bei 6 °C im Kühlschrank gelagert und ist analysentäglich frisch herzustellen.

### **Dotierlösung 2 (Gruppe A: 7,5 µg/L; Gruppe B: 750 ng/L; Gruppe C: 150 ng/L)**

2,5 mL der Dotierlösung 1 werden in einen 10 mL Kolben vorgelegt. Der Kolben wird bis zur Marke mit Wasser (HPLC-grade) aufgefüllt. Diese Lösung wird bei 6 °C im Kühlschrank gelagert und ist analysentäglich frisch herzustellen.

## Kollektive und Methoden

### Kalibriermaterial

Die zur Kalibrierung verwendeten Vergleichsstandards werden durch Dotierung von Rinder-Hämoglobin (200 mg Hb gelöst in 4 mL 1 N NaOH) in einem Probenglas mit Schraubverschluss hergestellt. Das Pipettierschema ist Tabelle 12 zu entnehmen. Der auftretende Verdünnungsfehler kann vernachlässigt werden. Diese Vergleichsstandards sind vor jeder Analysenserie frisch anzusetzen.

Tabelle 12: Pipettierschema

Interner Standard [µL]	Volumen der Dotierlösungen [µL]		Konzentration der Vergleichsstandards [ng/L Blut]			Konzentration der Vergleichsstandards [pg/200 mg Hb]		
	1	2	Anilin	Gruppe B	Gruppe C	Anilin	Gruppe B	Gruppe C
50	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	50	300	30	6	375	37,5	7,5
50	-	100	600	60	12	750	75	15
50	50	-	1200	120	24	1500	150	30
50	100	-	2400	240	48	3000	300	60
50	200	-	4800	480	96	6000	600	120

### 4.4.2.5 Interne Standards

#### Stammlösungen der internen Standards (IS)

Es ist mit mehreren internen Standards zu arbeiten. Verwendet werden Anilin-d<sub>7</sub>, o-Toluidin-d<sub>7</sub>, 4-Aminodiphenyl-d<sub>9</sub>, 2-Naphtylamin-d<sub>7</sub> und 4-Amino-5-Nitrotoluol.

Je ca. 10 mg der internen Standards werden in je einem 10 mL Messkolben genau eingewogen, mit Methanol gelöst und bis zur Eichmarke aufgefüllt. Diese Lösungen sind bei -18 °C mindestens 1 Jahr haltbar. Die Konzentrationen dieser Lösungen betragen 1 g/L.

#### Arbeitslösung Interner Standard

500 µL der Stammlösung Anilin-d<sub>5</sub>, 500 µL 4-Amino-5-nitrotoluol, 50 µL o-Toluidin-d<sub>7</sub>, 10 µL 2-Naphtylamin-d<sub>7</sub> und 25 µL 4-Aminobiphenyl-d<sub>9</sub> werden in einen 100 mL-Kolben, in dem ca. 10 mL Methanol vorgelegt sind, pipettiert. Der Kolben wird mit

## **Kollektive und Methoden**

---

Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung ist tiefgekühlt bei - 18 °C mindestens 1 Monat haltbar.

### **Dotierlösung Interner Standard**

Von der Arbeitslösung Interner Standard werden 25 µL in einen 10 mL-Kolben, in dem ca. 1 mL Wasser (HPLC-grade) vorgelegt ist, pipettiert. Der Kolben wird mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Diese Dotierlösung ist analysentäglich frisch anzusetzen. Jeder zu analysierenden Probe werden 50 µL dieser Lösung zugesetzt.

## **4.4.3 Probennahme und Probenvorbereitung**

### **4.4.3.1 Probenahme**

Aus der Armvene werden mittels Einmalentnahmebesteck, das EDTA als Antikoagulant 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 Erythrozytenisolierung).

### **4.4.3.2 Lagerung**

#### **Blutproben**

Die Blutproben können 24 Stunden bei Raumtemperatur und bis max. 3 Tage bei 4°C - 6°C gelagert werden. Die Blutproben dürfen vor der Erythrozytenisolierung nicht tiefgefroren werden.

#### **Erythrozytenlysat**

Es ist zu empfehlen, die Erythrozyten unmittelbar nach der Blutentnahme zu gewinnen. Die isolierten ca. 2,5 mL Erythrozyten werden mit 7,5 mL dest. Wasser versetzt, homogenisiert und können bei ca. -18°C gelagert werden.

#### **Hämoglobin-Proben**

Das getrocknete Hämoglobin kann ca. 1-2 Wochen bei 4°- 6°C im Kühlschrank oder tiefgefroren bei -18°C gelagert werden.

### **4.4.3.3 Erythrozytenisolierung**

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 – 18 °C eingefroren.

### **4.4.3.4 Hämoglobin-Isolierung**

Die eingefrorene 10 mL-Erythrozyten-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 jeweils 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/H<sub>2</sub>O-Phase muss farblos sein. Ca. 4/5 des Überstandes werden dekantiert und verworfen. Ein Rest Ethanol/H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O überzuführen. Das Hämoglobin wird sich nach korrekter Aufarbeitung an dieser Stelle langsam absetzen (ca. 1 h). Die H<sub>2</sub>O-Phase sollte wiederum farblos sein.

Anschließend wird das Hämoglobin über Festphasenextraktions-Leersäulen mit Weithals an einer Festphasenstation abgenutscht. Dabei ist darauf zu achten, dass der Filterkuchen nicht trocken gesaugt wird; er ist zur Entfernung von Glutathion-



## **Kollektive und Methoden**

---

Resten direkt mit 125 mL H<sub>2</sub>O 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) in Portionen mehrfach 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 25mL-Kunststoffröhrchen überführt und in einem Vakuumexsikkator unter Anlegen eines Vakuums getrocknet.

### **4.4.3.5 Probenaufarbeitung**

Ca. 200 mg Hb werden in ein zuvor mit Toluol gespültes und bei 100 °C ausgeheiztes 20 mL Schraubdeckelglas mit gummifreien, ebenfalls gespülten Teflonsepten genau eingewogen.

Es werden 4 mL 1 N NaOH sowie 50 µL der Lösung des internen Standards hinzugefügt. Das Hämoglobin wird in Lösung gebracht durch intensives Aufschütteln am Vortex, 15 Minuten Schütteln auf der Schüttelmaschine (200/min), 5 Minuten Behandlung in einem Ultraschallbad, erneuten 15 Minuten auf der Schüttelmaschine, 5 Minuten im Ultraschallbad und weiteren 15 Minuten auf der Schüttelmaschine.

Anschließend gibt man jeweils 6 mL aufgereinigtes n-Hexan hinzu und schüttelt die Proben am Vortex bis sich die Farbe der Mischung leicht ins Dunkelrote verschiebt (ca. 15 sec). Zur Vervollständigung der Extraktion werden die Proben noch einmal 20 Minuten auf dem Laborschüttler geschüttelt. Im Anschluss werden die Proben 10 Minuten bei 2100 g zentrifugiert.

Zum Brechen der gelartigen Suspension werden die Proben nun für etwa 4 Minuten im Ultraschallbad behandelt und anschließend 10 Minuten bei 2100 g zentrifugiert. Ist durch dieses Vorgehen die Suspension noch nicht vollständig gebrochen, wird erneut im Ultraschallbad behandelt und zentrifugiert.

Die obere klare Hexanphase wird mit einer 5-mL Multipipette abgehoben und in ein zweites aufgereinigtes und ausgeheiztes 20 mL Schraubglas überführt.

## **Kollektive und Methoden**

---

Die Extraktionslösung wird anschließend in der Vakuumzentrifuge auf ca. 1 mL aufkonzentriert.

Man fügt 10 µL Heptafluorbuttersäureanhydrid hinzu und verschließt die Gläschen gasdicht. Nach kurzem Umschwenken bleiben die Gläschen 1h bei RT zur Derivatisierung stehen.

Anschließend werden den Proben jeweils 1 mL Phosphatpuffer pH 8 zugesetzt. Am Vortex-Rüttler wird intensiv geschüttelt bis sich kurzfristig ein weißer Schaum bildet.

Man zentrifugiert die Proben 10 Minuten bei 2100 g, hebt die obere Hexanphase ab und überführt sie in ein 2 mL-GC-Vial. Man pipettiert 100 µL Toluol hinzu und konzentriert anschließend die Proben auf etwa 150 µL in der Vakuumzentrifuge auf, und überführt die Lösung in ein spezielles, extraschmales Microvial. Darin werden die Proben abschließend auf 15 µL in der Vakuumzentrifuge aufkonzentriert. Die GC-Gläschen werden verschlossen und unmittelbar der Analyse mittels GC-MS zugeführt. Von diesen Lösungen werden jeweils 1 µL in den Gaschromatographen injiziert.

### **4.4.4 Gaschromatographisch-massenspektroskopische Arbeitsbedingungen**

Kapillarsäule:	Material:	Fused Silica
	Stationäre Phase:	DB 1701
	Länge:	60 m
	Innerer Durchmesser:	0,32 mm
	Filmdicke:	0,25 µm
Detektor:	Massenselektiver Detektor (MSD)	
Temperaturen:	Säule:	1 Minute bei 85 °C; dann Anstieg mit 25 °C/Min. bis 160 °C; 5 Minuten bei 160 C; dann Anstieg mit 10° C/Min. bis 280°C; 10 Minuten bei Endtemperatur
	Injektor:	280 °C
	Transfer Line:	280 °C
Trägergas:	He constant pressure, mit einem Säulenvordruck von 10 psi	

## **Kollektive und Methoden**

---

Reaktandgas:	Methan 4.9, der Druck des NCI-Gases in der Ionenquelle ist hinsichtlich optimaler Empfindlichkeit einzustellen: hier Aux: 1,2 torr bei $2,4 \cdot 10^{-4}$ torr am Manifold
Split:	splitless, split on nach 1 Minute
Septumspülung:	3 mL/Minute
Probenmenge:	1 $\mu$ L

### **4.4.5 MS – Arbeitsbedingungen**

Ionisations-Modus:	Negative Chemische Ionisation mit Methan als Reaktandgas bei 70 eV
Multiplifier-Spannung:	relativ -307 V
Quellen-Temperatur:	150 °C
Detektor-Temperatur:	100 °C

### **4.4.6 Analytische Bestimmung**

Die angegebenen Geräteparameter werden eingestellt und je 1  $\mu$ L der Analysenprobe wird in den Gaschromatographen injiziert. In Abbildung 8 wird ein GC-MS-Chromatogramm eines mit den Analyten gespiketen Rinder-Hämoglobins gezeigt.

Liegen die Messwerte oberhalb des Bereichs der Kalibriergeraden werden die Hb-proben mit 1 N NaOH im Verhältnis 1:10 verdünnt, erneut aufgearbeitet und analysiert. Bei jeder Analysenserie wird eine Qualitätskontrollprobe mitanalysiert. Es ist mit Reagenzienleerwerten zu rechnen. Daher ist ebenfalls bei jeder Analysenserie eine Leerprobe (4 mL 1 N NaOH) nach Vorschrift aufzuarbeiten und zu analysieren. Die einzelnen Aminoaromaten werden über die in Tabelle 13 aufgeführten Massen quantifiziert.

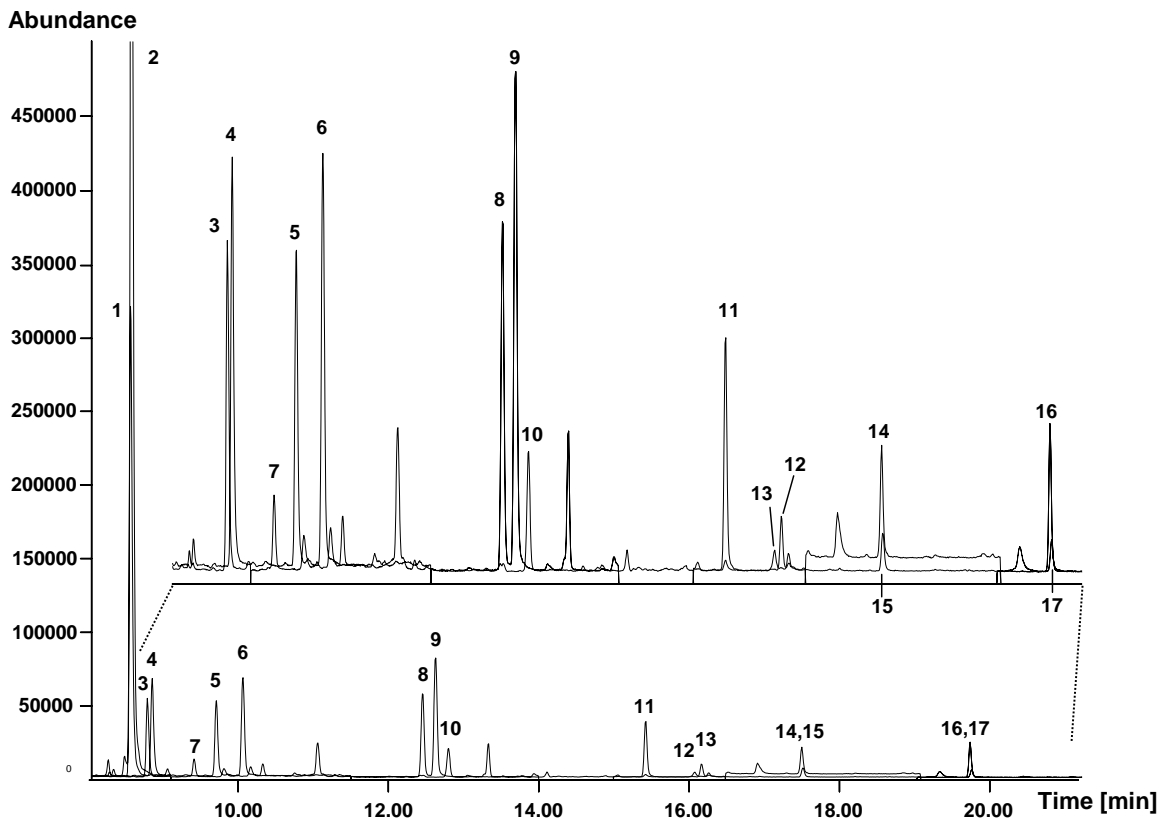
## Kollektive und Methoden

**Tabelle 13:** Retentionszeiten und zur Quantifizierung verwendete Massen

<b>Verbindung</b>	<b>Retentionszeit [Minuten]</b>	<b>Masse [g/mol]</b>	<b>Peak-Nr.</b>
Anilin-HFBA	8,58	269	1
Anilin-d <sub>5</sub> -HFBA (IS)	8,57	274	2
o-Toluidin-HFBA	8,85	283	3
o-Toluidin-d <sub>7</sub> -HFBA (IS)	8,79	290	4
m-Toluidin-HFBA	9,71	283	5
p-Toluidin-HFBA	10,06	283	6
o-Anisidin-HFBA	9,40	299	7
3-Chloranilin-HFBA	12,46	303*, 305	8
4-Chloranilin-HFBA	12,63	303, 305	9
4-Amino-5-nitrotoluol-HFBA (IS)	12,80	348	10
3,5-Dichloranilin-HFBA	15,43	307*, 309	11
3,4-Dichloranilin-HFBA	16,18	307*, 309	12
2-Naphthylamin-HFBA	17,53	319	15
2-Naphtylamin-d <sub>7</sub> -HFBA (IS)	17,51	326	14
4-Aminodiphenyl-HFBA	19,86	345	17
4-Aminodiphenyl-d <sub>9</sub> -HFBA (IS)	19,84	354	16

\* Quantifier-Ion (aufgrund der Isotopenverteilung des Chlor ist es auch im NCI-Modus möglich, eine Qualifier-Ionenspur aufzuzeichnen)

IS = interner Standard



**Abbildung 8:** Beispielchromatogramm eines dotierten Rinder-Hämoglobinstandards. Der obere Teil zeigt eine Vergrößerung der Peaks 3-17. (Peak 1: Anilin = 300 ng/L; Peaks 4, 5, 6, 8, 9, 11: Gruppe B = 30 ng/L; Peaks 12, 13, 14, 17: Gruppe C = 6 ng/L; siehe auch Abschnitt 4.2.2.4)

### 4.4.7 Kalibrierung

Die dotierten Rinder-Hämoglobin-Vergleichsstandards werden wie die Proben aufgearbeitet und entsprechend analysiert. Man erstellt die Kalibrierfunktionen, indem man die Quotienten der Peakflächen jedes aromatischenamins und des jeweiligen inneren Standards gegen die eingesetzten Konzentrationen aufträgt.

Der interne Standard Anilin- $d_5$  wird zur Quantifizierung von Anilin herangezogen, *o*-, *m*- und *p*-Toluidin werden über *o*-Toluidin- $d_7$  quantifiziert. Für *o*-Anisidin, 3- und 4-Chloranilin sowie 3,4- und 3,5-Dichloranilin wird 4-Amino-5nitrotoluol als interner Standard herangezogen. 2-Naphtylamin wird gegen 2-Naphtylamin- $d_7$  und 4-Aminodiphenyl gegen 4-Aminodiphenyl- $d_9$  bestimmt.

Die Kalibrierfunktionen der aromatischen Amine sind jeweils im Konzentrationsbereich zwischen 0,001 und mindestens 5,0  $\mu\text{g/l}$  linear. Dies wurde anhand von dotierten, wässrigen Standardlösungen und dotierten Rinderhämoglobinproben überprüft.

### **4.4.8 Berechnung des Analyseergebnisses**

Die ermittelte Peakfläche wird durch die Peakfläche des inneren Standards dividiert. Mit den so erhaltenen Quotienten geht man in die entsprechende Kalibrierkurve ein und ermittelt die zugehörige Konzentration in  $\mu\text{g/L}$  bzw.  $\text{ng/L}$  Blut. Falls das zur Herstellung der Vergleichsstandards eingesetzte Hämoglobin Hintergrundbelastungen aufweist, ist die resultierende Kalibriergerade parallel so zu verschieben, dass sie durch den Koordinatenursprung verläuft. (Die Konzentrationen der Hintergrundbelastung können jeweils am Achsenabschnitt vor der Parallelverschiebung abgelesen werden.) Ermittelte Reagenzienleerwerte sind von den Analyseergebnissen der Realproben zu subtrahieren.

### **4.4.9 Standardisierung und Qualitätssicherung**

Zur Sicherung der Qualität der Analyseergebnisse wird eine Kontrollprobe mit untersucht, die eine konstante Konzentration der einzelnen aromatischen Amine aufweist. Da käufliches Material nicht zur Verfügung steht, muss das Kontrollmaterial selbst hergestellt werden. Dazu löst man vor jeder Analysenserie Human- oder Rinderhämoglobin in 1 N NaOH und versetzt diese Lösung mit definierten Mengen der einzelnen aromatischen Amine. Die Konzentration dieses Kontrollmaterials sollte im entscheidungsrelevanten Konzentrationsbereich liegen. Untersucht man Personen der Allgemeinbevölkerung auf ihre Hintergrundbelastung, so empfiehlt es sich, aus einer größeren Menge Humanblutes Hämoglobin zu isolieren, tiefgekühlt bei  $-18\text{ °C}$  zu lagern und dieses zur Qualitätskontrolle einzusetzen. Der Sollwert und die Toleranzbereiche des Qualitätskontrollmaterials werden im Rahmen einer Vorperiode ermittelt.

### **4.4.10 Beurteilung des Verfahrens**

#### **4.4.10.1 Präzision**

Die Ermittlung der Präzision in der Serie erfolgte durch wiederholte Bestimmung ( $n = 9$ ) der Peakflächen der Analyten im Verhältnis zu den Peakflächen der entsprechenden internen Standards bei einer dotierten Rinder-Hämoglobinprobe. Die relative Standardabweichung lag zwischen 5,3 % für 2-Naphtylamin 4-Aminodiphenyl und 11,6 % für 3,4-Dichloranilin (Tabelle 14).

## Kollektive und Methoden

**Tabelle 14:** Präzision in der Serie für dotiertes Rinder-Hämoglobin (n=9)

Substanz	Konzentration dotiert [ng/L]	Leerwert im Hb [ng/L]	Konzentration bestimmt [ng/L]	Präzision in der Serie [%]
Anilin	450	534	960	6,8
o-Toluidin	45	65	106	8,9
m-Toluidin	45	13	61	8,1
p-Toluidin	45	43	90	8,0
o-Anisidin	9	40	49	7,9
3-Chloranilin	45	34	80	10,3
4-Chloranilin	45	38	82	10,1
3,5-Dichloranilin	45	8,2	55	9,3
3,4-Dichloranilin	9,0	5,0	13,8	11,6
2-Naphthylamin	9,0	0,0	9,1	5,3
4-Aminodiphenyl	9	0,0	9,3	9,9

Darüber hinaus wurde die Präzision von Tag zu Tag bestimmt. Hierzu wurde ein anderes Rinderhämoglobin wie zur Bestimmung der Präzision in der Serie eingesetzt und dotiert. Diese Hämoglobinproben wurden an 6 verschiedenen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Es ergaben sich dabei Präzisionen zwischen 9,7 und 15,1 % (vgl. Tabelle 15).

**Tabelle 15:** Präzision von Tag zu Tag für dotiertes Rinder-Hämoglobin (n=6)

Substanz	Konzentration dotiert [ng/L]	Leerwert im Hb [ng/L]	Konzentration bestimmt [ng/L]	Präzision von Tag zu Tag [%]
Anilin	20	151	172	13,1
o-Toluidin	20	138	151	11,1
m-Toluidin	20	23	41	12,2
p-Toluidin	20	25	47	14,0
o-Anisidin	20	63	80	15,0
3-Chloranilin	20	40	61	14,8
4-Chloranilin	20	31	49	13,7

## Kollektive und Methoden

Substanz	Konzentration dotiert [ng/L]	Leerwert im Hb [ng/L]	Konzentration bestimmt [ng/L]	Präzision von Tag zu Tag [%]
3,5-Dichloranilin	20	9	31	14,5
3,4-Dichloranilin	20	3,5	24	15,1
2-Naphthylamin	20	0,0	21	9,9
4-Aminodiphenyl	9	1,0	24	9,7

### 4.4.10.2 Richtigkeit

Zur Prüfung der Richtigkeit der Methode wurden Wiederfindungsversuche durchgeführt. Hierzu wurden dotierte und aufgearbeitete Rinderhämoglobinproben nach rechnerischem Abzug des aus 2 Messungen ermittelten 9mal analysiert. Die relativen Wiederfindungsraten lagen zwischen 96,5 % und 107,4%. Eine Richtigkeitsbestimmung auf der Basis der aufarbeitungsbedingten Verluste erfolgte nicht, da keine entsprechenden Referenzsubstanzen zur Verfügung standen. Anhand des Vergleiches zwischen wässriger Kalibrierung und der Kalibrierung mit Rinder-Hb-Standards wurden jedoch die Extraktionsausbeuten abgeschätzt. Die Extraktionsausbeuten waren vergleichbar mit denen bei einer Extraktion aus Urin bei pH 6 (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 16:** relative Wiederfindungen in dotiertem Rinder-Hämoglobinproben (n=9)

Substanz	Konzentration dotiert [ng/L]	Leerwert im Hb [ng/L]	Konzentration bestimmt [ng/L]	rel. Wiederfindung [%]
Anilin	450	534	960	97,5
o-Toluidin	45	65	106	96,5
m-Toluidin	45	13	61	105,6
p-Toluidin	45	43	90	102,6
o-Anisidin	9,0	40	49	101,6
3-Chloranilin	45	34	80	101,4
4-Chloranilin	45	38	82	99,2
3,5-Dichloranilin	45	8,2	55	104,0
3,4-Dichloranilin	9,0	5,0	13,8	98,5
2-Naphthylamin	9,0	0,0	9,1	101,1
4-Aminodiphenyl	9,0	0,0	9,3	103,6



### **4.4.10.3 Nachweisgrenzen**

Legt man ein Signal-Rausch-Verhältnis von 1:3 zugrunde, so ergeben sich für die hier gemessenen aromatischen Amine Nachweisgrenzen von je ca. 0,5 ng/L. Diese formale Nachweisgrenze der Methode kann für die ubiquitär vorhandenen Aminoaromaten in praxi nicht geprüft werden, da sie unterhalb der Hintergrundbelastungen liegt.

### **4.4.10.4 Störeinflüsse**

Es wurde beobachtet, dass der Gehalt an aromatischen Aminen in dotierten wässrigen Lösungen innerhalb von 4 Wochen bei Lagerung bei Raumtemperatur auf etwa 20 % absinkt. Vermutlich werden die aromatischen Amine unter diesen Bedingungen oxidiert. Aus diesem Grund sind die wässrigen Lösungen zum Ansetzen der Rinderhämoglobinstandards und die wässrige Dotierlösung der Internen Standards erst unmittelbar vor einer Analysenserie aus den methanolischen Arbeitslösungen herzustellen. In methanolischen Lösungen wurde ein solcher Abbau der Analyten auch nach mehrmonatiger Lagerung bei ca. 8°C nicht beobachtet werden. In Realproben ist mit einer Abnahme der Konzentrationen nicht zu rechnen, da die Amine als Sulfinsäureamide am Hämoglobin gebunden vorliegen und sich damit einer Oxidation an der Aminfunktion entziehen.

Bei der Hämoglobinisolierung sollte darauf geachtet werden, dass die Ethanol/Wasser-Phase farblos ist. Falls diese noch gefärbt ist, ist mit Fällverlusten und Schwierigkeiten bei der Weiterverarbeitung des Hämoglobins zu rechnen.

Beim Lösen des isolierten Hämoglobins in der Natronlauge muss darauf geachtet werden, dass keine ungelösten Hämoglobinreste in der Lösung verbleiben. Ggf. sind solche Reste durch zusätzliche Behandlung im Ultraschallbad in Lösung zu bringen.

Die Derivatisierung verläuft nur in nicht-wässriger Umgebung vollständig und reproduzierbar. Es ist daher beim Trennen der wässrigen von der organischen Phase darauf zu achten, dass kein Wasser in die organische Phase eingeschleppt wird.

Die Extrakte dürfen nicht vollständig zur Trockene eingeeengt werden. Dabei werden erhebliche Analytverluste beobachtet. Auch auf den alternativen Einsatz eines Stickstoff-Evaporators anstatt der empfohlenen Vakuumzentrifuge (SpeedVac) für die Aufkonzentrierungsschritte sollte verzichtet werden. Hier wurden bei der Aufkonzentrierung der Proben deutliche Verluste beobachtet.

Größte Beachtung ist der Problematik der Reagenzienleerwerte zu schenken. Dies wird umso deutlicher wenn man bedenkt, dass in etwa 1 Liter Raumluft Amin-Konzentrationen vorherrschen können (Palmiotto et al. 2001), die in den Proben Blindwerte für Anilin in Höhe von etwa 300 ng/L und bei den Toluidinen bis zu 50 ng/L hervorrufen würden. Aufgrund des ubiquitären Vorhandenseins der Amine in der Umwelt ist es nicht möglich, die Reagenzienleerwerte vollständig zu eliminieren. Bei größter Sorgfalt, der Verwendung von gummifreien Arbeitsmitteln sowie dem Einhalten der oben genannten Waschprozeduren können die Reagenzienleerwerte für Anilin unterhalb von 100 ng/L und für die Toluidine sowie die chlorierten Aniline unterhalb von 5 ng/L gesenkt werden.

### **4.4.11 Diskussion der Methode**

Mit der beschriebenen Methode können die Hämoglobin-Addukte der aromatischen Amine nach beruflich bedingten Aminoaromaten- bzw. Nitroaromaten-Belastungen spezifisch, zuverlässig und reproduzierbar analysiert werden. Darüber hinaus ist es mit dieser Methode möglich, umweltbedingte Hintergrundbelastungen der Allgemeinbevölkerung an einer Vielzahl von aromatischen Aminen zu quantifizieren.

Benzidin und seine Derivate (3,3'-Dimethylbenzidin, 3,3'-Dichlorbenzidin, 3,3'-Dimethoxybenzidin) lassen sich mit dem vorliegenden Verfahren nicht hinreichend zuverlässig bestimmen. Ggf. könnten hier isotopenmarkierte interne Standards der Benzidine Abhilfe schaffen. Mit diesem Verfahren sollten nicht nur die hier erwähnten Aminoaromaten, sondern eine Vielzahl weiterer aromatischer Amine bis in den umweltrelevanten Bereich analysierbar sein. Die Eignung der Methode ist jedoch im Einzelfall insbesondere im Hinblick auf die Zuverlässigkeitskriterien zu überprüfen.

Ein Verfahren, mit der aus einer bzgl. der Extraktion schwierig zu handhabenden Proteinmatrix ein so breites Spektrum an Analyten unterschiedlicher physikalisch-chemischer Eigenschaften über einen weiten Konzentrationsbereich bestimmbar ist, stellt letztlich immer einen Kompromiss dar hinsichtlich der Ansprüche an Zuverlässigkeitskriterien (Präzisionen, Wiederfindungen, aufbereitungsbedingte Verluste) und der Praktikabilität in der Laborroutine. Dies wird umso deutlicher, wenn man die pKs-Werte der Analyten betrachtet, die zwischen 0,55 (2A46DNT) und 5,15 (p-Toluidin) liegen. Vor diesem Hintergrund sind die Zuverlässigkeitskriterien der hier beschriebenen Methode als gut bis sehr gut zu bezeichnen. Obwohl nicht für alle Analyten isotopenmarkierte Interne Standards zur Verfügung standen, liegen die Präzision von

## **Kollektive und Methoden**

---

Tag zu Tag zwischen 9,7 und 15,1 %, die Präzisionen in der Serie liegen noch darunter.

Verglichen mit der weiter oben beschriebenen Methode zur Bestimmung der aromatischen Amine im Urin, ist das Verfahren zur Bestimmung der entsprechenden Hb-Addukte sehr viel aufwendiger.

Zunächst müssen die das Hämoglobin beinhaltenden Erythrozyten von anderen Blutbestandteilen abgetrennt werden. Dies wird durch mehrfache vorsichtige Zentrifugation unter Einbeziehung von Waschschritten (physiologische Kochsalzlösung) erreicht. Dabei müssen die roten Blutzellen intakt bleiben. Die Blutzellen werden anschließend durch Zugabe von destilliertem Wasser lysiert und das darin enthaltene Hämoglobin in gelöster Form in die wässrige Phase freigesetzt. Die Zelldebris wird durch Zentrifugation entfernt. Da in dieser Lösung weitere Blutproteine (z.B. Glutathion) vorhanden sind, die ebenfalls kovalent gebundene aromatische Amine enthalten können, muss eine vollständige Abtrennung des Hämoglobins von anderen Blutproteinen erfolgen. Die Fällungsmethode der vorliegenden Vorschrift reduziert die Präsenz möglicher GSH-Addukte, indem sie das Hämoglobin selektiv ausfällt und durch mehrere Waschrinne andere Blutproteine entfernt. Dies würde ansonsten bei kurzfristigen akuten Expositionen (GSH-Addukte) zu einer Überbewertung der durchschnittlichen effektiven Exposition (Hb-Addukte) führen.

Die in dieser Arbeit verwendete Hämoglobin-Fällungsmethode ist zwar relativ aufwendig, stellt aber sicher, dass nur geringe Reste an GSH in der Hämoglobinfraktion verbleiben und somit das Analysenergebnis nicht falsch zu hoch erscheinen lässt. Bei der Dotierung von Erythrozyten-Lysaten mit Glutathion-Addukten von aromatischen Aminen werden mit der beschriebenen Fällungsmethode nur etwa 0,2% der dotierten GSH-Addukte wieder gefunden (Lewalter und Gries 2000, 2001).

Aus 1,25 mL EDTA-stabilisiertem Vollblut werden im Durchschnitt 200 mg (190 – 212 mg) Hämoglobin isoliert. Die Schwankung der Hämoglobin-Wiederfindung beträgt dabei nur  $\pm 3\%$  (Lewalter und Gries 2000, 2001). Aus diesem Grund können alle quantitativen Analysenergebnisse volumenbezogen auf 1 Liter Blut angegeben werden.

Da die aromatischen Amine in Form von Sulfin säureamid en kovalent am Hämoglobin gebunden vorliegen, muss das Hämoglobin zur Freisetzung der Analyten hydrolysiert werden. Prinzipiell ist es möglich, die Konjugate durch alkalische bzw. saure Hydro-

## **Kollektive und Methoden**

---

lyse abzuspalten. Im Säuren müssten allerdings Bedingungen gewählt werden, die zu einer zumindest teilweisen Hydrolyse der Aminosäuresequenz des Proteins führen würde. Dies wiederum würde zu größeren Schwierigkeiten bei einer sich anschließenden Extraktion führen. Im Alkalischen besteht allerdings bei aromatischen Aminen die Gefahr, dass sie zu den entsprechenden Nitrosoverbindungen oxidiert werden. Um dies weitestgehend auszuschließen, dürfen sich die Proben dabei nicht auf über 30 °C erwärmen. Auch andere in der Literatur beschriebene Verfahren greifen ausnahmslos auf eine alkalische Hydrolyse zurück.

Die Kalibrierung erfolgt, indem man Rinderhämoglobin, das in 1 N NaOH gelöst wird mit den entsprechenden aromatischen Aminen dotiert und weiter wie die zu untersuchenden Realproben behandelt. In diesen Standards (und den internen Standards) liegen die Analyten jedoch nicht in Form von an ein Protein gebundene Sulfinsäureamide vor. Das bedeutet, dass diese Art der Kalibrierung zwar die Extraktion und die nachfolgenden Schritte wie Derivatisierung und Aufkonzentrierung abdeckt, nicht jedoch die Hydrolyse zum Freisetzen der Amine aus ihren Addukten. Aus diesem Grund muss unbedingt sichergestellt sein, dass die Hydrolyse der Proben erschöpfend ist. Dies wird dadurch erreicht, dass eine im Vergleich zu den meisten in der Literatur beschriebenen Verfahren (0,1 N NaOH) höher konzentrierte Natronlauge (1 N) eingesetzt wird und die Proben zusätzlich im Ultraschallbad behandelt werden. Die angegebenen Hydrolysezeiten müssen dabei unbedingt eingehalten werden und es sicherzustellen, dass sämtliches Hämoglobin vollständig aufgelöst ist. Wird hingegen 0,1 N NaOH eingesetzt, muss die Hydrolysedauer mindestens verdoppelt werden, da ansonsten insbesondere beim Anilin keine vollständige Spaltung der Addukte erreicht wird.

Eine Kalibrierung, die auch den Schritt der Hydrolyse abdeckt, könnte durch den Einsatz von Di- oder Tripeptidstandards mit einem terminalen Cystein oder gar Hämoglobin- bzw. Globinstandards erfolgen, an die die Analyten als Sulfinsäureamide kovalent gebunden sind. Solche Standards sind jedoch bisher kommerziell nicht erhältlich und müssten unter großem Aufwand synthetisiert werden.

Als Extraktionsmittel wurden verschiedene organische Lösungsmittel unterschiedlicher Polaritäten getestet (n-Hexan, n-Heptan, Ethylacetat, Diethylether, Dichlormethan). Ein Absenken des pH-Werts unterhalb von etwa pH 10 ist nicht möglich, da ansonsten das Hämoglobin ausfällt. Dies war aber auch nicht notwendig, da bei pH 12 im Gegensatz zur Analytik aus Urin hinreichend saubere Extrakte gewonnen wur-

## **Kollektive und Methoden**

---

den. n-Hexan sowie Dichlormethan stellten sich -wie auch bei der Matrix Urin- als die am besten geeigneten Extraktionsmittel heraus. Dichlormethan als Extraktionsmittel ist jedoch im Routinebetrieb relativ schwer handhabbar. Es besitzt eine größere Dichte als Wasser, ein Trennen von organischer und wässriger Protein-Phase mittels Pipette ist daher wenig praktikabel. Darüber hinaus besitzt n-Hexan gegenüber Dichlormethan den großen Vorteil, praktisch nicht mit Wasser mischbar zu sein (n-Hexan zu ca. 0,05 ‰; Dichlormethan zu ca. 2%). D.h. ein ansonsten notwendiger Trocknungsschritt (z.B. mit NaSO<sub>4</sub>) für eine nachgeschaltete Derivatisierung mit einem Anhydrid kann entfallen.

Auf einen zweiten Extraktionsschritt wurde aus Praktikabilitätsgründen verzichtet. Wie Vorversuche zeigten, ist ein erster Extraktionsschritt bei pH 6 hinreichend erschöpfend. Beim Vergleich zwischen erster und zweiter Extraktion lagen die Ausbeuten hier in der Regel weit über 85%. Die Extraktionsausbeuten sind damit leicht schlechter als beim oben beschriebenen Verfahren zur Bestimmung der Amine aus Urin. Dies dürfte seine Ursache in den emulgierenden Eigenschaften des Hämoglobins haben.

Diese Eigenschaften erschweren auch die Trennung der organischen Phase von der wässrigen Proteinphase. Durch Zentrifugation (2100 g) alleine lässt sich die nach intensivem Ausschütteln erhaltene Suspension nicht brechen. Lösung bietet in diesem Fall eine Behandlung der Proben im Ultraschallbad mit sich anschließender erneuter Zentrifugation. Darüber hinaus ist es möglich, die Suspension zu brechen, indem man die Proben mehrfach bei - 18°C einfriert und zentrifugiert. Ein solches Vorgehen ist jedoch sehr zeitaufwendig und verlängert die Aufarbeitungsphase um mindestens einen Arbeitstag. Andere Arbeitsgruppen lösen dieses (zeitliche) Problem, indem Sie die Proben in flüssigem Stickstoff einfrieren. Eine solche oder ähnliche Möglichkeit, zum schnellen Einfrieren stand jedoch nicht zur Verfügung.

Darüber hinaus wurden Vorversuche unternommen, die aromatischen Amine über eine Festphasenextraktion anzureichern. Getestet wurden unter anderem eine Isolut-101 Phase sowie C18- und C8-Material. Für das 101-Material konnten aufgrund der pH-abhängigen Löslichkeit des Hämoglobins, keine geeigneten Bedingungen gefunden werden, die eine hinreichende Aufreinigung und Anreicherung der Analyten gestatteten. Beim C18- und C8-Material hingegen führten häufige Säulenverstopfungen zu großen Problemen. Darüber hinaus wurde eine chromatographisch nicht vom o-Toluidin abzutrennende unbekannte Störkomponente mit angereichert.

## **Kollektive und Methoden**

---

An die Extraktion schließt sich im vorgelegten Verfahren ein erster Aufkonzentrierungsschritt (6 mL -> 800 µL) an. Dieser Schritt ist notwendig, um eine vollständige und reproduzierbare Derivatisierung mit einem Minimum an Derivatisierungsmittel zu erreichen. So reichen in der vorliegenden Fassung 10 µL an HFPA aus. Erfolgt ein solcher erster Aufkonzentrierungsschritt nicht, müssten etwa 80 µL eingesetzt werden. Diese relativ große Menge an Derivatisierungsmittel würde aber auch ein erhöhtes Risiko einer externen Kontamination (siehe Abschnitt 4.4.10.4) in sich bergen und würde darüber hinaus die Analysenkosten erheblich erhöhen. Im Verfahren zur Bestimmung der Hb-Addukte wurde Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) der Vorzug vor PFPA als Derivatisierungsmittel gegeben. Die HFBA-Derivate lieferten einen höheren Response im MS-System und waren chromatographisch nicht durch co-eluierende Substanzen, wie es teilweise im Fall der Matrix Urin festgestellt wurde, gestört.

An die Derivatisierung schließt sich ein Waschschrift mit einem Phosphatpuffer (pH 8) an, um überschüssiges Derivatisierungsmittel, das das GC/MS-System stark belasten würde, und weitere Störkomponenten zu entfernen. Im Anschluss an die Waschprozedur werden die Proben ohne weiteren Trocknungsschritt auf ein Endvolumen von 10 µL aufkonzentriert. Dazu werden den Proben zuvor 50 µL Toluol als Keeper zugesetzt. Die Aufkonzentrierung sowohl im ersten Schritt vor der Derivatisierung als auch im zweiten Schritt nach erfolgter Derivatisierung und dem zusätzlichen Waschschrift darf keinesfalls mit einer herkömmlichen Stickstoffabblas-Station vorgenommen werden. Bei der Aufkonzentrierung im Stickstoffstrom wurden große Verluste vor allem der leichter-flüchtigen, einkernigen Amine beobachtet.

Da bereits in einem Liter Raumluft Aminkonzentrationen vorliegen können, die Reagenzienleerwerte für Anilin von etwa 300 ng/L und für o-Toluidin im Bereich um 50 ng/L hervorrufen können, ist besonderes Augenmerk auf die Reagenzienleerwerte zu richten. Das Verfahren wurde in seiner Gesamtheit dahingehend ausgerichtet, dass die Gefahr einer externen Kontamination möglichst gering gehalten wird (Aufreinigung von Lösungen und Geräten, Verzicht auf Gummihaltige Materialien, 1fache Extraktion, Verfahren der Aufkonzentrierung zur Reduzierung des Derivatisierungsmittelbedarfs, Verzicht auf Trocknungsschritt). Dennoch war es nicht möglich, die Reagenzienleerwerte für Anilin, die drei Toluidine sowie die Monochloraniline unter die Nachweisgrenze zu senken. Daneben wurden keine weiteren Reagenzienleerwerte beobachtet. Durch die vorgeschriebenen Waschprozeduren ist es jedoch mög-

## ***Kollektive und Methoden***

---

lich, die Reagenzienleerwerte soweit abzusenken, dass eine valide Quantifizierung auch der Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung möglich ist.

Die Abtrennung sämtlicher Analytenpeaks ist mit den oben angegebenen chromatographischen Bedingungen problemlos möglich (siehe auch Abbildung 13). Störungen durch Matrixbestandteile wurden bisher nicht beobachtet. Wegen der hohen Reinheit des derivatisierten Hämoglobin-Extraktes konnte auf die Absicherung durch weitere Massen verzichtet werden. Die NCI-Bedingungen konnten deshalb dahingehend optimiert werden, dass die HFBA-Derivate der Analyten ohne nennenswerte weitere Zerfälle fragmentieren und somit maximale Sensitivität erreicht wird. Aufgrund der natürlichen Isotopenverteilung des Chlors können jedoch auch unter den eingestellten Bedingungen bei den Monochloranilinen wie auch bei den Dichloranilinen weitere Ionenspuren als Qualifier zur Absicherung des Analyseergebnisses herangezogen werden.

In der vorliegenden Form gestattet die Methode die Analyse selbst größerer Probenserien. So ist es einer versierten Laborkraft ohne weiteres möglich an einem Arbeitstag aus etwa 24 Erythrozytenlysatsproben Hämoglobin zu isolieren und an einem weiteren Tag die restliche Probenvorbereitung auszuführen.

In der Literatur sind mehrere Verfahren zur Bestimmung von Hb-Addukten aromatischer Amine aus Blut beschrieben (Tabelle 17). Diese Verfahren unterscheiden sich meist durch die Art der Hämoglobinisolierung und -aufreinigung (unterschiedliche Fällverfahren, Dialyse), die Art der Extraktion (flüssig/flüssig mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln, Festphasen), die chromatographische Trennung und die Art der Detektion.

Zur Isolation des Hämoglobins und dessen Abtrennung von anderen Blutproteinen werden in der Regel zwei prinzipiell unterschiedliche Verfahren eingesetzt: die Dialyse des Erythrozytenlysats sowie die Fällung des Hämoglobins mit anschließender Aufreinigung unter Verwendung von unterschiedlichen Lösungsmitteln. Das Dialyseverfahren hat allerdings den großen Nachteil, dass es sehr zeitintensiv ist. So müssen die Hb-Proben zumeist 2 Tage der Dialyse unterworfen werden, um eine hinreichende Abtrennung von nicht kovalent gebundenen Aminen sowie anderen Blutproteinen, die die Amine kovalent gebunden beinhalten können, zu entfernen.

Das in dieser Arbeit eingesetzte Verfahren mittels Fällung in Ethanol und weiteren Waschschritten weist zwar einen relativ hohen Bedarf an Lösungsmitteln auf, ist je-

## ***Kollektive und Methoden***

---

doch vergleichsweise schnell durchzuführen und stellt die nahezu vollständige Abtrennung nicht kovalent gebundener Amine sowie anderer Blutproteine sicher. Die diesbezügliche Effizienz des gewählten Verfahrens ist im Gegensatz zu anderen in der Literatur beschriebenen Verfahren gut dokumentiert (z.B. Lewalter und Gries 2001).

Mit Ausnahme der HPLC-Methoden von Riffelmann et al. 1995 (HPLC-ED) und Pinorini-Godly und Myers 1996 (HPLC-UV) arbeiten sämtliche der in der Literatur beschriebenen Verfahren mittels kapillargaschromatographischer Trennung und anschließender massenselektiven Detektion. Dabei kommt neben des Einsatzes der hochauflösenden Sektorfeld-Massenspektroskopie (Lewalter und Gries 2001; Pastorelli et al. 1998) vornehmlich eine Detektion am Quadrupol-MS kombiniert mit negativer chemischer Ionisation zum Einsatz.

Der Großteil der in der Literatur zu findenden Verfahren ist nur auf einige, wenige Analyten beschränkt. Die Nachweisgrenzen der Literaturverfahren liegen oftmals im Bereich der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode. Für die Dichloraniline ist bisher in der Literatur kein Verfahren beschrieben, das ähnlich sensitiv ist.

Es liegt somit ein Sammel-Verfahren vor, das ein äußerst breites Spektrum unterschiedlichster Anilinderivate als Addukte am Hämoglobin erfasst und gleichzeitig eine vergleichbar hohe Empfindlichkeit aufweist, wie sie in der Regel nur mit Verfahren erreicht wird, die auf einen einzelnen oder einige, wenige Analyten optimiert sind.



## Kollektive und Methoden

**Tabelle 17:** In der Literatur beschriebenen Verfahren zur Bestimmung von Hb-Addukten aromatischer Amine

Prinzip	Hb-Aufreinigung	Extraktion	NWG [ng/L]	Parameter	Referenz
GC/MS-NCI	Fällung und Waschen	fl/fl Hexan	0,5- 2	siehe oben	diese Arbeit
GC/HRMS	Fällung und Waschen	SPE C18	1	A, o-, m-, p-T, 1, 2NA, 4ADP, 4CIA, oA, MDA	Lewalter und Gries 2001
GC/MS-NCI	Dialyse	SPE C18		o-, m-, p-T, oA, ADP	Richter et al. 2001
GC/MS-NCI	Fällung und Waschen	fl/fl Hexan	1	Chloraniline, 4ADP, 1NA, 2NA, Alkylaniline	Sabbioni und Bayerbach 1995
GC/MS-NCI	Dialyse	fl/fl Hexan	1	o-, m-, p-T, 2NA, 4ADP	Bryant et al. 1987, Stillwell et al. 1987, Bryant et al. 1988
GC/MS	Fällung und Waschen	fl/fl Ether/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /Ether	1000	A, o-, m-, p-T, 4ADP, 1Na, 2NA, 3CIA, 4CIA	Lewalter und Biedermann 1994
GC/MS-NCI	Dialyse	SPE C18	0,1	o-, m-, p-T, oA	Kutzer et al. 1997
HPLC/ED	Fällung und Waschen	SPE Extrelut		A, o-, m-T, 4CIA, 2NA	Riffelmann et al. 1995
GC/HRMS-NCI	Fällung und Waschen	SPE Extrelut	13	3,4DCIA	Pastorelli et al. 1998
GC/MS-NCI	Dialyse	fl/fl Hexan	1	4ADP	Dallinga et al. 1998
GC/MS-NCI	Fällung und Waschen	fl/fl Dichlormethan	130	2A46DNT, 4A26DNT	Sabbioni et al. 1996
GC/MS-NCI	Dialyse	fl/fl Dichlormethan	0,2	4ADP	Pinorini-Godly und Myers 1996
HPLC-UV	Dialyse	fl/fl Dichlormethan	0,2	4ADP	Pinorini-Godly und Myers 1996
GC/MS-NCI	Dialyse	fl/fl Dichlormethan	1	4ADP	Del Santo et al.
GC/MS-NCI	Fällung und Waschen	SPE Chemelut	0,6	MDA	Schütze et al. 1995
GC/MS-NCI	Dialyse	fl/fl Hexan	0,5	4,4'-Methylenebis(2-Chloranilin)	Vaughan und Kanyon 1996

### **4.5 Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung und zur Berechnung der Ergebnisse wurden Microsoft Excel 2002, SPSS 11.0 und Microcal Origin 6.0 herangezogen. Die Berechnung von Signifikanzniveaus zwischen zwei Teilkollektiven erfolgte unter Anwendung des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben.

Werte unterhalb der Nachweisgrenze gingen in die statistischen Berechnungen mit dem Zahlenwert der jeweils halben Nachweisgrenze ein.

## **5 Ergebnisse und Diskussion**

### **5.1 Biological Monitoring**

Die Ergebnisse der Harnuntersuchung der Allgemeinbevölkerung, sowie aufgeteilt nach ländlicher und städtischer Bevölkerung, sind in Tabelle 18 zusammengestellt. Die städtische wie auch die ländliche Allgemeinbevölkerung scheidet die u.a. im Tabakrauch enthaltenen Amine Anilin, o-Anisidin sowie o-, m- und p-Toluidin aus. Die möglichen Pflanzenschutzmittel-Metabolite 3- und 4-Chloranilin wie auch 3,4- und 3,5-Dichloranilin sind ebenso in den untersuchten Urinproben zu finden.

Während Anilin und o-Anisidin in nahezu allen Proben nachgewiesen werden konnte, waren die Toluidine und das 4-CIA sowie das 3,5-DCIA noch in mehr als 2/3 der Proben zu quantifizieren. 3-CIA sowie 3,4-DCIA waren nur in jeweils etwa 20% der untersuchten Urinproben vorhanden. Bei einer Nachweisgrenze in Höhe von 0,075 µg/L bzw. 0,05 µg/L (Tabelle 10) konnten weder 2NA noch 4ADP in den Urinproben nachgewiesen werden. In den untersuchten Urinproben konnten darüber hinaus weder 4-Bromanilin noch 4-Isopropylanilin oder 2,4-Dimethylanilin gefunden werden, obwohl entsprechende Pflanzenschutzmittel, die diese Verbindungen als Struktureinheiten beinhalten, in Deutschland in großem Maßstab eingesetzt werden. Zumindest im Fall des Isopropylanilins und des 2,4-Dimethylanilins könnte dieser „negative“ Befund durch einen alternativen Metabolismuspfad begründet sein. Möglicherweise werden diese Substanzen bevorzugt an der Seitenkette oxidiert. Eine solche Diskriminierung der reduktiven Stoffwechsellkaskade zu Gunsten einer oxidativen Funktionalisierung an der aliphatischen Seitenkette wurden bereits für das 2,4-Dinitroanilin, das bevorzugt zur 2,4-Dinitrobenzoesäure metabolisiert wird, belegt (Angerer und Weismantel 1998).

## Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 18:** Ergebnisse des biologischen Monitorings: Vergleich städtische und ländliche Bevölkerung

[µg/L]	Städtische Bevölkerung (N = 98)				Ländliche Bevölkerung (N = 99)				Gesamt (N = 197)			
	Median	95 %	Bereich	Pos. Bef.	Median	95 %	Bereich	Pos. Bef.	Median	95 %	Bereich	Pos. Bef.
<b>Anilin</b>	<b>3,6</b>	8,3	0,8 - 12,3	100 %	<b>3,8</b>	7,0	0,4 - 13,0	100 %	<b>3,7</b>	7,7	0,4 - 13,0	100 %
<b>o-Toluidin</b>	<b>0,108</b>	0,356	< NWG - 0,851	95,9 %	<b>0,093</b>	0,385	< NWG - 1,660	88,8 %	<b>0,099</b>	0,382	< NWG - 1,660	92,4 %
<b>m-Toluidin</b>	<b>0,070</b>	0,287	< NWG - 0,705	71,4 %	<b>0,069</b>	0,324	< NWG - 0,438	68,7 %	<b>0,069</b>	0,301	< NWG - 0,705	70,1
<b>p-Toluidin</b>	<b>0,098</b>	0,667	< NWG - 3,376	67,3 %	<b>0,071</b>	0,345	< NWG - 1,049	64,6 %	<b>0,082</b>	0,443	< NWG - 3,376	66,5
<b>o-Anisidin</b>	<b>0,273</b>	0,722	< NWG - 1,272	99,0 %	<b>0,266</b>	0,567	< NWG - 1,394	96,0 %	<b>0,268</b>	0,715	< NWG - 1,394	97,5
<b>3-Chloranilin</b>	< NWG	0,323	< NWG - 1,337	20,4 %	< NWG	1,135	< NWG - 5,203	22,2 %	< NWG	0,556	< NWG - 5,203	21,3
<b>4-Chloranilin</b>	<b>0,184</b>	1,219	< NWG - 2,562	81,6 %	<b>0,186</b>	1,015	< NWG - 39,1	89,9 %	<b>0,185</b>	1,101	< NWG - 39,1	85,8
<b>3,4-Dichloranilin</b>	< NWG	0,221	< NWG - 2,898	12,2 %	< NWG	0,132	< NWG - 0,979	19,2 %	< NWG	0,198	< NWG - 2,898	16,2
<b>3,5-Dichloranilin</b>	<b>0,422</b>	6,739	< NWG - 16,3	76,5 %	<b>0,410</b>	2,313	< NWG - 3,733	78,8 %	<b>0,410</b>	3,615	< NWG - 16,3	77,7

NWG = 0,05

## **Ergebnisse und Diskussion**

---

Die möglichen Pflanzenschutzmittel-Metabolite 2,6-Dimethylanilin sowie 2,4-Difluoranilin sind mit der bestehenden Urinanalytik nicht zu erfassen. Hier verhindern wahrscheinlich sterische bzw. elektronische Gründe eine zuverlässige Derivatisierung und damit die Quantifizierung dieser beiden Analyten.

Während die Allgemeinbevölkerung Anilin nahezu ausschließlich im µg/L-Bereich ausscheidet, liegen die Konzentrationen für die restlichen Parameter im Median im zwei- bis dreistelligen ng/L-Bereich. Es sind jedoch auch Spitzenkonzentrationen bis in den zweistelligen µg/L-Bereich zu beobachten, allerdings vornehmlich bei den chlorierten Anilinen.

Lediglich für Anilin besteht derzeit ein Grenzwert in biologischem Material (BAT bzw. EKA). Der Biologische Arbeitsstofftoleranzwert (BAT) für Anilin liegt bei 1.000 µg/L. Die 95. Perzentile für die Anilinausscheidung für beide Teilkollektive lagen mit 3,6 µg/L (Stadt) bzw. bei 3,8 µg/L (Land) weit unterhalb des entsprechenden BAT-Werts. Dieser Grenzwert 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 liegen im Bereich von bereits in der Literatur veröffentlichten Werten von Riffelmann et al. (Anilin, o-, m-, p-Toluidin) und Teass et al. 1993 (Anilin, o-Toluidin). Der Autorengruppe um Riffelmann stand jedoch 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.

3,5-Dichloranilin war mit einem Median von 0,41 µg/L in 77,7 % der Urine der Allgemeinbevölkerung zu finden. Die Höhe dieser Basisausscheidung wurde kürzlich durch Arbeiten von Wittke et al. bestätigt (Wittke et al. 2001). Diese Arbeitsgruppe ermittelte bei 5 Kontrollpersonen ohne berufliche Exposition gegenüber aromatischen Aminen oder Nitroverbindungen eine mittlere 3,5-Dichloranilin-Ausscheidungsrate

## **Ergebnisse und Diskussion**

---

von 0,76 µg/L. Hauptursache für eine solche Basisausscheidung bei der Allgemeinbevölkerung dürften Rückstände auf oder in Nahrungsmitteln sein (siehe unten).

Auch wenn 3,5-DCIA bisher nicht als „direkter“ Metabolit des Vinclozolin im Urin nachgewiesen werden konnte (Will 1995), sondern wohl erst unter den Bedingungen der Probenvorbereitung (saure Hydrolyse) aus „hydrolytischen“ Vorstufen entsteht, so stehen doch eben diese „hydrolytischen“ Vorstufen im Verdacht, zur Krebsentstehung beitragen zu können.

Obwohl 4-Aminobiphenyl (4ADP) Bestandteil des Tabakrauches ist und die Messung von 4ADP-Hämoglobinaddukten zur Objektivierung des Raucherstatus herangezogen werden kann, war es ebenfalls in keiner der Urinproben zu quantifizieren. Der Grund hierfür scheint im Metabolismus dieser Substanz zu liegen, 4ADP wird im Allgemeinen nicht unverändert mit dem Urin ausgeschieden, darüber hinaus scheint der Ausscheidungspfad über die Faeces bevorzugt zu sein. Riffelmann et al. 1995 fanden 4ADP lediglich in 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; siehe auch Tabelle 6).

2-Naphtylamin konnte in keiner der vermessenen Urinproben nachgewiesen werden. 2-Naphtylamin im Harn wurde jedoch von Riffelmann et al. (1995) sowie von Seidel, Grimmer und Mitarbeiter (2000, 2001) bei Personen aus der Allgemeinbevölkerung gefunden. Riffelmann und Mitarbeiter geben hier für Raucher (N=8) einen Median von 3,1 µg/L und für Nichtraucher (N=8) einen Median von < 1 µg/L bei einer Nachweisgrenze von 1 µg/L an. Grimmer, Seidel und Mitarbeiter fanden in einer jüngeren Studie bei nicht beruflich exponierten Nichtrauchern (N=14) als Median 33 ng/24h und bei Rauchern (N=12) 36 ng/24h. Die Werte von Riffelmann et al. erscheinen außerordentlich hoch. Riffelmann et al. benutzten zur Detektion nach kapillargaschromatographischer Trennung einen unspezifischen Elektroneneinfangdetektor, so dass nicht auszuschließen ist, dass neben dem 2NA noch weitere Substanzen erfasst werden. Darüber hinaus liegen die meisten Ergebnisse im Bereich der Nachweisgrenze. Sie sind deshalb naturgemäß mit größerem Fehler behaftet. Seidel, Grimmer und Mitarbeiter setzen im Gegensatz dazu einen sehr spezifischen Detektor (MS) ein. Anzumerken aber ist bei dieser Methode, dass sie nicht nur extrem aufwendig ist, sondern auch die Gefahr der Spureneinschleppung in sich birgt. Diese Autoren setzen 200 mL Urin ein, den sie mit 100 mL Benzol (!) extrahieren. Darüber hinaus wird dem Urin 10 µg p-Toluidin zugesetzt, „to prevent decomposition of these com-

## **Ergebnisse und Diskussion**

---

pounds“. Die Autoren geben an, dass es sich bei diesem Zusatz nur um äußerst geringe Mengen handelt. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass die Probe im Laufe der Aufarbeitung um das 4000-Fache aufkonzentriert wird. Dies bedeutet, dass die p-Toluidin-Konzentration in der Lösung, die mittels GC/MS vermessen wird, ca. 200.000.000 ng/L betragen müsste (Die im Harn nachgewiesenen 2NA-Amin-Konzentrationen entsprechen dabei nach Aufkonzentrierung einer Konzentration im Median von etwa 100.000 ng/L). Man kann deshalb nicht davon ausgehen, dass es sich beim Zusatz von 10 µg p-Toluidin um einen Zusatz geringer Menge handelt. Ggf. ist auch eine Kontamination über das verwendete Benzol denkbar (insgesamt 130 mL Benzol werden zu 50 µL aufkonzentriert = Faktor 2600). Über evtl. Reagenzienleerwerte sind in diesen Arbeiten leider keine Angaben zu finden.

In der in Abschnitt 4 beschriebenen Methode wurde auf den Zusatz von p-Toluidin verzichtet, da während der Validierung keine Verluste an 2-Naphtylamin (oder anderen Aminen) festgestellt wurden. Der Aufkonzentrierungsfaktor des im Rahmen dieser Arbeit angewandten Verfahrens liegt bei etwa 100.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft berichtet, dass das Rauchen von 20 Zigaretten pro Tag zu einer Ausscheidung von insgesamt etwa 30 ng 2NA /g Kreatinin führt (Lewalter 1994). Hansen und Mitarbeiter fanden bei exponierten Arbeitern (N=95) bis maximal 1,25 µg/L Harn. Bei nicht-exponierten Kontrollen (N=114) lag der Maximalwert bei 125 ng/L (Hansen et al. 1994). Mediane hierzu liegen nicht vor. Hansen und Mitarbeiter wendeten eine HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion an (NWG = 40 ng/L). Auch bei dieser Methode muss angemerkt werden, dass die eingesetzte Fluoreszenzdetektion die Analyten sicherlich weniger spezifisch anzeigt als das von uns verwendete massenspektrometrische Detektionsverfahren. In einer weiteren Arbeit berichtet der gleiche Autor von einem 2NA-Median im Harn von unter 4 ng/L bei 49 untersuchten, nicht-exponierten Kontrollpersonen (Hansen et al. 1992). Bei Arbeitern (N=29) einer Eisengießerei konnte Hansen in dieser Arbeit ein 95. Perzentil von 66 ng/L ermitteln. Der Median lag hier unterhalb der Nachweisgrenze. Genaue Angaben zum eingesetzten HPLC-Fluoreszenzdetektions-Verfahren sind der Arbeit leider nicht zu entnehmen. Es kann nur vermutet werden, dass es sich bereits um das oben erwähnte Verfahren handelt (Hansen et al. 1994).

Zusammenfassend ergibt sich, dass die bisher in der Literatur veröffentlichten Arbeiten zur renalen Ausscheidung von 2-Naphtylamin auf Konzentrationen im unteren ng- bis pg-Bereich hindeuten, wobei nach unserem Kenntnisstand keine Arbeiten vorlie-

## Ergebnisse und Diskussion

gen, die eine äußere Exposition objektivieren können. Unsere Ergebnisse decken sich insofern mit den bisher in der Literatur veröffentlichten Studien (ohne objektivierbare 2NA-Exposition), als mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode zur Harnanalytik Konzentrationen unterhalb von 75 ng/L analytisch nicht mehr zuverlässig zu erfassen sind.

### 5.1.1 Einflussfaktor Tabakrauchen

Die Aufteilung der Probanden erfolgte anhand ihrer Cotinin-Konzentrationen mit den Cutt-Offs 10 µg/L für die Unterscheidung Nicht-Raucher (NR)/Passiv-Raucher (PR) und 70 ng/L für die Unterscheidung Passiv-Raucher/Aktiv-Raucher (R). In der Regel wird zwar der Cut-Off zur Ermittlung von aktiven Rauchern bei 100 µg Cotinin pro Liter Urin gezogen. In den Fragebögen hatten jedoch zwei nach diesem Kriterium den "Passiv-Rauchern" zugeordnete Probanden ihren Status mit "Aktiv-Raucher" angegeben. Da zudem diese beiden Probanden mit ihren Cotinin-Werten mindestens doppelt so hoch lagen wie der höchste Wert der restlichen Nichtraucher, wurde der entsprechende Cut-Off in dieser Studie bei 70 ng/L angesetzt. Fünf Probanden, die im Fragebogen angegeben hatten, aktive Raucher (darunter ein Pfeifen-Raucher) zu sein, wurden aufgrund ihrer Cotinin-Werte (< 20 µg/L) den Nichtrauchern zugeordnet. Offensichtlich handelte es sich hierbei um nicht täglich rauchende Personen (Gelegenheitsraucher).

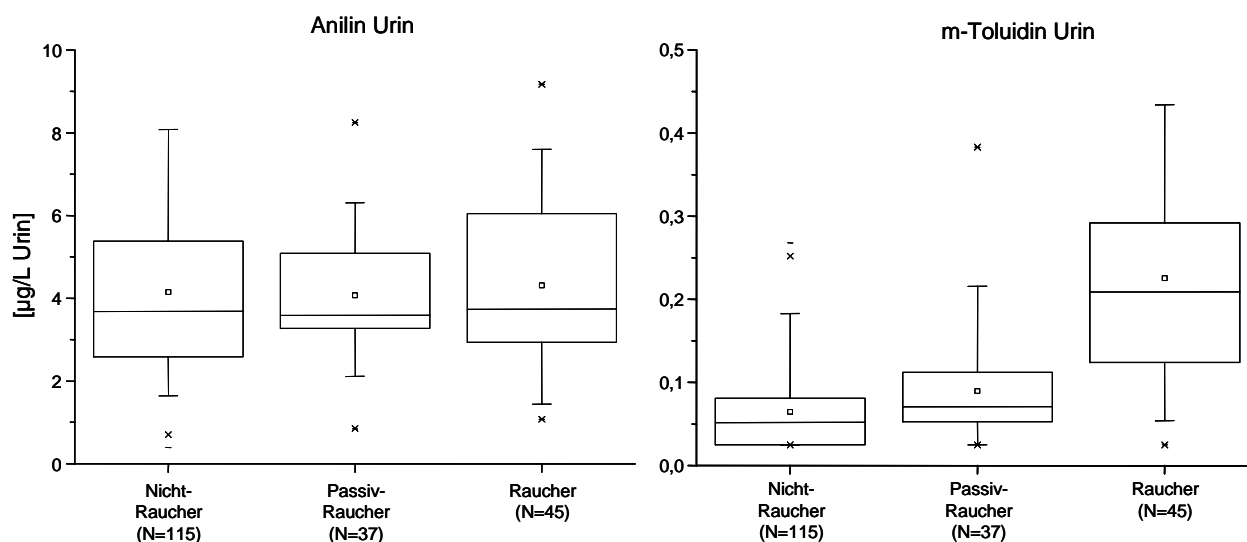


Abbildung 9: Boxplots: Vergleich Raucher, Passivraucher und Nicht-Raucher

## Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 19:** Ergebnisse Biologisches Monitoring in µg/L in Abhängigkeit vom Raucherstatus

	<b>Status</b>	<b>Median</b>	<b>95. %</b>	<b>Bereich</b>	<b>pos. Befunde</b>
<b>Anilin</b>	<b>NR (N=115)</b>	3,7	8,2	0,4 - 13,0	100%
	<b>PR (N=37)</b>	3,6	6,5	0,8 - 8,2	100%
	<b>R (N=45)</b>	3,7	7,5	1,1 - 9,2	100%
<b>o-Toluidin</b>	<b>NR</b>	0,085	0,263	< NWG - 1,660	88,7%
	<b>PR</b>	0,087	0,158	< NWG - 0,209	94,6%
	<b>R</b>	0,206	0,541	< NWG - 0,838	97,8%
<b>m-Toluidin</b>	<b>NR</b>	0,052	0,184	< NWG - 0,268	56,5%
	<b>PR</b>	0,071	0,217	< NWG - 0,383	81,1%
	<b>R</b>	0,209	0,434	< NWG - 0,705	95,6%
<b>p-Toluidin</b>	<b>NR</b>	0,063	0,407	< NWG - 3,376	56,5%
	<b>PR</b>	0,071	0,684	< NWG - 1,614	68,4%
	<b>R</b>	0,149	0,587	< NWG - 1,125	88,6%
<b>3,5-DCIA</b>	<b>PR+NR (N=152)</b>	0,451	3,865	< NWG -16,3	86,8%
	<b>R (N=45)</b>	< NWG	2,763	< NWG -3,7	46,7%
<b>Cotinin</b>	<b>NR</b>	< NWG	8,7	< NWG - 9,9	11,2%
	<b>PR</b>	17,7	33,5	10,5 - 35,1	100%
	<b>R</b>	851	2354	73,0 - 3313	100%

NWG = 0,05 µg/L; bei Cotinin 5 µg/L

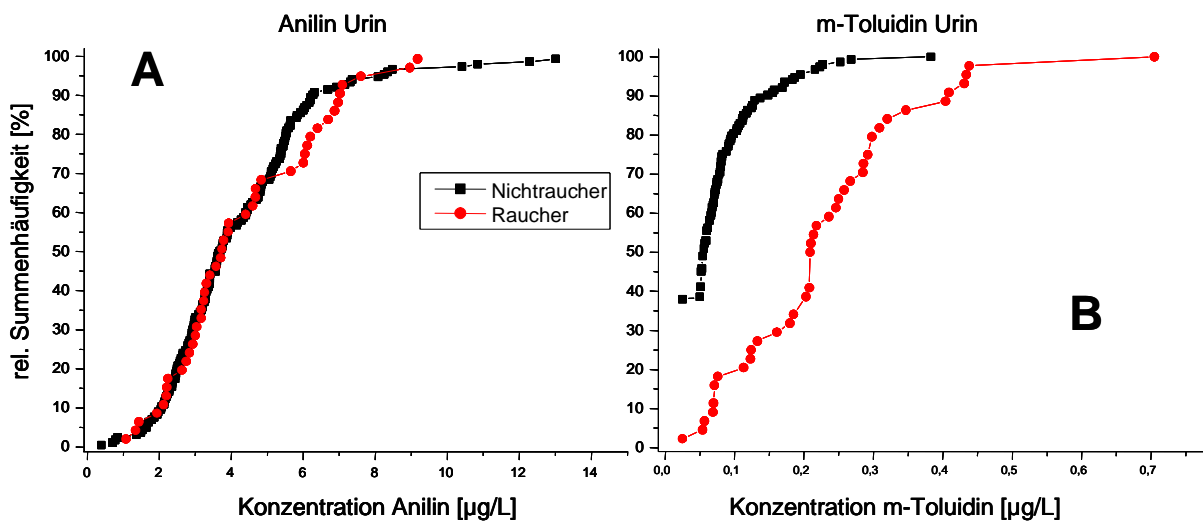
Die statistische Verknüpfung der Amin-Messwerte mit entsprechenden Cotinin-Messwerten zeigte hoch signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) in den Ausscheidungsraten zwischen aktiven Rauchern und der Gruppe der nicht aktiv rauchenden Personen (Nichtraucher plus Passivraucher). Dies gilt für die im Tabakrauch enthaltenen drei Toluidine, nicht jedoch für das Anilin. Beim m-Toluidin war gar der Unterschied zwischen Nichtrauchern und Passivrauchern signifikant ( $p < 0,02$ ). Die entsprechenden Differenzen sind als Zahlenwerte in Tabelle 19 und beispielhaft für Anilin und m-Toluidin graphisch in Abbildung 9 und Abbildung 10 dargestellt.

Der nicht vorhandene Unterschied zwischen Rauchern und Nicht-Rauchern beim Anilin macht deutlich, dass der aktive Tabakkonsum keinen Einfluss auf die Höhe der entsprechenden Ausscheidung hat. Das bedeutet, dass anderen Quellen als dem Tabakrauchen weit größere Bedeutung zukommen muss. Die Hauptquellen für die festgestellte innere Anilinbelastung sind bisher jedoch noch unbekannt. Als mögliche bedeutende Expositionsquellen für Anilin und seine Vorläufer werden Pestizidrück-



## Ergebnisse und Diskussion

stände in Nahrungsmitteln (Arnold 1993) und Anilin-Rückstände in Lederprodukten (Lewalter und Neumann 1998) angenommen. Ein ähnliches Bild zeigt sich beim o-Anisidin. Trotz seines Vorkommens im Tabakrauch, war keine Assoziation zum Raucherstatus feststellbar. Wie beim Anilin müssten also auch hier weitaus bedeutendere Expositionsquelle Ursache der festgestellten inneren Belastung sein.



**Abbildung 10:** relative Summenhäufigkeiten: Vergleich Raucher / Passivraucher und Nicht-Raucher: Anilin (A) und m-Toluidin (B) im Urin

Während Nichtraucher im Median Toluidin-Ausscheidungen von jeweils unter 100 ng pro Liter Urin zeigten, so lagen die entsprechenden Mediane bei den Rauchern doppelt bis mehr als dreifach so hoch. Dabei zeigte sich auch eine gute Korrelation zwischen den Toluidinkonzentrationen im Urin und den Urinkonzentrationen des Cotinins. Exemplarisch ist dies gezeigt für o-Toluidin in Abbildung 11. Dies bedeutet, dass zumindest bei Rauchern der Tabakkonsum zu den Hauptquellen der inneren Belastung mit Toluidinen zählt. Allerdings überlappen die Toluidinkonzentrationen von Rauchern und Nichtrauchern teilweise über den gesamten Bereich, so dass man lediglich von einer inkrementell höheren Toluidinbelastung von Rauchern gegenüber Nichtrauchenden sprechen kann. Weitere Quellen müssen also auch hier zur Aminbelastung der Allgemeinbevölkerung beitragen.

Unerwarteterweise unterschied sich die Urinkonzentrationen des 3,5-Dichloranilins signifikant zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Jedoch waren es hier die Raucher, die vergleichsweise weniger 3,5-DCIA im Urin aufwiesen. Allerdings ist die 3,5-Dichloranilin-Ausscheidung auch signifikant assoziiert mit dem täglichen Konsum von Kräutertee und weinhaltigen Getränken (siehe unten). Die Konsumenten dieser Getränke sind offensichtlich im Teilkollektiv der Nichtraucher überrepräsentiert. Berück-

## Ergebnisse und Diskussion

sichtigt man dies in der statistischen Auswertung indem man die Wein- und Kräutertetrinker aus beiden Teilkollektiven eliminiert, so besteht zwischen Rauchern und Nichtrauchern kein Unterschied in den 3,5-Dichloranilinkonzentrationen im Urin.

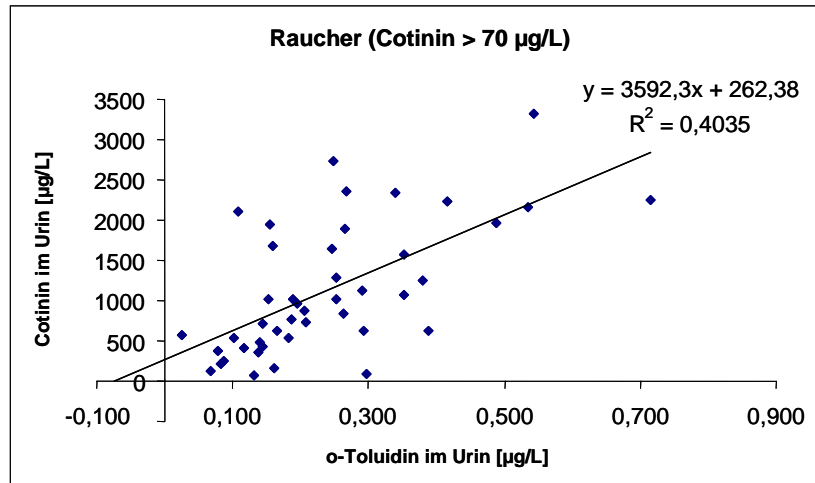


Abbildung 11: Korrelation zwischen o-Toluidin im Urin und Cotinin im Urin

Um den nachgewiesenen Einfluss des Tabakkonsums auf die Toluidin-Ausscheidung im Urin zu berücksichtigen, wurden bei der statistischen Suche nach möglichen weiteren Einflussfaktoren bei diesen Parametern nur noch die Nichtraucher (Cotinin im Urin  $< 70 \mu\text{g/L}$ ) betrachtet. Bei den nicht mit dem aktiven Tabakrauchen assoziierten Parametern gingen die Werte aller Probanden in die weitere Auswertung ein.

### 5.1.2 Einflussfaktor Ernährung

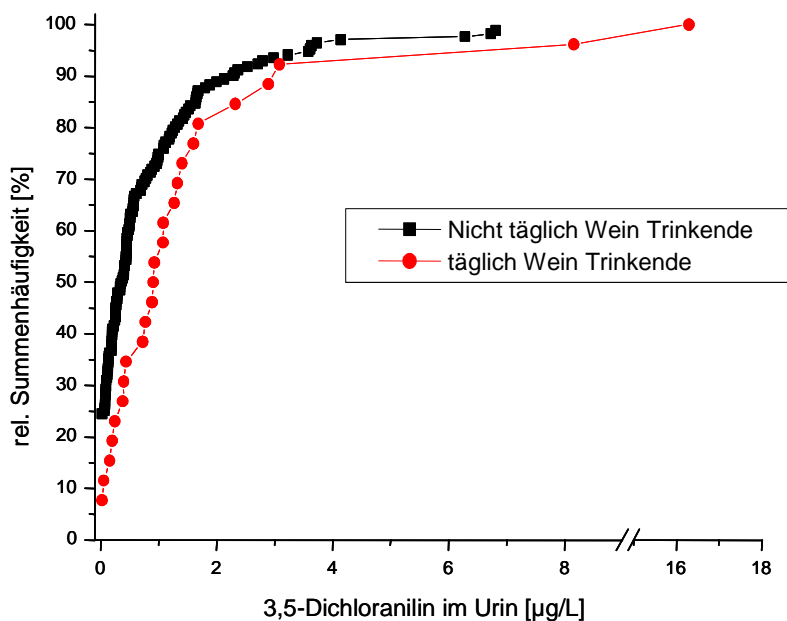
Die Aufnahme aromatischer Amine, insbesondere von Anilin und den drei isomeren Toluidinen wird oftmals mit dem Konsum von Cafe und schwarzem Tee in Verbindung gebracht. Diese Amine wurden nämlich des Öfteren in solchen Genussmitteln nachgewiesen. Beim Anilin war ein solch möglicher Zusammenhang jedoch nicht festzustellen. Bei den Toluidinen war es aufgrund der relativ geringen mittleren Ausscheidungen der nichtrauchenden Cafe- und Teetrinker in der Nähe der analytischen Nachweisgrenze nicht möglich, hier zu gesicherten Erkenntnissen zu gelangen. Trotz dieser Einschränkung schieden die 23 Probanden (Median  $0,025 \mu\text{g/L}$ ), die keinen Cafe trinken, signifikant ( $p < 0,007$ ) weniger m-Toluidin aus als die 123 Cafetrinker (Median  $0,06 \mu\text{g/L}$ ). Einschränkung ist hier aber zusätzlich die relativ geringe Anzahl der Nicht-Cafe-Trinker zu beachten.

## Ergebnisse und Diskussion

Eindeutige, statistisch signifikante Assoziationen waren jedoch beim 3,5-Dichloranilin im Zusammenhang mit täglichem Weinkonsum zu erkennen ( $p < 0,001$ ). Insgesamt 26 Probanden gaben an, täglich mindestens ein Glas Wein zu konsumieren. Die Weintrinker wiesen mit einem Median von 918 ng/L erheblich höhere Urinkonzentrationen auf als diejenigen Probanden, die nicht täglich Wein trinken (Median 364 ng/L). Dieser Unterschied ist auch in Abbildung 12 deutlich zu erkennen. Jedoch wiesen auch die Personen, die nicht täglich Wein oder Kräutertee zu sich nehmen, teilweise erhebliche 3,5-DCIA-Konzentrationen bis in den zweistelligen  $\mu\text{g/L}$ -Bereich auf. Zum einen könnte dies daran liegen, dass die entsprechenden Probanden zwar nicht täglich diese Getränke konsumierten, eventuell aber relativ kurz vor der Probenahme, beispielsweise am Abend zuvor. Darüber hinaus besitzen 3,5-Dichloranilin-haltige Fungizide ein relativ breites Anwendungsspektrum. Sie werden z.B. im Spargelanbau wie auch bei Erdbeeren eingesetzt.

Die restlichen Urinparameter zeigten eine solche Assoziation zum Weinkonsum nicht.

Ein Einfluss auf die Höhe der 3,5-Dichloranilin-Ausscheidung im Urin war ebenfalls mit dem täglichen Konsum von Kräutertee verknüpft, wenn auch nicht ganz so deutlich wie bei den Weintrinkern ( $p < 0,045$ ).



**Abbildung 12:** relative Summenhäufigkeiten: täglicher Weinkonsum

Ein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von bestimmten Aromatischen Aminen im Urin und der Art der Ernährung wäre bei Vegetariern und solchen Probanden, die sich mit Produkten aus biologischem Anbau ernähren, anzunehmen. Einerseits könnte man bei Personen, die sich ausschließlich mit Produkten aus kontrolliert biologischem Anbau ernähren, erwarten, dass ihre Urinkonzentrationen vergleichsweise erniedrigt sind bei denjenigen aromatischen Aminen, die mögliche Metaboliten von Pflanzenschutzmitteln sind. Andererseits sollte das Gegenteil der Fall sein bei Personen, die sich ausschließlich vegetarisch, aber nicht mit Produkten aus biologischem Anbau, ernähren. Leider war die Anzahl dieser Personen, bzw. der sich ausschließlich vegetarisch ernährenden Probanden in den zur Verfügung stehenden Kollektiven zu gering, um gesicherte Aussagen treffen zu können. Der Rekrutierung eines entsprechenden weiteren Kollektivs wurde im Zuge der Antragsgewährung seitens des Projektgebers leider nicht zugestimmt.

### **5.1.3 Einflussfaktor Bekleidung**

Neben den bereits diskutierten Parametern wurden in einer Pilotstudie bei 50 zufällig aus dem Gesamtkollektiv (N=200) ausgewählten Probanden der Urin auch auf die möglichen Azofarbstoffmetabolite 3,3'-Dimethylbenzidin, 3,3'-Dichlorbenzidin, 3,3'-Dimethoxybenzidin sowie 4,4'-Methylenbis-(2-chloranilin) untersucht. Obwohl diese Substanzen mit dem in Abschnitt 4.2 beschriebenen Verfahren bei Präzisionen zwischen 18 und 28 % nicht mehr hinreichend zuverlässig quantifizierbar waren, konnte festgestellt werden, dass bei Nachweisgrenzen im Bereich von 50 ng/L die Allgemeinbevölkerung diese zweikernigen, bifunktionellen Aromatischen Amine nicht im Urin ausscheidet. Auf die Implementierung der einfach desaminierten Analoga des Benzidin und des 4,4'-Methylenbis-(2-chloranilin) in das bestehende Analysenverfahren wurde daher verzichtet.

Darüber hinaus bleibt nur zu vermuten, dass auch ein gewisser Anteil weiterer Aromatischer Amine, wie beispielsweise das Anilin oder das o-Anisidin aus Bekleidungsgegenständen oder auch Lederprodukten von Personen der Allgemeinbevölkerung aufgenommen werden könnten.

### **5.1.4 Weitere Einflussfaktoren**

Weder bei Anwohnern verkehrsreicher Straßen noch über die im Fragebogen abgefragte Einschätzung zur persönlichen Belästigung durch Abgase aus dem Straßenverkehr waren Assoziationen zu einem der im Urin gemessenen Parameter zu er-

kennen. Dies steht in gutem Einklang mit den nicht vorhandenen Unterschieden zwischen den Bewohnern ländlicher und städtischer Gebiete. Hier wäre nämlich davon auszugehen, dass die in den Städten des Ruhrgebiets lebenden Probanden vergleichsweise höheren Verkehrsabgasbelastungen ausgesetzt sein sollten als die Bewohner aus dem ländlich geprägten Münsterland.

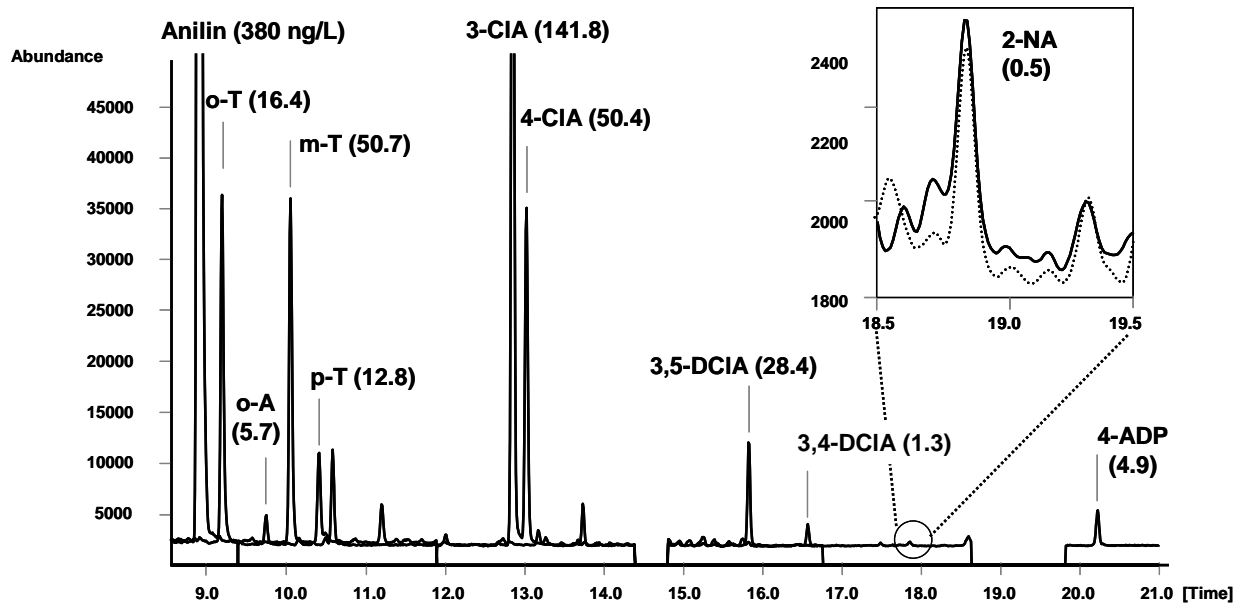
Ebenfalls keinen Einfluss auf die Ausscheidung aromatischer Aminene im Urin hatten das Alter der Probanden noch deren Körpergewicht, das über den BMI (Body Mass Index) in die Auswertung einging.

Einen hoch signifikanten ( $< 0,001$ ) Unterschied in den Ausscheidungsraten des o-Toluidins (Mann-Whitney-U-Test) war jedoch zwischen männlichen und weiblichen Probanden zu finden. Dieser Unterschied ist offensichtlich nicht mit dem Raucherstatus assoziiert und findet sich auch beim statistischen Vergleich über den Mann-Whitney-U-Test zwischen den nicht aktiv rauchenden männlichen und weiblichen Probanden ( $p < 0,002$ ). Wie die entsprechenden Mediane verdeutlichen (männliche Nichtraucher:  $0,102 \mu\text{g/L}$ ; weibliche Nichtraucher  $0,080 \mu\text{g/L}$ ), scheidet die männliche Allgemeinbevölkerung signifikant größere Mengen an o-Toluidin aus. Solche geschlechtsspezifischen Differenzen wurden bereits bei den renalen Ausscheidungen von Mononitrotoluol-Metaboliten in Rattenexperimenten beobachtet (Rickert und Long 1981, Chism und Rickert 1985). Die Gründe hierfür sind bisher nicht bekannt.

### **5.2 Biochemical Effect Monitoring**

Betrachtet man die Ergebnisse des Biochemischen Effekt Monitorings (Tabelle 31) so wird offensichtlich, dass diejenigen aromatischen Amine, die von der beruflich nicht belasteten Allgemeinbevölkerung renal ausgeschieden werden auch in Form ihrer Hämoglobinaddukte im Blut nachweisbar sind. Darüber hinaus konnten auch 4-Aminobiphenyl- und 2-Naphtylamin-Hb-Addukte im Blut von Rauchern wie auch Nicht-Rauchern quantifiziert werden. Je nach Analyt variieren die gemessenen Konzentrationen zwischen  $< 1 \text{ ng/L}$  und  $10000 \text{ ng/L}$ . Im Fall des Anilins wurden im Mittel die höchsten Adduktkonzentrationen beobachtet. Beispielhaft ist in Abbildung 13 ein Chromatogramm einer Person aus der Allgemeinbevölkerung gezeigt.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 13:** Chromatogramm einer nativen Blutprobe einer Person aus der Allgemeinbevölkerung: Die Zahlen in Klammern geben die in dieser Probe ermittelten Konzentrationen in ng/L Blut an

Die von uns ermittelten Adduktkonzentrationen des Anilins und der isomeren Toluidine bestätigen entsprechende Befunde aus älteren, meist an relativ kleinen Kollektiven durchgeführte Arbeiten (Tabelle 21). Im Mittel wurden von anderen Arbeitsgruppen Adduktkonzentrationen bei beruflich nicht exponierten Personen für Anilin zwischen 100 und 700 ng/L, für o-Toluidin zwischen 5 und 50 ng/L, für m-Toluidin zwischen 40 und 180 ng/L und für p-Toluidin zwischen 10 und 65 ng/L angegeben. Vergleicht man unsere Befunde für die Toluidine und das o-Anisidin jedoch mit kürzlich von der Arbeitsgruppe Richter veröffentlichten Werten für nichtrauchende Kinder (Richter et al. 2001), so ist festzustellen, dass die von uns ermittelten Werte um den Faktor 5 bis 10 niedriger liegen. Die Ursachen für diese relativ große Differenz liegen möglicherweise im Altersunterschied der untersuchten Kollektive. Vergleicht man nämlich die Adduktbefunde bei Kindern (Richter et al. 2001) mit den entsprechenden Befunden aus gleichem Haus bei nicht beruflich exponierten, nicht rauchenden Erwachsenen (Falter et al. 1994), so zeigen sich auch hier deutliche Unterschiede in den Adduktkonzentrationen zwischen Kindern und Erwachsenen.

## Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 20:** Ergebnisse Biochemisches Effekt Monitoring Allgemeinbevölkerung (N=200)

[ng/L]	Median	95 %	Bereich	positive Befunde
Anilin	488	3780	53-1438	100%
o-Toluidin	22,6	82	<NWG - 5929	99%
m-Toluidin	32,4	120	<NWG - 802	99,5%
p-Toluidin	8,6	34	<NWG - 503	95,5%
o-Anisidin*	2,1	16	<NWG - 4500	89,4%
3-Chloranilin	7,4	47	1,1 - 411	100 %
4-Chloranilin	31,1	155	<NWG - 2414	99,5%
3,4-Dichloranilin	2,6	10	<NWG - 184	88,5%
3,5-Dichloranilin	13,0	53	<NWG - 155	99,5%
2-Naphtylamin**	1,2	2,8	<NWG - 8,9	60%
4-Aminodiphenyl	2,4	16	<NWG - 70	95%

\* N= 156; \*\*N=99: siehe Abschnitt 4

Bei nahezu allen untersuchten Probanden konnten Hämoglobinaddukte von Monochloranilinen und Dichloranilinen festgestellt werden. 4-Bromanilin-Addukte waren in keiner der untersuchten Proben zu finden. Daten zum Biochemischen Effekt Monitoring von halogenierten aromatischen Aminen insbesondere bei beruflich nicht Exponierten sind nach unserem Kenntnisstand in der Literatur nicht veröffentlicht. Ein Vergleich kann daher hier nur mit Personen erfolgen, die beruflichen Umgang mit 4-Chloranilin hatten (Riffelmann et al. 1995). Die Arbeitsgruppe Riffelmann ermittelte in einer Studie 4-Chloranilinkonzentrationen im Mittel von 1100 ng/L. Diese Werte liegen erheblich (Faktor ~ 35) über den von uns für die Allgemeinbevölkerung ermittelten Konzentrationen.

Bemerkenswert ist, dass auch Hämoglobinaddukte des 3,5-Dichloranilins im Blut von Personen der Allgemeinbevölkerung zu finden sind. Einerseits besagen Arbeiten zum Vinclozolin (Will 1995 und darin zitierte Literatur), dass nach Inkorporation des intakten Wirkstoffs 3,5-Dichloranilin oder theoretisch mögliche Konjugationsprodukte nicht als Metaboliten mit dem Urin eliminiert werden. Es werden vielmehr Stoffwechselprodukte mit dem Urin ausgeschieden, die zwar das intakte 3,5-Dichloranilin beinhalten, dies aber nicht in einer das 3,5-DCIA-freisetzenden, bioverfügbaren Form. 3,5-Dichloranilin *per se* wird bei der Urinanalytik demnach erst durch die Bedingungen der Probenvorbereitung (saure oder alkalische Hydrolyse) freigesetzt. Andererseits wurden 3,5-Dichloranilin-Hämoglobin-Addukte bei Ratten, denen das entspre-

## ***Ergebnisse und Diskussion***

---

chende intakte Mutterpestizid (Vinclozolin, Iprodion) verfüttert wurde, nicht gefunden (Sabbioni und Neumann 1990). Demzufolge weisen unsere positiven Adduktbefunde beim Menschen darauf hin, dass Vinclozolin, Iprodion bzw. andere Carboximid-Pestizide vom Menschen mit der Nahrung nicht nur in Form der unveränderten Pestizide aufgenommen werden, sondern (auch) bereits in metabolisierter Form (z.B. als 3,5-Dichloranilin). Dies bedeutet dann aber, dass schon auf oder in den mit Carboximid-Pestiziden behandelten Pflanzen eine Metabolisierung bzw. ein Abbau zum 3,5-Dichloranilin (bzw. zu Metaboliten, die im Humanstoffwechsel 3,5DCIA freisetzen können) stattgefunden haben muss.

Die für die Parameter 4-Aminodiphenyl und 2-Naphtylamin ermittelten Adduktbefunde sind ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den wenigen in der Literatur bereits veröffentlichten Werten (Tabelle 22). Da beide Parameter in den Zusammenhang mit einer Tabakrauchexposition gebracht werden, erfolgt die diesbezügliche Diskussion im nächsten Abschnitt.



## Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 21:** Hb-Addukte aromatischer Amine in ng/L Blut (Mittelwerte bzw. Mediane)

Referenz	Anilin		o-Toluidin		m-Toluidin		p-Toluidin		o-A	4Cl-A	4ADP		2NA	
	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R			NR	R	NR	R
Riffelmann et al. 1995	200-7000*									500-1700*	3-20	10-25		
Richter et al. 2001 (Kinder)														
Kleinstadt:			75		140		130		32		~ 3			
Großstadt:			100		230		200		45		~5			
Stillwell 1987	608	704	5	16	109	80	11	21						
Falter 1994	116	150	23	50	42	108	26	65						
Bryant 1988			30	48	182	175	34	60			8	28 <sup>a</sup> ; 46 <sup>b</sup>	1,9	2,8 <sup>a</sup> ; 3,4 <sup>b</sup>
Ward 1996	500	500	560	560							8	19		
Branner et al. 1998	190	198	38	46	113	100	32	50						
Zwirner-Baier et al. 2003	4770													
Schäffler et al. 1993											<NWG-0,5	<NWG - 75		
Mooney et al. 1995											8			
Weston et al. 1991											14			
Pinorini-Godly & Myers 1996											2	73		
Del Santo 1991											10			
Ergebnisse dieser Arbeit														
Median	493	453	22	25	30	37	7,7	12,8	5,1	35	1,9	8,0	1,1	1,2
Bereich	53-6700	89-10.500	<1-5930	10-110	<1-802	10-139	<1-503	2-70	<1-4500	<1-2410	<1-70	<1-45	<1-8,8	<1-6,2

\* Bereich bei beruflicher Belastung; <sup>a</sup>Raucher blonder Tabaksorten; <sup>b</sup>Raucher schwarzer Tabaksorten

### 5.2.1 Einflussfaktor Tabakrauchen

Die Messergebnisse des Biochemischen Effekt Monitorings, unterteilt nach Rauchern und Nichtrauchern (Cut-Off Cotinin im Urin 70 µg/L), sind in Tabelle 22 dargestellt. Wie bereits bei den Urinmesswerten weisen beim Anilin die Nichtraucher im Median leicht höhere Werte auf als die Raucher, dieser Unterschied ist aber nicht signifikant. Bei den drei isomeren Toluidinen liegen die Adduktwerte der Raucher im Median über den Werten der Nichtraucher. Waren jedoch bei den Urinmesswerten der drei Toluidine noch relativ große und statistisch signifikante Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern zu erkennen, so überschneiden sich die Bereiche der Messwerte beider Teilkollektive bei den Addukten über einen großen Bereich (Abbildung 14), so dass lediglich bei den p-Toluidin-Addukten ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) zwischen Rauchern und Nichtrauchern zu finden ist.

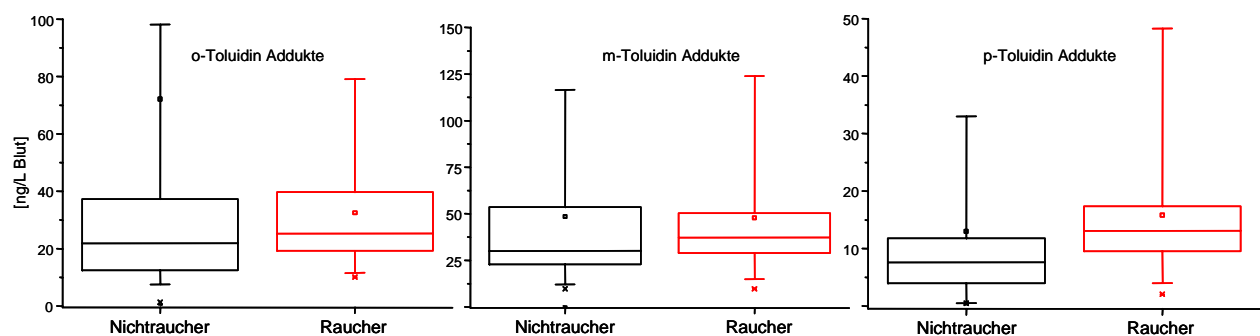
**Tabelle 22:** Ergebnisse Biochemisches Effekt Monitoring Allgemeinbevölkerung unterteilt nach dem Raucherstatus

[ng/L]	Status	Median	95 %	Bereich	positive Befunde
<b>Anilin</b>	<b>NR (N=154)</b>	<b>496</b>	3781	53 - 6682	100%
	<b>R (N=46)</b>	<b>438</b>	3414	89 - 10438	100%
<b>o-Toluidin</b>	<b>NR (N=154)</b>	<b>22,2</b>	101	<NWG - 5930	98,7%
	<b>R (N=46)</b>	<b>25,0</b>	79	10 - 110	100%
<b>m-Toluidin</b>	<b>NR (N=154)</b>	<b>30,1</b>	118	<NWG - 802	99,3%
	<b>R (N=46)</b>	<b>37,2</b>	120	10 - 139	100%
<b>p-Toluidin</b>	<b>NR (N=154)</b>	<b>7,7</b>	33	<NWG - 503	93,5%
	<b>R (N=46)</b>	<b>12,8</b>	43	2 - 70	100%
<b>o-Anisidin</b>	<b>NR (N=122)</b>	<b>2,0</b>	14	<NWG - 4500	87,7%
	<b>R (N=34)</b>	<b>2,4</b>	15	<NWG - 34,6	88,2%
<b>2-Naphtylamin</b>	<b>NR (N=78)</b>	<b>1,2</b>	2,7	<NWG - 8,9	69,2%
	<b>R (N=21)</b>	<b>1,1</b>	3,2	<NWG - 6,2	71,4%
<b>4-Aminodiphenyl</b>	<b>NR (N=154)</b>	<b>2,0</b>	8,9	<NWG - 70,5	90,9%
	<b>R (N=46)</b>	<b>7,9</b>	20,5	<NWG - 44,6	97,8%

Die Gründe für die bezüglich der Signifikanz unterschiedlichen Befunde bei den Urin- und den Hb-Adduktwerten dürften vielschichtig sein.

## Ergebnisse und Diskussion

Zunächst sollte die Art der Probennahme (12h-Tagesurin) vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Aufnahmepfade einen gewissen Einfluss haben. Während die Amine, die inhalativ durch das Rauchen aufgenommen werden, unmittelbar ins Blut gelangen, ist die Resorption nach oraler Aufnahme vergleichsweise verzögert, die Zeit bis die Amine bzw. ihre Konjugate in den Urin eliminiert werden also verlängert. Das bedeutet, dass mit dem 12h-Tagesurin (ca. 8:00 und 20:00 Uhr) zwar ein Großteil der Aminaufnahme über das Rauchen erfasst wird, jedoch nur ein geringerer Anteil einer möglichen zusätzlichen oralen Aminaufnahme aus anderen Quellen. So wirkt sich beispielsweise eine mögliche orale Aufnahme aus den Nahrungsmitteln des Abendessens nicht mehr erhöhend auf die Urinkonzentrationen aus. Die inhalative Aufnahme der Amine aus dem Tabakrauch wird somit beim 12-h Tagesurin eher überschätzt, während die verzögerte Aufnahme über den oralen Aufnahmepfad keinen Einfluss auf die Höhe der Addukten hat.



**Abbildung 14:** Boxplots: Hb-Addukte der drei isomeren Toluidine unterschieden nach Raucherstatus. Darüber hinaus dürfte der Acetyliererstatus zusätzlich eine Rolle spielen (siehe Abschnitt 3.3). Bei gleicher innerer Exposition bilden langsame Acetylierer einen vergleichsweise höheren Adduktspiegel als die schnellen Acetylierer. Das bedeutet, dass sich die Streuung gebildeter Adduktkonzentrationen in Abhängigkeit vom Acetyliererstatus sowohl in der Gruppe der Raucher wie auch in der Gruppe der Nichtraucher in gewissem Maß vergrößert, die Bereiche werden sozusagen unschärfer. Der NAT2-Polymorphismus hat unter der Annahme, dass in beiden Teilkollektiven sich schnelle und langsame Acetylierer gleich verteilen, zwar einen Einfluss auf die Höhe nicht jedoch auf die Differenz beider Addukt-Mediane.

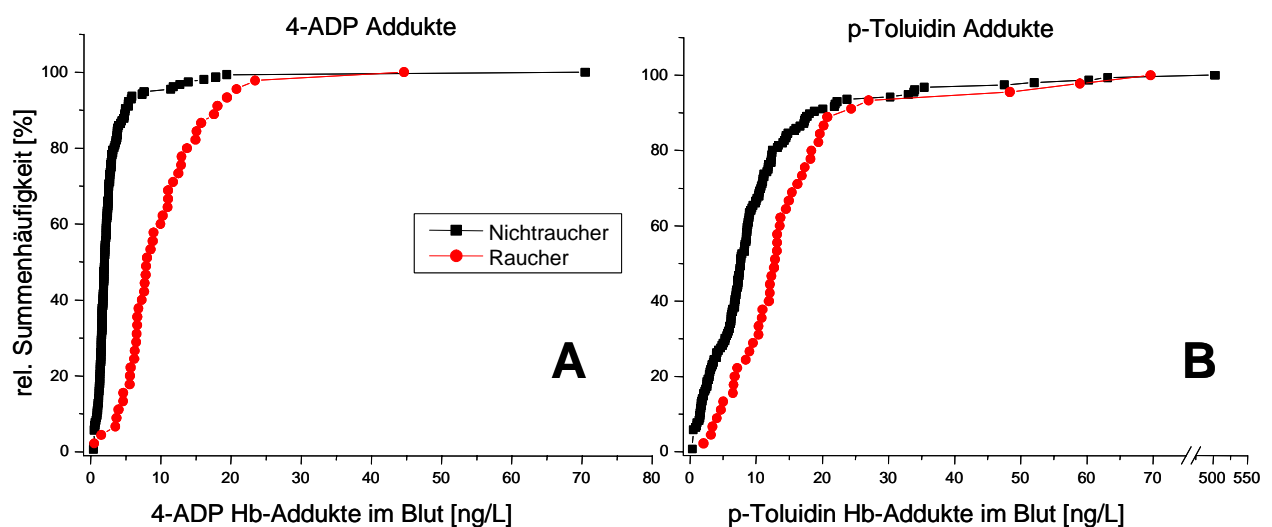
Zusätzlich könnte die mögliche Induktion der *N*-Acetyltransferasen durch das Tabakrauchen Einfluss nehmen auf die Höhe der Raucher-Adduktspiegel. Über die Induzierbarkeit und Inhibition der *N*-Acetyltransferasen *in vivo* liegen in der Literatur keine Daten vor. Jedoch zeigen *in vitro* Versuche mit menschlichen Leber- und Blasen- zellen, dass die NATs gewebspezifisch induziert werden können (Mitchel und Wars-

## Ergebnisse und Diskussion

hawsky 2003). Dies würde bedeuten, dass bei regelhafter Exposition (Induktion über das aktive Rauchen) schnelle wie langsame Acetylierer bei gleicher äußerer bzw. innerer Exposition vergleichsweise weniger Addukte bilden. Dies hätte zur Folge, dass die Adduktwerte der Raucher im Mittel kleiner würden und somit auch die Differenz der Mediane zwischen Rauchern und Nichtrauchern.

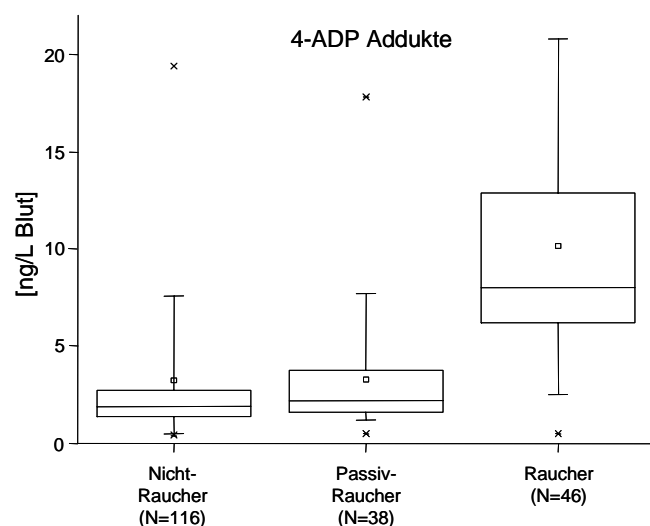
Beim o-Anisidin überschneiden sich die Messbereiche beider Teilkollektive ebenfalls. Hier ist ebenso wie bei den Urinwerten kein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern feststellbar.

Anders sieht es aus im Falle des 4-Aminodiphenyls. Hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern (Median Raucher: 7,9 ng/L; Nichtraucher 2,0 ng/L). Dieser Unterschied ist hoch signifikant ( $p < 0,001$ ; Abbildung 15, Abbildung 16). Offensichtlich ist das aktive Tabakrauchen Hauptquelle der gefundenen Beanspruchung. Dennoch wiesen auch einige Nichtraucher 4ADP-Adduktwerte auf, die eher bei den Rauchern zu erwarten wären. Mögliche Quelle hierfür könnte der Gebrauch von Haarfärbemitteln sein. In solchen Produkten wurden 4ADP-Rückstände im Bereich von mehreren  $\mu\text{g}/\text{kg}$  gefunden (Turesky et al. 2003). Der Gebrauch von Haarfärbeprodukten wurde im Fragebogen jedoch nicht abgefragt. Es ist aber davon auszugehen, dass nur ein relativ geringer Anteil der Probanden, sich die Haare färbt. Als möglicher Hinweis kann nur angeführt werden, dass in der Gruppe der Nichtraucher mit 4ADP-Adduktwerten oberhalb von 5 ng/L (~90. Perzentil) die Gruppe der Frauen mit 77% deutlich überrepräsentiert ist.



**Abbildung 15:** Unterschied Raucher/Nichtraucher bei den 4ADP(A)- und p-Toluidin-Hb-Addukten(B)

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 16:** Boxplots Nichtraucher, Passivraucher und Raucher bei den 4ADP-Hb-Addukten

Die von uns ermittelten 2-Naphtylamin-Addukt-Konzentrationen bei der Allgemeinbevölkerung liegen mit einem Median von 1,2 ng/L im unteren Erfassungsbereich der Adduktanalytik. Dieses Ergebnis stimmt gut mit den entsprechenden Erwartungswerten aus der Literatur überein: Bei 2NA-unbelasteten Nichtrauchern wurden entsprechende Hb-Addukte im Durchschnitt von 2 ng/L Blut (1-6 ng/L) gefunden (Lewalter 1994 und darin zitierte Literatur). Das Rauchen von etwa 20 Zigaretten pro Tag erhöht demnach die Hb-Adduktmenge um durchschnittlich etwa 3 ng/L Blut (2-17 ng/L). Auch der Acetyliererstatus hat scheinbar einen nicht zu vernachlässigen Einfluss auf die Höhe des Adduktspiegels bei aromatischen Aminen. Während Raucher mit schwacher *N*-Acetyltransferaseaktivität bei einem Konsum von ca. 20 Zigaretten pro Tag im Durchschnitt 6 +/- 1 ng/L an 2NA-Hb-Addukten aufwiesen, so liegt dieser Wert bei starken Acetylierern bei etwa 4 +/- 1,5 ng/L (Lewalter 1994). Die inhalierte Dosis beträgt dabei etwa 24 ng 2-Naphtylamin pro Tag (20 Zigaretten), hinzukommen ggf. 2NA-Belastungen aus dem Nebenstromrauch (Passivrauchbelastung). Bei nichtrauchenden schwachen Acetylierern wurden Adduktkonzentrationen von 2 +/- 1 ng/L gemessen, bei nichtrauchenden starken Acetylierer lagen diese Werte bei 1 +/- 0,5 ng/L (Lewalter 1994). Bei Konzentrationen in diesem Bereich wurden jedoch noch keine erhöhten DNA-Strangbruchraten festgestellt (Lewalter 1994). Hierbei gilt es zu beachten, dass die genannten Untersuchungen bereits über 10 Jahre zurückliegen. Mittlerweile enthalten handelsübliche Zigaretten im Durchschnitt hellere Tabaksorten und somit auch niedrigere Kondensatwerte. Ein Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern in den 2NA-Adduktspiegeln wurde in unserem Kollektiv

nicht festgestellt. Quellen für diese Beanspruchung müssten demnach andere sein, als das Rauchen.

### **5.2.2 Einflussfaktor Ernährung**

Betrachtet man die Adduktkonzentrationen der Nichtraucher vor dem Hintergrund des individuellen, täglichen Cafe-Konsums, so ist lediglich bei den m-Toluidinaddukten ein schwach signifikanter Unterschied festzustellen ( $p < 0,04$ ). Gemeinsam mit dem Befund erhöhter m-Toluidinkonzentrationen im Urin bei Cafetrinkern ( $p < 0,007$ ) kann dies als Hinweis gedeutet werden, dass der Konsum dieses Genussmittels mit einer leicht erhöhten Aufnahme von m-Toluidin verbunden ist. Der tägliche Konsum von schwarzem Tee zeigt solche Einflüsse in unseren Kollektiven nicht.

Während sich beim Kurzzeitparameter 3,5-Dichloranilin im Urin noch ein deutlicher, statistisch signifikanter Einfluss hinsichtlich des täglichen Weinkonsums zu, so war der Hb-Addukt-Median des 3,5-Dichloranilins bei den Personen, die täglich Wein zu sich nehmen zwar leicht erhöht (Weintrinker: 16,0 ng/L; Nicht-Wein-Trinker: 12,4 ng/L), aber nicht statistisch signifikant. Wie bereits erwähnt, werden in der Urinanalytik hydrolysebedingt nicht nur 3,5-Dichloranilin bzw. seine Phase-II-Metabolite *per se* erfasst, sondern auch weitere Metabolite der Dicarboximid-Pflanzenschutzmittel (siehe Will et al. 2001). Diese weiteren Metabolite beinhalten zwar das 3,5-Dichloranilin als Struktureinheit, stammen jedoch nicht aus einem Metabolismuspfad, der über die entsprechende Nitroverbindung zur Hb-Adduktbildung führen kann. Das wirkt sich daher bei den regelmäßigen Weintrinkern zusätzlich erhöhend aus auf die gemessenen 3,5-Dichloranilinspiegel im Urin, nicht jedoch auf deren Hb-Adduktpegel.

Zusätzlich gilt es aber auch zu beachten, dass im Fragebogen lediglich der tägliche Weinkonsum erfasst wurde. Diejenigen Personen, die zwar des Öfteren bzw. ggf. regelmäßig Wein zu sich nehmen, aber eben nicht täglich, zählen demnach zum Kollektiv der Nicht-Weintrinker. Dieser unbekante Anteil der gelegentlichen Weintrinker dürfte sich im Kollektiv der Nicht-Weintrinker erhöhend auswirken sowohl auf die Mediane wie auch auf die Streuung des 3,5-Dichloranilins in Urin und Blut.

Darüber hinaus war der tägliche Konsum von Kräutertee statistisch signifikant mit einer erhöhten 3,5-DCIA-Adduktrate bei den entsprechenden Probanden verbunden ( $p < 0,005$ ). Im Fall des Kräutertees ist eher davon auszugehen, dass dessen Konsum

im Allgemeinen auch regelhaft täglich stattfindet, was sich dann sowohl in der Signifikanz beim Kurzzeitparameter im Urin wie auch beim Langzeitparameter im Blut zeigt. Die restlichen ernährungsbezogenen, über den Fragebogen erfassten möglichen Einflussfaktoren zeigten keinen Einfluss auf die Adduktkonzentrationen der vermessenen aromatischen Amine.

Die möglichen Pflanzenschutzmittelmetabolite 4-Isopropylanilin und 4-Bromanilin konnten in keiner der untersuchten Blutproben gefunden werden.

### **5.2.3 Einflussfaktor Bekleidung**

Neben den bereits diskutierten Parametern wurden in einer Pilotstudie bei 50 zufällig aus dem Gesamtkollektiv (N=200) ausgewählten Probanden das Blut auch auf Hämoglobinaddukte der möglichen Azofarbstoffmetabolite 3,3'-Dimethylbenzidin, 3,3'-Dichlorbenzidin, 3,3'-Dimethoxybenzidin sowie 4,4'-Methylenbis-(2-chloranilin) untersucht. Obwohl diese Substanzen mit dem in Abschnitt 4.4 beschriebenen Verfahren bei Präzisionen zwischen 21 und 30 % nicht mehr hinreichend zuverlässig quantifizierbar waren, konnte festgestellt werden, dass bei Nachweisgrenzen im Bereich von 0,5 ng/L die Allgemeinbevölkerung keine Beanspruchung mit diesen zweikernigen, bifunktionellen Aromatischen Amine aufweist. Auf die Implementierung der einfach desaminierten Analoga des Benzidin und des 4,4'-Methylenbis-(2-chloranilin) in das bestehende Analysenverfahren wurde daher verzichtet.

Darüber hinaus bleibt nur zu vermuten, dass auch ein gewisser Anteil weiterer Aromatischer Amine, wie beispielsweise das Anilin oder das o-Anisidin aus Bekleidungsgegenständen oder auch Lederprodukten von Personen der Allgemeinbevölkerung aufgenommen werden könnten.

### **5.2.4 Weitere Einflussfaktoren**

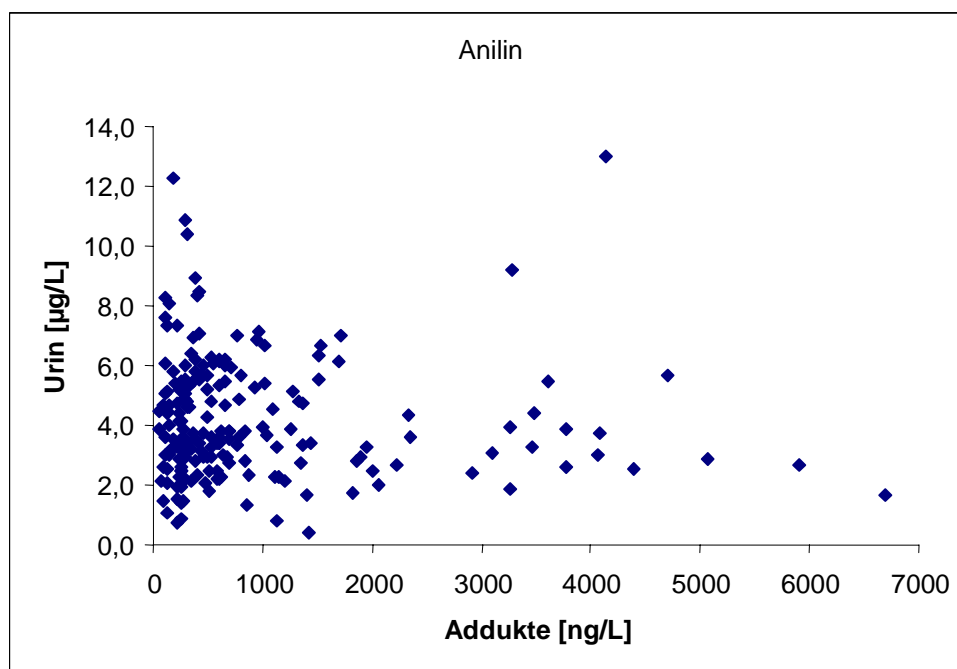
Weder bei Anwohnern verkehrsreicher Straßen noch über die im Fragebogen abgefragte Einschätzung zur persönlichen Belästigung durch Abgase aus dem Straßenverkehr waren Assoziationen zu einem der im Blut gemessenen Parameter zu erkennen. Dies steht in gutem Einklang mit den ebenfalls nicht vorhandenen Unterschieden zwischen den Bewohnern ländlicher und städtischer Gebiete.

Ebenfalls keinen Einfluss auf die Addukte aromatischer Aminene im Urin hatten das Alter der Probanden sowie deren Körpergewicht, das über den BMI (Body Mass Index) in die Auswertung einging.

Der in den Urin-Ausscheidungsraten hoch signifikante Unterschied beim o-Toluidin zwischen männlichen und weiblichen Probanden (Männer > Frauen) ist bei den entsprechenden Addukten nicht zu finden, obwohl sich die Mediane zwischen Frauen (25,1 ng/L) und Männern (18,7 ng/L) relativ stark unterscheiden.

### 5.3 Korrelation Biochemical Effect Monitoring, Biological Monitoring

Die Korrelation der Messwerte für die aromatischen Amine aus dem Biological Monitoring (Urin) und aus dem Biochemical Effect Monitoring ergab keinen statistisch signifikanten Zusammenhang. Exemplarisch sei dies anhand von Anilin in Abbildung 17 verdeutlicht. Dieser Befund ist nicht unerwartet. Während nämlich die renale Ausscheidung eine kurz zurückliegende Exposition der letzten Stunden bzw. des vorangegangenen Tages widerspiegelt, sind die Hb-Addukte ein Maß für die durchschnittliche Exposition der letzten 4 Monate.



**Abbildung 17:** Korrelation Urin- und Adduktwerte für Anilin

Dabei bildet die Adduktkonzentration etwa das 60fache der durchschnittlichen, zum Addukt führenden, effektiven Eintagesdosis der letzten 120 Tage ab. Es wird in Abbildung 17 somit ein relativ großen Tagesschwankungen unterliegender Wert mit einem Durchschnittswert über die letzten 120 Tage verglichen.

Darüber hinaus unterliegen einzelne von Enzymen modulierte Reaktionspfade im Metabolismus der aromatischen Amine einem Polymorphismus. Besonders hervor-



## **Ergebnisse und Diskussion**

---

zuheben in diesem Zusammenhang ist der Polymorphismus der Phase-II-Enzyme NAT2 und NAT 1. Es wird unterteilt nach sog. schnellen und langsamen Acetylierern, wobei sich diese Einteilung in der Regel auf die metabolische Kapazität der NAT2 bezieht. Die *N*-Acetyltransferasen katalysieren die Übertragung der Acetylgruppe des Acetyl-Coenzym A auf den Stickstoff der aromatischen Amine, aber auch auf den Sauerstoff von Hydroxylaminen (*O*-Acetyltransfer). Bei erneuter Betrachtung des Metabolismus-Schemas in Abbildung 6 wird deutlich, dass dem inkorporierten aromatischen Amin prinzipiell zwei konkurrierende Stoffwechselfade offen stehen. Beim schnellen Acetylierer wird hierbei die NAT-modulierte Phase-II-Reaktion schneller beschritten als dies beim langsamen Acetylierer der Fall ist. Beim langsamen Acetylierer hingegen steht aufgrund der vergleichsweise eingeschränkten Kapazität der NAT pro Zeiteinheit eine größere Dosis an Aminen zur Verfügung, die nach oxidativer Funktionalisierung über CYP 1A2 schließlich zur Adduktbildung beitragen kann. Das bedeutet aber, dass der langsame Acetylierer bei vergleichbarer Exposition in der Regel auch geringere Adduktkonzentration auf als der schnelle Acetylierer.

Der schnelle Acetylierer ist also durch die genetisch determinierte Fähigkeit charakterisiert, vergleichsweise größere Mengen an aromatischen Aminen pro Zeiteinheit durch das Enzym umsetzen (acetylieren) zu können. In Mitteleuropa sind ca. 40 % der Bevölkerung schnelle Acetylierer, andere Ethnien können davon stark abweichende Verteilungen aufweisen. Im Blut schneller Acetylierer werden nach unfallhaften Expositionen gegenüber aromatischen Aminen sehr viel geringere Adduktkonzentrationen festgestellt, als bei langsamen Acetylierern (Lewalter & Korallus 1985). Auch tierexperimentelle Befunde belegen diesen Unterschied bei den Adduktraten. Es bestehen unterschiedliche Hämoglobinbindungsindices bei langsam und schnell acetylierenden Mäusen (Zwirner-Baier & Neumann 1998).

Unter der hypothetischen Voraussetzung, dass die im Urin gemessenen Konzentrationen (ebenso wie die Blutwerte) jeweils immer die durchschnittliche innere Exposition der letzten 120 Tage widerspiegeln, könnte man in Abhängigkeit vom Acetyliererstatus in Abbildung 17 zwei Cluster bzw. Gruppen erwarten:

- 1) langsame Acetylierer

relativ hohe Adduktwerte im Verhältnis zu den Urinwerten mit einer steilen Steigung der Regressionsgeraden

### 2) schnelle Acetylierer

relativ niedrige Adduktwerte im Verhältnis zu den Urinwerten mit einer vergleichsweise mäßigen Steigung der Regressionsgeraden

Abbildung 17 deutet dies insbesondere bei den hohen Adduktwerten und den hohen Urinkonzentrationen zwar an, jedoch ist hier die Probandenzahl offensichtlich noch zu klein, um die tägliche Schwankung der inneren Exposition statistisch herausmitteln zu können und somit den bereits bei verunfallten hochexponierten Chemikarbeitern (Lewalter & Korallus 1985) und im Tierexperiment (Zwirner-Baier & Neumann 1998) belegten Einfluss des Acetyliererstatus auch bei umweltbedingten Expositionen im Niedrigdosisbereich zu zeigen.

Trotz dieser Abhängigkeit vom individuellen Enzymstatus zeigt sich aber beim Vergleich der 4-Aminobiphenyl-Addukte (Langzeit-Parameter) mit der Konzentration von Cotinin im Urin (einem anerkannten Kurzzeit-Biomarker für Nikotin) eine positive Korrelation (Abbildung 18). Hier kann man bei den Rauchern zu einem großen Anteil davon ausgehen, dass die im Urin beobachtete Cotininausscheidung sowohl die aktive Tabakrauchexposition der letzten 24 Stunden wie auch die durchschnittlichen Tabakrauchexposition der letzten 120 Tagen widerspiegelt. Sofern sich das Rauchverhalten von Tag zu Tag nicht stark unterscheidet, werden also bei den Rauchern hier in guter Näherung zwei "Langzeitparameter" miteinander verglichen. Bei den Nichtrauchern kann man davon jedoch nicht ausgehen. Eine Adjustierung nach dem Acetyliererstatus (Status beeinflusst nicht die Cotininausscheidung im Urin) sollte die Regression zwischen 4ADP-Addukten im Blut und Cotinin im Urin noch erheblich verbessern.

Es weisen jedoch auch einige, wenige Nichtraucher, bzw. schwache Passivraucher (anamnestisch abgefragt und über Cotinin differentialdiagnostisch bestätigt) 4-Aminobiphenyl-Addukte in Konzentrationen auf, die eher bei Rauchern erwartet werden. Eine hohe, permanente Passivrauchbelastung könnte diese Befunde zwar erklären und ist aufgrund der relativ kleinen Halbwertszeit des Nikotins nicht vollends auszuschließen, aber eher unwahrscheinlich. Bei den p-Toluidin-Addukten war trotz des signifikanten Unterschieds der Teilkollektive Raucher und Nichtraucher keine Korrelation mit den Cotininwerten zu erhalten.

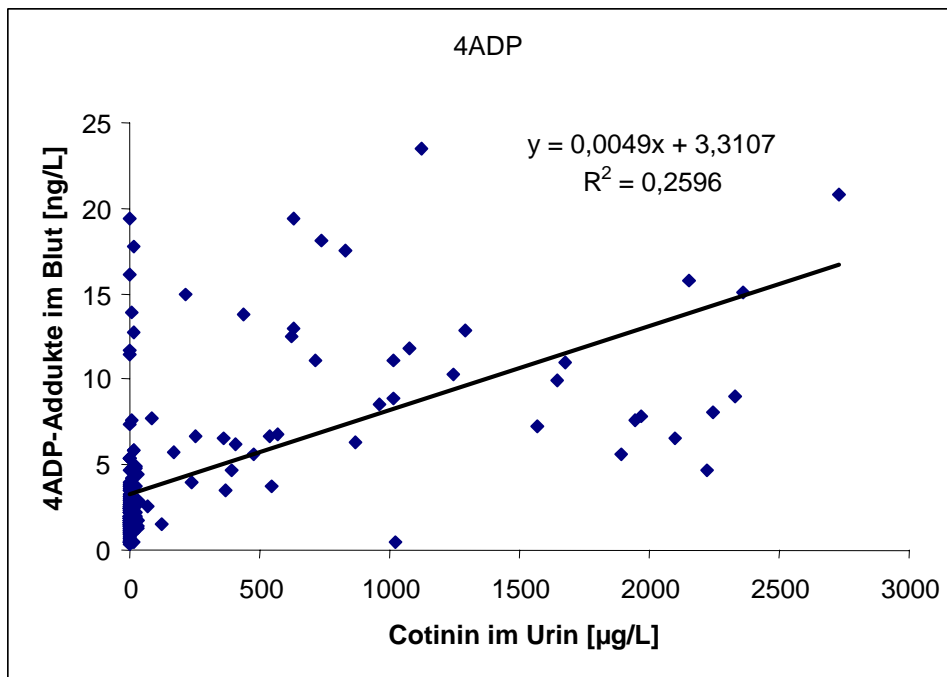


Abbildung 18: Korrelation 4ADP-Addukte / Cotinin im Urin

### 5.4 Quellenbetrachtung und Modellrechnung

Das Ergebnis der Abhängigkeit der Parameter 4-Aminobiphenyl und p-Toluidin im Blut vom anamnestisch abgeklärten und differentialdiagnostisch überprüften Raucherstatus belegt trotz des äußerst niedrigen Konzentrationsbereichs und des möglichen Einflussfaktors „NAT-Phänotyp“ eindrucksvoll, dass im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden sehr gut geeignet sind, auch im Ultraspurenbereich zuverlässige und aussagekräftige Ergebnisse zu liefern. In Anbetracht dieser Tatsache ist es zunächst um so erstaunlicher, dass solche positiven Assoziationen für die ebenfalls im Tabakrauch enthaltenen Amine Anilin, o-, und m-Toluidin nicht zu finden sind. War bei den Parametern o-, und m-Toluidin im Urin noch ein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern feststellbar, konnte dies weder für die restlichen im Tabakrauch enthaltenen Amine im Urin noch bei ihren Hb-Addukten im Blut festgestellt werden. Daher müssen für diese Amine noch weitere Quellen zur Belastung der Allgemeinbevölkerung beitragen, die teilweise weit bedeutender sind als das Rauchen. Gestützt wird diese These auch durch eine modellhafte Abschätzung der inhalativen Aufnahme von aromatischen Aminen, die zugänglich ist aus einer Berechnung über den Hämoglobinbindungsindex (HBI) sowie auch mit Einschränkungen (12h-Tagesurin, Hydrolyse von nicht bioverfügbaren Metaboliten, unklare Datenlage) über den Anteil der Amine, der unverändert bzw. konjugiert mit dem Urin aus-

## **Ergebnisse und Diskussion**

---

geschieden wird. Für solche Berechnungen kann derzeit leider nur auf Daten aus Tierversuchen (Tabelle 6) zurückgegriffen werden.

Dabei wurden folgende Annahmen bzw. Vereinfachungen zugrunde gelegt:

- Der durchschnittliche Raucher mit einem Körpergewicht (KG) von 71 kg (Abschnitt 4) raucht 16 Zigaretten am Tag (z.B. Keller et al. 2003).
- Ca. 90% des im Tabakrauch bzw. in der Atemluft enthaltenen Anilins werden inhalativ resorbiert (siehe MAK-Begründung Anilin). Die Resorptionsrate ist konstant. Gleiches soll gelten für die restlichen Amine.
- Beteiligte Enzymvermittelte Metabolismuspfade sind über den betreffenden Konzentrationsbereich nicht gesättigt.
- Der Durchschnittsproband atmet täglich ein Luft-Volumen von 20 m<sup>3</sup> ein, er besitzt 5 Liter Blut, und scheidet täglich eine Urinmenge von 1,25 Liter aus.
- Die gemessenen Adduktkonzentrationen entsprechen dem 60fachen der täglich gebildeten Adduktkonzentration (Abschnitt 8.1.2.4).
- Der HBI der Ratte soll zunächst in seiner Größe mit dem mittleren HBI des Menschen (schneller/langsamer Acetylierer) vergleichbar sein. Da anzunehmen ist, dass in der Ratte im Vergleich zum Menschen wie auch im Vergleich der verschiedenen aromatischen Amine nicht völlig unterschiedliche Pfade im Fremdstoffmetabolismus der aromatischen Amine beschränkt werden (!Ausnahme Benzidin), müsste der HBI der Ratte gegebenenfalls mit einem für alle Amine gleichen Faktor "k" belegt werden, der möglichen Unterschieden in der Stoffwechsellkapazität zwischen Ratte und Mensch Rechnung trägt. Da der Acetyliererstatus beim Menschen einen Einfluss auf die Menge gebildeter Addukte pro Doseinheit besitzt und das Verhältnis von schnellen zu langsamen Acetylierern in unserem Kollektiv konstant ist, spiegelt dieser Faktor in gewisser Hinsicht auch den "Acetyliererstatus" unseres Kollektivs wider:  
$$HBI = k \times HBI_{Ratte}$$
- Die im Tierversuch ermittelten Raten an Aminen, die unverändert bzw. konjugiert mit dem Urin ausgeschieden werden, sollen auch für den Menschen gelten.

## Ergebnisse und Diskussion

---

Der Hämoglobinbindungsindex (HBI) beschreibt das Verhältnis der Konzentration eines gebildeten Addukts ( $c_{\text{Addukt } 24h}$  in mmol Addukt/mol Hb), das innerhalb eines Tages (24h) gebildet wird nach Verabreichung einer einmaligen Dosis an einem Tag ( $Dosis_{\text{relativ pro Tag}}$  in mmol/kg KG).

$$HBI = \frac{c_{\text{Addukt } 24h} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{mol Hb}} \right]}{Dosis_{\text{relativ}} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{kg KG}} \right]}$$

Erfolgt nun täglich wiederholt eine innere Exposition bleibt das Verhältnis zwischen der pro Tag gebildeten Adduktmenge ( $c_{\text{Addukt pro Tag}}$ ) und relativen Dosis pro Tag ( $Dosis_{\text{relativ pro Tag}}$ ) konstant. Man kann also auch schreiben:

$$HBI = \frac{c_{\text{Addukt pro Tag}} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{mol Hb}} \right]}{Dosis_{\text{relativ pro Tag}} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{kg KG}} \right]}$$

Um nun aus dem HBI und der im Blut von Personen gemessenen Adduktkonzentration (in  $\mu\text{g/L}$  Blut) abschätzen zu können, welche äußere Exposition zur Bildung einer solchen Adduktkonzentration nötig ist, müssen in dieser Formel einige Umrechnungen vorgenommen werden:

$$Dosis_{\text{relativ pro Tag}} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{kg KG}} \right] = \frac{c_{\text{Addukt pro Tag}} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{mol Hb}} \right]}{HBI}$$

Zunächst einmal müssen die molaren Einheiten der Dosis ( $Dosis_{\text{relativ pro Tag}}$ ) und der Adduktkonzentration ( $c_{\text{Addukt pro Tag}}$ ) in Masseeinheiten umgerechnet werden.

Da das menschliche Hämoglobin eine molare Masse von 64.500 g/L besitzt und ein Liter Blut etwa 160 g Hämoglobin enthält, entspricht 1 Mol Hämoglobin etwa einem Volumen von 403 Litern:

$$Dosis_{\text{relativ pro Tag}} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{kg KG}} \right] = c_{\text{Addukt pro Tag}} \left[ \frac{\mu\text{g}}{403 \text{ L Blut}} \right] \times \frac{1}{HBI}$$

Die im Blut gemessenen Adduktkonzentrationen ( $c_{\text{Addukt}}$  in  $\mu\text{g/L}$ ) entspricht dem 60fachen der durchschnittlichen, täglich gebildeten Adduktkonzentration ( $c_{\text{Addukt pro Tag}}$  in  $\mu\text{g/L}$ ) (siehe Abschnitt 8.1.2.4). Damit wird folgende Gleichung erhalten:

$$Dosis_{\text{relativ pro Tag}} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{kg KG}} \right] = \frac{1}{60} \times c_{\text{Addukt}} \left[ \frac{\mu\text{g}}{403 \text{ L Blut}} \right] \times \frac{1}{HBI}$$

## Ergebnisse und Diskussion

---

Wenn man nun die relative, tägliche Dosis ( $Dosis_{\text{relativ pro Tag}}$ ) durch eine absolute tägliche Dosis ( $Dosis_{\text{absolut pro Tag}}$ ) für eine Standardperson unseres Kollektivs (71 kg) ersetzt, wird folgende Gleichung erhalten:

$$\frac{1}{71} \times Dosis_{\text{absolut pro Tag}} \left[ \frac{\mu\text{g}}{71 \text{ kg}} \right] = \frac{1}{60} \times c_{\text{Addukt}} \left[ \frac{\mu\text{g}}{403 \text{ L Blut}} \right] \times \frac{1}{HBI}$$

Durch Normierung auf einen Liter Blut und Umformung erhält man schließlich:

$$Dosis_{\text{absolut pro Tag}} \left[ \frac{\mu\text{g}}{71 \text{ kg}} \right] = \frac{71 \times 403}{60} \times c_{\text{Addukt}} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{L Blut}} \right] \times \frac{1}{HBI}$$

$$Dosis_{\text{absolut pro Tag}} \left[ \frac{\mu\text{g}}{71 \text{ kg}} \right] = \frac{477}{HBI} \times c_{\text{Addukt}} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{L Blut}} \right]$$

Mit dieser Gleichung kann nun mit der im Blut gemessenen Adduktkonzentration ( $c_{\text{Addukt}}$ ) abgeschätzt werden, welche absolute Dosis ( $Dosis_{\text{absolut pro Tag}}$ ) eines aromatischen Amins von einer Person täglich (durchschnittlich über die letzten 120 Tage) aufgenommen wird.

## Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 23:** Modellhafte Abschätzung der Dosen, die zur Bildung der entsprechenden Adduktkonzentrationen (oberer Teil) bzw. der im Urin gemessenen Konzentrationen (unterer Teil) täglich aufgenommen werden müssen und Vergleich mit täglichen inhalativ inkorporierten Dosen, die sich aus der Aufnahme aus Zigaretten bzw. aus der Umgebungsluft ergeben.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>Berechnung aus Adduktwerten</b>							
Substanz	HBI	berechnete tägliche Dosis Nichtraucher [ng/Tag]	berechnete tägliche Dosis Raucher [ng/Tag]	berechnete tägliche Dosis Rauchen [ng/Tag]	verfügbare Dosis aus 16 Zigaretten* [ng/Tag]	Dosisbereich aus 16 Zigaretten** [ng/Tag]	Dosisbereich aus 10 m <sup>3</sup> Luft*** [ng/Tag]
Anilin	22	10.200	9.500	-	4200	450-7.200	80-13.600
o-Toluidin	4,0	2.650	3.000	350 (11%)	660	29-2.560	24-184
m-Toluidin	4,9	2.910	3.600	690 (19%)	720	102-1.730	1,2-170
p-Toluidin <sup>a</sup>	4,3; 2,0	850; 1850	1.400; 3050	550; 1.200 (40%)	520	90-1.430	bis 170
o-Anisidin	k.A.	-	-	-	k.A.	7,2-75	k.A.
4ADP <sup>a</sup>	344; 725	3; 3	11; 5	8; 4 (76%)	29	13-166	bis 8
Benzidin zu 4ADP	2,9	310	1.300	990	-	-	-
2NA	0,14	4.100	3.750	-	29	1,3-64	bis 8
<b>Berechnung aus Urinwerten</b>							
	Anteil Dosis im Urin [%]	berechnete tägliche Dosis Nichtraucher [ng/Tag]	berechnete tägliche Dosis Raucher [ng/Tag]	berechnete tägliche Dosis Rauchen [ng/Tag]	verfügbare Dosis aus 16 Zigaretten* [ng/Tag]	Dosisbereich aus 16 Zigaretten** [ng/Tag]	Dosisbereich aus 10 m <sup>3</sup> Luft*** [ng/Tag]
Anilin	3,0	122.000	124.700	2.700 (2%)	4200	450-7.200	80-13.600
o-Toluidin <sup>a</sup>	3,6; 21; 5,3	2.350; 410; 1.600	5.700; 980; 3.900	3.350; 570; 2.300 (60%)	660	29-2.560	24-184
m-Toluidin	2,5	2.250	8.350	6.100 (60%)	720	102-1.730	1,2-170
p-Toluidin	2,5	2.650	5.950	3.300 (60%)	520	90-1.430	bis 170
o-Anisidin	0,6	43.800	47.800	4.000 (8%)	k.A.	7,2-75	k.A.
4CIA	9	2.900	3.250	350	k.A.	k.A.	k.A.

\* Smith et al. 2003; \*\*Tabelle 3; \*\*Spannweite Tabelle 2; <sup>a</sup> es liegen mehrere Angaben vor (siehe Tabelle 6); k.A. = keine Angaben in der Literatur

### **5.4.1 Aromatische Amine und Tabakrauch (Anilin, Toluidine, o-Anisidin, 4ADP, 2NA)**

Im oberen Bereich von Tabelle 23 sind in Spalte 2 und 3 aufgeteilt nach Rauchern und Nichtrauchern diejenigen berechneten Dosen aufgeführt, denen eine Durchschnittsperson (71kg) täglich innerlich exponiert sein muss, um im Blut den bei unserem Kollektiv gemessenen Adduktspiegel aufzuweisen. Spalte 4 zeigt die entsprechenden Dosen, denen gegenüber ein Raucher zusätzlich durch das Rauchen innerlich exponiert ist, berechnet aus der Differenz zwischen den gemessenen Medianen bei Rauchern und Nichtrauchern. Vergleicht man diese Werte (Spalte 4) mit Dosiswerten in Spalte 5, die sich aus einer Amin-Aufnahme (Werte von Smith et al. 2003 als Beispiel) von 16 Zigaretten unter Annahme einer 90%igen inhalativen Resorptionsrate ergeben, so zeigen sich für die drei Toluidine und das 4ADP sehr gute bis hervorragende Übereinstimmungen zwischen der Exposition durch das Inhalieren von Zigaretten und den Anteilen an Hb-Addukten, die bei Rauchern zusätzlich feststellbar sind. Man kann bei diesen Aminen also hypothetisch annehmen, dass der entsprechende HBI des Durchschnittsmenschen vergleichbar ist mit dem HBI, der in Ratten ermittelt worden ist. Der zu Beginn dieses Abschnitts erwähnte Faktor "k" sollte also nahezu bei 1 liegen. Unter dieser Annahme ist durch den Vergleich von Spalte 3 mit den Spalte 4, 5 und 6 zu erkennen, dass der Anteil an der Dosis, die durch das Rauchen verursacht scheint, beim Anilin und den Toluidinen nur inkrementell an der Gesamtdosis beteiligt sein kann.

Über die Differenz der Mediane (Spalte 2 und 3) kann man für die drei Toluidine und das 4-Aminodiphenyl denjenigen Anteil der Beanspruchung abschätzen, der durch das aktive Rauchen hervorgerufen wird (Prozentwerte in Klammern in Spalte 4). Demnach ist etwa 1/10 der o-Toluidin-Beanspruchung, 1/5 der m-Toluidin-Beanspruchung, 2/5 der p-Toluidin-Beanspruchung und  $\frac{3}{4}$  der 4-Aminodiphenyl-Beanspruchung mit dem aktiven Rauchen assoziiert. Beim Anilin ist über diesen Weg eine solche Abschätzung nicht möglich, da sich die Mediane von Rauchern und Nichtrauchern nicht unterscheiden, bzw. die Nichtraucher in unserem Kollektiv sogar eine im Median höhere Anilin-Beanspruchung aufwiesen. Daher bleibt hier nur ein Vergleich der Dosis aus 16 Zigaretten (Spalte 5) mit der aus den Adduktwerten berechneten Dosis (Spalte 3). Bei unserem Durchschnittsraucher wäre demnach vor-



## ***Ergebnisse und Diskussion***

---

sichtig abzuschätzen, dass etwas weniger als die Hälfte der täglich "notwendigen" Dosis über das aktive Rauchen aufgenommen werden könnte.

Betrachtet man darüber hinaus die zur Bildung der gemessenen Addukte notwendige Dosis (Spalte 2) vergleichend mit den Dosen, die über die Atemluft aufgenommen werden können (Spalte 7), so wird klar, dass lediglich im Fall des Anilins, die äußere Exposition über die Atemluft ausreichend wäre, die gemessenen Adduktkonzentrationen zu erklären. Dazu müsste die Atemluft jedoch im Mittel mit etwa  $900 \text{ ng/m}^3$  kontaminiert sein. Solche Luft-Werte wurden aber nur gelegentlich in stark verrauchten Räumen (Tabelle 2; Quelle z.B. Nebenstromrauch, siehe auch Tabelle 3) gemessen, so dass lediglich ein gewisser inkrementeller Anteil der Anilin-Gesamtbelastung aus einer Passivrauchbelastung stammen könnte. Bei den Toluidinen kann die Aufnahme aus der Atemluft (und damit auch eine Passivrauchbelastung) allenfalls im einstelligen prozentualen Bereich zur Gesamtbelastung beitragen.

Zieht man diese Überlegungen heran, so wird auch deutlich, warum in der Reihe der Toluidine lediglich bei den p-Toluidin-Addukten ein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern gefunden werden konnte. Bei o- und m-Toluidin ist an sich die Dosis aus täglich 16 Zigaretten zu gering im Verhältnis zur notwendigen Gesamtdosis, um bei der relativ großen Streuung der gemessenen Adduktwerte, einen signifikanten Unterschied zu erkennen. Beim Anilin wäre dieser Teil zwar ausreichend, könnte aber durch eine stark schwankende äußere Exposition zum Beispiel aus der Luft oder anderen Quellen überlagert sein. Lediglich beim p-Toluidin ist offensichtlich die Differenz zwischen der Konzentration von 16 Zigaretten und der berechneten Konzentration, die die Gesamtbelastung erklären würde, klein genug, um Signifikanz zu erreichen. Darüber hinaus dürfte auch der Acetyliererstatus eine große Rolle spielen. In Abhängigkeit von ihm vergrößert sich die Streuung gebildeter Adduktkonzentrationen bei gleicher innerer Exposition, die Bereiche werden sozusagen unschärfer. Als Konsequenz davon sind die bei den Urinwerten signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Teilkollektiven (Raucher/Nichtraucher) erst bei größerem Anteil des Rauchens an der Gesamtbelastung auch bei den Addukten als signifikant zu erkennen. Dies hat aber unter der Annahme, dass sich schnelle und langsame Acetylierer in beiden Teilkollektiven gleich verteilen, keinen Einfluss auf die Differenz beider Mediane.

Anders als beim Anilin und den Toluidinen sieht es beim 4-Aminodiphenyl aus. 4ADP hat bei den hier betrachteten Aminen den größten HBI. Das bedeutet, es ist lediglich

## ***Ergebnisse und Diskussion***

---

eine relativ kleine Menge an aufgenommener Substanz nötig, um eine relativ hohe Adduktkonzentration hervorzurufen. Beim 4ADP ist die in 16 Zigaretten enthaltene ADP-Dosis ausreichend, um die Differenz zwischen Rauchern und Nichtrauchern zu erklären. Auch könnte ein Großteil der Belastung der Nichtraucher mit einer Passivrauchbelastung erklärbar sein. Es wären rechnerisch nämlich nur Atemluftkonzentrationen von 100 - 150 pg/m<sup>3</sup> nötig, um den Median des Adduktspiegels der Nichtraucher zu erklären. Darüber hinaus sind auch etwa 10% der Nichtraucher mit Adduktspiegeln (< 5 ng/L) belastet, die man ansonsten bei der Gruppe der Raucher erwartet. Die Überprüfung der differentialdiagnostisch ermittelten Cotinin-Konzentration im Urin als Parameter einer Tabakrauchbelastung zeigte jedoch in diesen Fällen keine Hinweise auf eine außerordentlich hohe Passivrauchbelastung. Der Parameter Cotinin im Urin kann jedoch nur eine Passivrauchbelastung der letzten Tage zuverlässig anzeigen, so dass nicht auszuschließen ist, dass mit Abstand einiger Tage zur Urinspende hohe Passivrauchexpositionen stattgefunden hatten bzw. Gelegenheitsraucher sich in der Anamnese als Nichtraucher bezeichneten. Zur Klärung des Sachverhalts in diesen Fällen könnte die Vermessung von Acrylnitril-Hb-Addukten (ein Langzeit-Parameter für eine Tabakrauchbelastung) weitere Aufschlüsse bringen (Perez et al. 1999, Schettgen et al. 2002). Eine zusätzlich mögliche 4ADP-Quelle wäre eine Exposition über Haarfärbeprodukte. In solchen Produkten werden 4ADP-Rückstände im Bereich von mehreren µg/kg gefunden (Turesky et al. 2003). Unter der Annahme, dass etwa 80 % des 4ADP aus 100-200g Haarfärbemittel (mit 1 µg/kg 4ADP, Anwendung alle 6 Wochen) über die Haut resorbiert wird, wäre bereits eine 4ADP-Adduktkonzentration zwischen 2 und 4 ng/L zu erwarten.

Darüber hinaus ist zu beachten, dass auch im Metabolismus des Benzidins, 4ADP-Addukte gebildet werden (Zwirner-Baier und Neumann 1998). Aufgrund des entsprechenden, relativ kleinen HBI (3,9: Benzidin zu 4ADP-Addukten) ist es jedoch unwahrscheinlich, dass eine umweltbedingte Benzidin-Exposition nennenswert zur inneren effektiven 4ADP-Belastung beiträgt.

2NA besitzt einen relativ kleinen HBI von 0,14. Das bedeutet, dass eine vergleichsweise hohe Exposition gegenüber diesem Stoff vorhanden sein muss, um einen gewissen Adduktspiegel hervorzurufen. Mit Hilfe des HBI lässt sich aus dem Median der 2NA-Adduktkonzentration berechnen, dass eine Person der Allgemeinbevölkerung täglich etwa 4000 ng 2NA-Amin aufnehmen müsste. Dieser Wert erscheint außerordentlich hoch, er entspräche dem 2NA-Hauptromrauchgehalt von etwa 2000

## **Ergebnisse und Diskussion**

---

Zigaretten täglich. Die notwendige relativ hohe Exposition kann also auch erklären, warum zwischen Rauchern und Nichtrauchern kein signifikanter Unterschied in den 2NA-Adduktkonzentrationen festzustellen war. Die Belastung der Allgemeinbevölkerung ist demnach nicht durch aktives oder passives Rauchen (Innenraumlufkonzentrationen Tabelle 2) zu erklären. Andere Quellen und ggf. damit assoziiert auch andere Aufnahmepfade (oral, dermal) müssen hier für die gefundenen 2NA-Beanspruchung der Allgemeinbevölkerung verantwortlich sein.

Ähnliche Abschätzungen, wie sie hier mit den Daten der Hämoglobinaddukte vorgenommen wurden, finden sich für die Urinwerte im unteren Teil von Tabelle 23. Vergleicht man die berechneten Dosen der Nichtraucher (Spalte 29) mit den entsprechenden Werten berechnet aus den Addukten, zeigen sich bei den drei Toluidinen auch hier sehr gute Übereinstimmungen, obwohl sie durchweg leicht über den aus den Adduktwerten berechneten Dosen liegen. Bei den Rauchern (Spalte 3) werden jedoch schon größere Abweichungen festgestellt, so dass schließlich der Vergleich mit der Dosis, die in 16 Zigaretten enthalten ist, keine besonders gute Übereinstimmung mehr zeigt. Die in 16 Zigaretten enthaltenen Dosen an Aminen (Spalten 6 und 7) wären demnach nicht ausreichend, um den im Vergleich zu den Adduktwerten relativ großen und signifikanten Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern zu erklären. Man muss jedoch in Betracht ziehen, dass mit dem 12h-Tagsurin zwar ein großer Anteil des täglichen Tabakkonsums erfasst wird, jedoch nur ein kleinerer Anteil einer möglichen Aufnahme über Rückstände in Nahrungsmitteln (siehe auch Abschnitt 5.2). Darüber hinaus bleibt letztlich unklar, welcher Anteil eines inkorporierten Amins genau auch unverändert bzw. konjugiert mit dem Urin ausgeschieden wird. Die in der Literatur vorliegenden Ausscheidungsraten (Tierversuche) wurden zumeist bei beachtlichen Expositionen (mg/kg Körpergewicht) ermittelt und weichen zudem erheblich voneinander ab (siehe z.B. Tabelle 6: o-Toluidin).

Erschwerend kommt bei der Abschätzung über die Urinkonzentrationen hinzu, dass mit dem angewandten Verfahren hydrolysebedingt neben dem unverändertem Amin und seinen Konjugaten auch weitere Metabolite von entsprechenden Pflanzenschutzmitteln im Urin erfasst werden. Diese weiteren Metabolite beinhalten zwar das entsprechende Aromatische Amin als Struktureinheit, müssen jedoch nicht zwangsläufig aus einem Metabolismuspfad stammen, der zur Freisetzung des Amins bzw. (über die entsprechende Nitrosoverbindung) zur Hb-Adduktbildung führen kann.

Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, warum beim Anilin die über die Addukte berechneten Expositionen mit einem Faktor von etwa 10 erheblich unter den über die Urinausscheidungsraten abgeschätzten Werten liegen.

### **5.4.2 Aromatische Amine und Pflanzenschutzmittel (Monochloraniline, Dichloraniline, Anilin, Toluidine)**

Viele in Deutschland zugelassene und in großem Umfang angewendete Pflanzenschutzmittel enthalten als Strukturbestandteile aromatische Amine (Tabelle 4). Aus diesen können bereits auf der Pflanze aromatische Amine freigesetzt werden, bzw. während der Verstoffwechslung im Menschen. So liegt es nahe, zu vermuten, dass die Belastung der Allgemeinbevölkerung mit diesen Stoffen auch auf eine Aufnahme Rückstände von Pflanzenschutzmitteln bzw. ihren Abbauprodukten zurückzuführen ist. Gestützt wird diese Vermutung durch Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zum Phenmedipham. Dass Phenmedipham im Menschen zu o-Toluidin verstoffwechselt wird, wurde mit der in Abschnitt 4 beschriebenen Urinanalytik an schwach Phenmedipham-exponierten Arbeitern nachgewiesen (Schettgen et al. 2001).

Aufgrund der sehr großen Streubreite der in unterschiedlichsten Lebensmitteln gefundenen Rückstandsmengen, der saisonal, regional und persönlich unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten, etc. gestaltet es sich jedoch äußerst schwierig, die äußere Exposition für den einzelnen Menschen oder gar im Mittel für unser Kollektiv abzuschätzen. Darüber hinaus werden nicht nur die Pestizide direkt, sondern auch deren möglicherweise nicht bioverfügbaren Abbauprodukte mit der Nahrung aufgenommen. Die nicht zur Adduktbildung beitragenden, weiteren Abbauprodukte werden jedoch in der Urinanalytik unter den Bedingungen der Probenvorbereitung zu den entsprechenden Aminen hydrolysiert und ebenfalls erfasst.

Lediglich für einige Pestizide liegen abgeschätzte, tägliche Aufnahmemengen z.B. aus den US-amerikanischen Total-Diet-Studies vor (Gunderson 1995A, 1995B).

Mit diesen Daten (Tabelle 24), die aus der Rückstandbestimmung von Pestiziden in verschiedenen Lebensmitteln hochgerechnet wurden, ließe sich die Adduktkonzentration von 3-Chloranilin alleinig auf eine Rückstandsaufnahme von Chlorpropham erklären. Die aus Daten der 1980er und 1990er Jahre hochgerechneten Chlorpropham-Aufnahmemengen liegen zwar um den Faktor 8 höher, als dies die Adduktkonzentrationen erwarten ließen, der Unterschied ist aber durchaus mit den oben genannten Einschränkungen zu erklären.

## Ergebnisse und Diskussion

Im Gegensatz dazu sind die über die Total-Diet-Studies hochgerechneten Aufnahmemengen für diejenigen Pestizide, die 4-Chloranilin bzw. Dichloraniline beinhalten, zu niedrig, um die im Median gefundenen Adduktkonzentrationen hervorrufen zu können.

**Tabelle 24:** Modellhafte Abschätzung der Dosen, die zur Bildung der entsprechenden Adduktkonzentrationen täglich aufgenommen werden müssen und Vergleich mit täglichen inkorporierten Dosen, die sich aus der Aufnahme aus Nahrungsmitteln ergeben bzw. bestehenden Grenzwerten der WHO und des BgVV.

	HBI	berechnete tägliche Dosis [ng/Tag]	berechnete tägliche Dosis des 95. Perz. [ng/Tag]	tägliche Dosis aus Nahrungsmitteln* [ng/Tag]	ADI (WHO) [ng/Tag]	DTA (BgVV) [ng/Tag]
<b>Propham (Anilin)</b>	2,4	100.000	750.000	k.A.	k.A.	k.A.
<b>3CIA</b>	12,5	290	1.800	k.A.	k.A.	k.A.
<b>Chlorpropham</b>	2,9	1250	8.000	10.500	k.A.	3.550.000
<b>4CIA</b>	569	30	130	k.A.	k.A.	k.A.
<b>Monuron</b>	39	380	1.900	k.A.	1.420.000	1.420.000
<b>Monolinuron</b>	558	30	130	k.A.	k.A.	k.A.
<b>34DCIA</b>	9	140	550	k.A.	k.A.	k.A.
<b>Linuron</b>	0,8	1550	6.000	30	k.A.	640.000
<b>Diuron</b>	4,5	280	1.000	k.A.	k.A.	497.000
<b>35DCIA</b>	0,6	10.300	42.200	k.A.	k.A.	k.A.
<b>Vinclozolin</b>	0	0,0	0,0	210	710.000	355.000
<b>Iprodion</b>	0	0,0	0,0	110	4.260.000	1.420.000

\* Gunderson 1995A, 1995B; k.A. = keine Angaben in der Literatur

Betrachtet man jedoch Einzelwerte von Pestizidrückständen, die beispielsweise im Rahmen der Lebensmittelüberwachung in einzelnen Lebensmitteln regelmäßig nachgewiesen werden, so wird auch die innere Belastung mit den chlorierten Aminen plausibel.

Vinclozolinrückstände beispielsweise wurden 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). Iprodion wird ebenfalls gelegentlich in Wein mit Konzentrationen bis 300 µg/L gefunden (Avramides et al. 2003). Auch in Weintrauben werden erhebliche Rückstandsbelastungen mit Carboximid-Fungiziden, die 3,5-Dichloranilin als Strukturbestandteile beinhalten, beobachtet, die teilweise in den mg/L-Bereich reichen (Avramides et al. 2003: Vinclozolin bis 300 µg/kg; Iprodion bis 1700 µg/kg, Procymidon bis 2630 µg/kg). Weiter Ein-

## **Ergebnisse und Diskussion**

---

zeldaten können beispielsweise der Literaturstelle FDA 2003 entnommen werden, die auch über das Internet zugänglich ist.

Auch beim Protham (Anilin als Struktureinheit) werden in verschiedenen Gemüsesorten (z.B. Kartoffeln, Sellerie) Rückstandskonzentrationen bis in den mg/kg gemessen (BgVV 1998), so dass die Anilin-Belastung sicherlich teilweise auch auf die Aufnahme von Pflanzenschutzmitteln zurückzuführen ist. Ähnliches gilt auch für o- sowie m-Toluidin. Pestizide, die p-Toluidin freisetzen können, sind nicht bekannt.

Ähnliche Abschätzungen, wie sie hier mit den Daten der Hämoglobinaddukte vorgenommen wurden, können mit den ermittelten Urinausscheidungsraten wie bereits oben begründet, nur in Näherung durchzuführen.

Dennoch lässt sich mit einer angenommenen Metabolismusrate im Bereich von wenigen Prozent auch hier abschätzen, dass mit den hochgerechneten, täglichen Aufnahmemengen aus den Total Diet Studies, die 3-Chloranilin-Belastung ausschließlich aus der Aufnahme von Chlorprotham-Rückständen in Nahrungsmitteln erfolgen müsste.

### **5.5 HERP-Index**

Die beispielsweise Nagetieren täglich verabreichte Dosis eines Kanzerogens, die die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung eines Tumors auf 50% erhöht, wird  $TD_{50}$  genannt. Die Dosis beim Menschen, ausgedrückt als Prozentsatz des  $TD_{50}$  wird als sog. HERP-Index (Human Exposure/Rodent Potency) bezeichnet. Anhand dieses Indexes ist es grob möglich, das Risiko bzw. das Gefährdungspotential für die Allgemeinbevölkerung für die unterschiedlichen aromatischen Amine vergleichend einzuordnen. Die entsprechenden tierexperimentellen Daten kann man der "Carcinogenic Potency Database" (<http://potency.berkeley.edu>) der Universität von Californien, Berkeley, USA entnehmen. Benötigt wird darüber hinaus die tägliche Dosis, die über die Konzentration der Hb-Addukte bzw. über die gefundenen Urinkonzentrationen berechnet werden kann. Eingang in die Berechnung fanden die im vorherigen Abschnitt berechneten Mediane der äußeren Expositionen. Die Ergebnisse hierzu sind in Tabelle 36 dargestellt. Der  $TD_{50}$  kann sich von Spezies zu Spezies unterscheiden. In das Ranking ging, soweit vorliegend, immer der jeweilige  $TD_{50}$  der Ratte ein. Der Vergleich der einzelnen HERP-Indices zeigt beim 2-Naphtylamin (DFG-Kategorie 1 für krebserzeugende Stoffe) sowie beim o-Anisidin (DFG-Kategorie 2) für die Allgemeinbevölkerung mit Abstand das größte Gefährdungspotential. Allerdings ist einschrän-

## Ergebnisse und Diskussion

---

kend zu bemerken, dass für beide Parameter der Index entweder nur über die entsprechenden Addukt- bzw. Urinkonzentrationen berechnet werden konnte.

Anilin (Kategorie 3B) rangiert trotz seines vergleichsweise großen  $TD_{50}$  relativ weit vorn in der vergleichenden Einordnung. Dies liegt offensichtlich an den hohen Werten, die im Blut bzw. im Urin gefunden werden.

Das als Humankanzerogen (DFG-Kategorie 1) eingestufte 4ADP liegt sowohl bei Rauchern wie auch Nichtrauchern relativ weit hinten im Ranking. Der entsprechende  $TD_{50}$  ist zwar am geringsten, d.h. es hat *per se* im Tierexperiment das größte krebs-erzeugende Potential, jedoch ist der entsprechende HBI relativ hoch und die im Blut gemessenen Adduktkonzentrationen sind relativ gering.

Darüber hinaus bleibt festzustellen, dass die äußere Exposition der Personen aus der Allgemeinbevölkerung mindestens um den Faktor 44.000 (*o*-Anisidin im Urin) unter dem bei Versuchstieren ermittelten  $TD_{50}$  liegt. Zieht man jedoch in Betracht, dass es sich beim  $TD_{50}$  nicht um einen LOAEL (Lowest observed adverse effect level) handelt, dass die 95. Perzentile der Aromatischen Amine meist um den Faktor 10 über den entsprechenden Medianen liegen, sowie dass die Aromatischen Amine additiv zum Krebsrisiko beitragen können, so müssen die gefundenen Belastungen und Beanspruchungen umweltmedizinische Bedenken auslösen. Dass es sich hier um ein vergleichsweise großes umweltmedizinisches Problem handelt, wird deutlich, wenn man den entsprechenden HERP-Index vergleicht mit in Deutschland evaluierten Grenzwerten für Schadstoffe in Umweltmedien, die der gesundheitlichen Vorsorge dienen sollen. Als Beispiel können hier die Polychlorierten Biphenyle (PCB) herangezogen werden. Bei den PCB wurde ein sog. Zielwert (Sicherheitsfaktor 30.000: Abstand Zielwert zum LOAEL) und ein sog. Eingriffswert (Sicherheitsfaktor 3.000) evaluiert. Bei Luftmesswerten oberhalb des Zielwerts stehen in öffentlichen Gebäuden unter hohem finanziellen Aufwand Sanierungsarbeiten an, bei Luftmesswerten leicht unterhalb des entsprechenden Eingriffswerts wurden sogar bereits eine Schule im Süddeutschen Raum komplett abgerissen (Liebl et al. 2004, Angerer et al. 2004). Während man jedoch bei den PCB noch von einer Dosis-Wirkungs-Schwelle ausgehen kann, ist dies bei krebserregenden Stoffen nicht möglich.

Letztlich ist es jedoch immer problematisch, Ergebnisse aus Tierversuchen auf den Menschen zu übertragen. Das zeigt sich allein schon an den relativ großen Speziesunterschieden des  $TD_{50}$  (siehe Tabelle 25). Neben dem  $TD_{50}$  gingen auch der im Tierversuch ermittelte HBI sowie die Anteile unveränderter bzw. konjugierter Amine,

## Ergebnisse und Diskussion

die mit dem Urin ausgeschieden werden, in die Berechnung der HERP-Indices ein. Inwieweit die Ergebnisse des Rankings über den HERP-Index auch für den Menschen gelten können, bleibt daher fraglich. Ein Risiko beispielsweise in Form einer Odds Ratio (OR) kann aus dem HERP-Index nicht abgeleitet werden. Auch kann daraus nicht abgeleitet werden, welcher Anteil der Blasenkrebserkrankungen (jährlich 16.000 Neuerkrankungen in Deutschland) bei der beruflich nicht exponierten Allgemeinbevölkerung auf die Hintergrundexposition mit den Aromatischen Aminen zurückzuführen ist.

**Tabelle 25:** HERP-Index (R=Raucher, NR=Nichtraucher)

Substanz	TD 50	HERP R	Ranking	HERP NR	Ranking
	[mg/kg/d]	[%]	R	[%]	NR
<b>Hb-Addukte</b>					
Anilin	269 <sup>a</sup>	0,000050	3	0,000053	3
o-Toluidin	43,6 <sup>a</sup>	0,000096	2	0,000086	2
	840 <sup>b</sup>	0,000005		0,000005	
m-Toluidin	1440 <sup>b</sup>	0,000004	7	0,000003	7
p-Toluidin	83,5 <sup>b</sup>	0,000025	4	0,000015	4
4ADP (HBI =344)	0,98 <sup>a</sup>	0,000016	5	0,000004	6
4ADP (HBI=725)	0,98 <sup>a</sup>	0,000007	5	0,000002	(8)
2NA	5,74 <sup>c</sup>	0,000198	1	0,000216	1
4-Chloranilin*	7,62 <sup>a</sup>	0,000005	6	0,000005	5
<b>Urin</b>					
Anilin	269 <sup>a</sup>	0,000653	2	0,000639	2
o-Toluidin (3,6%)	43,6 <sup>a</sup>	0,000185	4	0,000075	4
	840 <sup>b</sup>	0,000096		0,000004	
o-Toluidin (21%)	43,6 <sup>a</sup>	0,000032	6	0,000013	6
	840 <sup>b</sup>	0,000002		0,000001	
o-Toluidin (5,3 %)	43,6 <sup>a</sup>	0,000126	4	0,000052	4
	840 <sup>b</sup>	0,000006		0,000003	
m-Toluidin	1440 <sup>b</sup>	0,000008	7	0,000002	7
p-Toluidin	83,5 <sup>b</sup>	0,000101	5	0,000045	5
o-Anisidin	29,7 <sup>a</sup>	0,002270	1	0,002079	1
	966 <sup>b</sup>	0,000697		0,000639	
4-Chloranilin*	7,62 <sup>a</sup>	0,000604	3	0,000604	3

<sup>a</sup> Ratte, <sup>b</sup> Maus, <sup>c</sup> Rhesus-Affe, \* keine Unterscheidung Raucher/Nichtraucher



### 6 Zusammenfassung

Eine Gruppe von besonderem Interesse aus arbeitmedizinisch- und umweltmedizinisch-toxikologischer Sicht ist die Gruppe der aromatischen Amine (AA). Aufgrund des krebserzeugenden Potentials vieler Vertreter dieser Chemikaliengruppe spielen sie offensichtlich eine große Rolle bei der chemisch induzierten Genese von Blasenkrebs. Hieran erkranken in Deutschland jährlich etwa 16.000 Menschen neu. Ebenso ist das aktive Rauchen mit einer erhöhten Blasenkrebsinzidenz assoziiert.

Der Mensch kann den AA gegenüber exponiert sein über seine Umwelt (z.B. Tabakrauch) oder auch beim Umgang mit diesen Stoffen am Arbeitsplatz (z.B. Munitionsentsorgung). Um im Rahmen der Expositionskontrolle vorhandene Belastungen bzw. Beanspruchung durch AA am Arbeitsplatz oder über die Umwelt zu ermitteln, empfiehlt sich die Methodik des Biomonitoring. Am Arbeitsplatz ist dies gar nach TRGS 150 angezeigt, aufgrund der i.d.R. guten Hautgängigkeit der AA und der auf elektrophilen Eigenschaften basierenden Mutagenität der AA. Aber auch zum Aufdecken bisher nicht bekannter Expositionen am Arbeitsplatz oder in der Umwelt ist das Biomonitoring hervorragend geeignet.

Für ein Biomonitoring der AA werden routinefähige, zuverlässige und höchst sensitive analytisch-chemische Verfahren benötigt. Es wurden daher im Rahmen dieser Studie zwei entsprechende Verfahren entwickelt, beide jeweils auf Basis von Kapillargaschromatographie und massenspektroskopischer Detektion.

Eines der Verfahren gestattet die Bestimmung von AA im Urin (Dosismonitoring) als Parameter für eine kurz zurückliegende Exposition der letzten Stunden bis Tage (kurze Eliminationshalbwertszeiten der AA). Mit dem zweiten Verfahren können die kovalenten Addukte dieser Verbindungsklasse an das menschliche Hämoglobin (Beanspruchungsmonitoring) erfasst werden. Dabei zeigen diese sog. Hb-Addukte die mittlere Beanspruchung der letzten 120 Tage (Lebensdauer Erythrozyten) an. Es steht dabei der Hb-Adduktspiegel in direkter Beziehung zu den Konzentrationen entsprechender DNA-Addukte, die als initiale Ausgangspunkte für eine chemisch induzierte Kanzerogenese angesehen werden.

Beide Verfahren gestatten die zuverlässige und spezifische Quantifizierung im arbeitmedizinisch relevanten Konzentrationsbereich wie auch im umweltmedizinisch relevanten Ultraspurenbereich. Die Verfahren erlauben bei guten bis sehr guten Zuverlässigkeitskriterien die Bestimmung einer ganzen Reihe chemisch-physikalisch unterschiedlicher Amine. Das analytische Spektrum reicht dabei von monofunktionel-

## **Zusammenfassung**

---

len, unterschiedlich substituierten, monocyclischen Aminoaromaten, über monofunktionelle, bicyclische Aromaten bis hin zu bifunktionellen zweikernigen Aminoaromaten. Bei Anwendung dieser Verfahren ist aufgrund des ubiquitären Vorhandenseins aromatischer Amine in der Umwelt der Reagenzienleerwertproblematik höchste Beachtung zu schenken.

Aus umweltmedizinischer Sicht ist es wichtig, gerade von potentiell krebserzeugenden Substanzen die Belastung und Beanspruchung der Allgemeinbevölkerung zu kennen, um Expositionsquellen erkennen und ggf. minimieren zu können.

Die deutsche Allgemeinbevölkerung ist mit einem breiten Spektrum an aromatischen Aminen belastet. Hierzu zählen Anilin, die drei isomeren Toluidine, o-Anisidin, 3- und 4-Chloranilin, 4,4- und 3,5-Dichloranilin sowie die zweikernigen aromatischen Amine 4-Aminodiphenyl und 2-Naphtylamin. Es lassen sich die genannten Amine sowohl als Ausscheidungsprodukte im Urin (Ausnahme 4ADP, 2NA), wie auch in Form ihrer Hämoglobinaddukte im Blut nachweisen. Dabei spiegeln die Konzentrationen im Urin eine kurz zurückliegende aber auch täglich schwankende Exposition (Stunden, Tage) wider, während die Addukte am Hämoglobin die durchschnittliche Exposition der letzten 4 Monate abbilden.

Die im Rahmen dieser Studie bearbeiteten Parameter wurden sowohl bei Rauchern wie auch bei Nichtrauchern gefunden. Ein Ausnahme bilden hier Benzidin, seine substituierten Analoga sowie das 4,4'-Methylenbis(2-chloranilin). Diese zweikernigen Amine als mögliche Metabolite von Azo-Farbstoffen konnten weder im Urin noch im Blut der Probanden gefunden werden.

Von denjenigen aromatischen Aminen, die in relevanten Konzentrationen im Tabakrauch enthalten sind, konnten bei den drei isomeren Toluidinen signifikante Unterschiede in den Urin-Ausscheidungsraten von Rauchern und Nichtrauchern festgestellt werden. Dies war jedoch nicht der Fall für die ebenfalls im Tabakrauch enthaltenen Amine Anilin, o-Anisidin, 4ADP sowie 2NA. Während beim Anilin und dem o-Anisidin zwischen Rauchern und Nichtrauchern keine Unterschiede bestanden, waren weder 4ADP noch 2NA (NWG: 50 bzw. 75 ng/L) in den untersuchten Urinproben zu detektieren.

Die beiden letztgenannten Parameter konnten jedoch, ebenso wie die bereits im Urin gefundenen Parameter als Hämoglobinaddukte im Blut quantifiziert werden. Dabei waren für Anilin, o-Anisidin und 2-Naphtylamin keine Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern feststellbar. Die Mediane der drei Toluidine und des 4ADP

## Zusammenfassung

---

waren im Raucherkollektiv zwar vergleichsweise erhöht, Signifikanz bei den Adduktwerten bestand jedoch nur für das 4ADP und das p-Toluidin.

Die positiven Befunde insbesondere bei den Nichtrauchern weisen also darauf hin, dass neben dem Tabakrauch weitere Quellen zur Belastung und Beanspruchung der Allgemeinbevölkerung beitragen müssen. Speziell beim Anilin, dem o-Anisidin und dem 2-Naphtylamin dürften diese Quellen sogar weit bedeutender sein als das aktive Rauchen, da sich der Raucherstatus auf Kollektivbasis nicht in den gemessenen Konzentrationen widerspiegelt.

Die Höhe der Urin- bzw. Adduktkonzentrationen der drei Toluidine sowie des 4ADP hingegen werden durch den Raucherstatus teilweise erheblich beeinflusst, wenn auch bei den Adduktwerten des o- und m-Toluidins keine Signifikanz erreicht wird. Die Gründe für die bei den Adduktwerten nicht vorhandene Signifikanz dürften vielschichtig sein. Zum einen ist bei den Urinproben aufgrund der Probenahme (12h Tagesurin) der Anteil des Rauchens im Vergleich zu den restlichen Quellen (Atemluft, Nahrung, etc.) überrepräsentiert (siehe auch Abschnitt 5.2). Zum anderen dürfte der Polymorphismus der *N*-Acetyltransferasen zusätzlich eine gewichtige Rolle spielen (siehe Abschnitt 3.3). Bei gleicher innerer Exposition (Biological Monitoring im Urin) bilden langsame Acetylierer einen vergleichsweise höheren Adduktspiegel (Biological Effect Monitoring im Blut) als schnelle Acetylierer. Das bedeutet, dass sich die Streuung gebildeter Adduktkonzentrationen in Abhängigkeit vom Acetyliererstatus sowohl in der Gruppe der Raucher wie auch in der Gruppe der Nichtraucher in gewissem Maß vergrößert, die Bereiche sozusagen unschärfer werden.

Der NAT2-Polymorphismus hat unter der Annahme, dass sich im Raucher- wie auch Nichtraucherkollektiv schnelle und langsame Acetylierer gleich verteilen, zwar einen leichten Einfluss auf die Höhe der Mediane, nicht jedoch auf die Differenz beider Addukt-Mediane. Über den HBI von Ratten und den ermittelten Adduktmedianen lassen sich daher die Inkremente einer aktiven Tabakrauchbelastung an der Gesamtbelastung auf Basis der Kollektive abschätzen. Dabei zeigt sich auch, dass der HBI der Ratte (Wistar-Ratten) scheinbar nahezu identisch ist mit dem durchschnittlichen HBI unseres Kollektivs (schnelle und langsame Acetylierer).

Bis auf Ausreißer (ca. 10 %) ist die Belastung mit 4ADP nahezu ausschließlich auf eine aktive bzw. passive Tabakrauchbelastung zurückzuführen. Im Falle des p-Toluidins stammen bei Rauchern etwa 40 % aus einer entsprechenden Exposition. Beim o- und m-Toluidin liegen die vom aktiven Tabakrauchen herrührenden Expositi-

## **Zusammenfassung**

---

onen bei 11 bzw. 19%. Bei Anilin, o-Anisidin und 2-Naphtylamin lassen sich solche Abschätzungen nicht durchführen, da hier die entsprechenden Hb-Addukt-Mediane des Nichtraucherkollektivs sogar höher liegen als die des Raucherkollektivs.

Diese Ergebnisse bedeutet aber auch, dass andere Quellen erheblich zur Gesamtbelastung mit den verschiedensten Aminen beitragen müssen. Hier spielt sicherlich die Kontamination der Luft in Innenräumen wie auch der Außenluft eine gewisse Rolle. Zumindest bei der Innenraumluft kann davon ausgegangen werden, dass Sie teilweise durch Tabakrauch mit den entsprechenden Aminen verunreinigt ist.

Ein Hinweis auf eine weitere dieser Expositions-Quellen war durch die Betrachtung der Hb-Addukte von chlorierten Anilinen zugänglich. Diese Amine werden in der Regel nicht im Tabakrauch gefunden, wohl aber sind sie als Struktureinheiten in verschiedenen, und in relevanten Mengen ausgebrachten Pestiziden enthalten. Vergleicht man auch hier die zur Bildung der Addukte berechneten, notwendigen äußeren Expositionen mit Werten wie sie bei Rückstandsmessungen in Lebensmitteln gefunden werden, so kann man ableiten, dass dieser Expositionspfad eine außerordentlich große Rolle spielen muss. Die Ausscheidung im Urin bzw. der Adduktspiegel des 3,5-Dichloranilins, ein Metabolit verschiedener Dicarboximid-Fungizide, war sowohl statistisch signifikant mit dem täglichen Konsum von Wein wie auch Kräutertee assoziiert. Im Fall des 3-Chloranilins bzw. des entsprechenden Mutterpestizids Chlorpropham ließ sich darüber hinaus die gesamte in der Allgemeinbevölkerung gefundene Adduktkonzentration rechnerisch auf eine Aufnahme aus Rückständen in Nahrungsmitteln zurückführen. Ähnliches ist auch für andere Pestizide, die chlorierte Aniline als Struktureinheiten beinhalten, aus Pestizidrückstandsdaten abzuschätzen. Dies wiederum lässt aber auch vermuten, dass ein weiterer Teil der Gesamtbelastung auch an Anilin, sowie an o- und m-Toluidin (auch im Tabakrauch) aus entsprechenden Pestizidrückständen stammen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte so gezeigt werden, dass die Exposition der Allgemeinbevölkerung mit aromatischen Aminen aus verschiedensten Quellen herrührt, die Umwelt allgemein also weit verbreitet mit einer Vielzahl aromatischer Amine bzw. ihrer Vorläufersubstanzen kontaminiert ist. Das Biochemical Effektmonitoring (Hb-Addukte im Blut) hat sich dabei ebenso wie das Biological Monitoring (Dosismonitoring Amine im Urin) als äußerst wertvolles Werkzeug zur Feststellung von Belastungen aus umweltbedingten Expositionen gezeigt und erlaubte gleichzeitig zumindest in Teilen auch eine qualitative wie quantitative Quellenaufklärung. Eine Abschätzung

## **Zusammenfassung**

---

der Exposition des Menschen alleinig über das Ambient Monitoring führt andererseits oftmals zu einer (Über- oder) Unterschätzung einer Exposition bzw. Expositionsquelle und muss zwangsläufig dann in die Irre führen, wenn verschiedenste Quellen und unterschiedliche Aufnahmepfade an der Gesamtbelastung beteiligt sind.

Abschließend bleibt zu bemerken, dass die Höhe der in dieser Arbeit bei der Allgemeinbevölkerung festgestellten inneren Belastung an Aminoaromaten nicht als unbedenklich angesehen werden kann. Es ist vielmehr von einer gleichgerichteten, additiven Wirkung dieser Verbindungen auszugehen, wenn auch aus der Höhe der gefundenen Adduktkonzentration nicht auf ein Krebsrisiko rückgeschlossen werden kann. Unabdingbar notwendig erscheint es daher, Quellen und Aufnahmewege für diese Belastung weiter aufzuklären, um gegebenenfalls zu einer Reduktion der inneren Belastung gelangen zu können.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die innere Belastung an Aminoaromaten nicht alleinig auf das passive oder aktive Rauchen zurückzuführen ist. Zu weiteren möglichen zivilisatorisch bedingten Quellen, über die der Mensch mit aromatischen Nitro- und Aminoverbindungen exponiert sein kann, zählen beispielsweise Pharmazeutika, Pestizide, Farbstoffe und Kosmetika.

Notwendig ist darüber hinaus die Abschätzung eines mit dieser Belastung einhergehenden Krebsrisikos der Allgemeinbevölkerung. Wenn man bedenkt, dass Raucher ein deutlich höheres Risiko besitzen, an einem Blasenkrebs zu erkranken, muss das 4ADP in der Reihe der hier untersuchten Amine bei weitem den größten Anteil dazu beitragen. Das darüber hinaus im Verdacht stehende 2NA kann die höhere Odds-ratio bei Rauchern (Risikoverdopplung (OR=2) bei ca. 15 pack years; Pesch et al. 2002) nicht erklären, da dessen Hb-Adduktkonzentrationen als Maß einer effektiven Dosis bei Rauchern wie bei Nichtrauchern in gleicher Höhe zu finden ist. Allerdings ist vor diesem Hintergrund einschränkend zu beachten, dass der Blasenkrebs eine Erkrankung des höheren Alters ist, und die Verhältnisse zu früheren Zeiten andere gewesen sein könnten (Amingehalt in Tabaken früherer Zeiten). Darüber hinaus können andere Stoffe im Tabakrauch wie z.B. Nitrosamine einen Anteil haben am erhöhten Blasenkrebsrisiko von Rauchern.

### 7 Literatur

- Airoidi L, Orsi F, Magagnotti C, Coda R, Randone D, Casetta G, Peluso M, Hautefeuille A, Malaveille C, Vineis P: Determinants of 4-aminobiphenyl-DNA adducts in bladder cancer biopsies. *Carcinogenesis* 23(5), 861-866 (2002)
- Albrecht W, Neumann HG: Biomonitoring of aniline and nitrobenzene. Hemoglobin binding in rats and analysis of adducts. *Arch Toxicol* 57(1), 1-5 (1985)
- Angerer J (Hrsg.): *Biological Monitoring – Heutige und künftige Möglichkeiten in der Arbeits- und Umweltmedizin*. Wiley-VCH (2001)
- Angerer J, Bolt HM, Brüning T, Drexler H, Ewers U, Gieler U, Greim H, Hallier E, Letzel S, Mersch-Sundermann VH, Neuberger M, Nowak d und Rüdiger HW: Über das Biological Monitoring, den Unwillen Gesundheitsrisiken rational abzuschätzen und die Lust an radikalen Maßnahmen. *Umweltmed Forsch Prax* 2, 61-64 (2004)
- Angerer J, Lehnert G, Mannschreck C, Peters M: o-Nitrophenol-Ausscheidung von akzidentiell belasteten und unbelasteten Kindern. *Verhandlungen der DGAUM*. 34. Jahrestagung, Gentner-Verlag Stuttgart, 117-121 (1994)
- Angerer J, Lewalter J, Neumann HG, Schaller KH: Aromatic Amines. In: Angerer J, Schaller KH: *Analysis of Hazardous Substances in Biological Materials*. Vol. 1, Wiley-VCH (1985)
- Angerer J, Weismantel A: Biological monitoring of dinitrotoluene by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of 2,4-dinitrobenzoic acid in human urine. *J Chrom B* 713, 313-322 (1998)
- Arnold (Hrsg): *Abschlußbericht zum bundesweiten Monitoring zur Ermittlung der Belastung von Lebensmitteln mit Rückständen und Verunreinigungen*. ZEBS beim BGA Berlin (1993)
- Asche W, Richard HP: *Chemische Rundschau* 45, 1 (1994)
- Avramides EJ, Lentza-Rizos C, Mojasevic M: Determination of pesticide residues in wine using gas chromatography with nitrogen-phosphorus and electron capture detection. *Food Addit Contam* 20(8), 699-706 (2003)
- Bader, M., Th. Kraus, S. Letzel, J. Müller, M. Weihrauch, J. Angerer: Biomonitoring von Nitrotoluolen und deren Metaboliten im Harn als Parameter einer Belastung durch Sprengstoffkomponenten. In: *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V.* (Hrsg.: E. Münzberger). Druckerei Rindt, Fulda 219-223 (1996)
- Beach A, Gupta R: Human biomonitoring and the <sup>32</sup>P-Postlabeling assay. *Carcinogenesis* 13, 1053-1074 (1992)
- Beyerbach A, Sabbioni G: Biomonitoring of arylamines: hemoglobin adducts of aniline derivatives. *Biomarkers* 4(3), 229-236 (1998)
- BgVV: *Bekanntmachung des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin*. *Bundesgesundhbl* 44 (11), 1130-1137 (2001)
- Bieger WP, Knabenschuh B: *Biotransformation von Schadstoffen und Pharmaka*. Gen-Tox-Datenbank Vers. 1, Milab GmbH München (2001)
- Birner G, Neumann HG: Biomonitoring of aromatic amines II: Hemoglobin binding of some monocyclic aromatic amines. *Arch Toxicol* 62(2-3), 110-115 (1988)

## Literatur

---

- Blaszkwicz M, Dannappel D, Thier R, Lewalter J: N-Acetyltransferase 2 (genotyping). In: Angerer J, Müller M: Analysis of Hazardous Substances in Biological Materials. Vol. 9, Wiley-VCH Weinheim (2004)
- Blaszkwicz M: N-Acetyltransferase 2 (phenotyping: caffeine test). In: Angerer J, Müller M: Analysis of Hazardous Substances in Biological Materials. Vol. 9, Wiley-VCH Weinheim (2004)
- Bolm-Audorf U: Lungenkrebs durch Passivrauchen - Die Evidenz wächst. Zentralbl Arbeitsmed 42, 54-66 (1992)
- Branner B, Kutzer C, Zwickenpflug W, Scherer G, Heller W-D, Richter E: Haemoglobin adducts from aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines in pregnant smoking and nonsmoking women. Biomarkers 3, 35-47 (1998)
- Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P: Cigarette smoking and bladder cancer in man: a pooled analysis of 11 case-control studies. Int J Cancer 86, 289-294 (2000)
- Bryant MS, Skipper PL, Tannenbaum SR, Maclure M: Hemoglobin adducts of 4-aminobiphenyl in smokers and nonsmokers. Cancer Res. 47(2), 602-608 (1987)
- Bryant MS, Vineis P, Skipper PL, Tannenbaum SR: Haemoglobin adducts of aromatic amines in people exposed to cigarette smoke. IARC Sci. Publ. B89, 133-136 (1988A)
- Bryant MS, Vineis P, Skipper PL, Tannenbaum SR: Hemoglobin adducts of aromatic amines: associations with smoking status and type of tobacco. Proc Natl Acad Sci U S A 85(24), 9788-9791 (1988B)
- Bundesminister für Arbeit und Sozialordnung: TRGS 150 Unmittelbarer Hautkontakt. BArl 6, 31 (1996)
- Bundesminister für Arbeit und Sozialordnung: TRGS 710 Biomonitoring. BArl 2, 60(2000)
- Cheever KL, Richards DE, Plotnick HB: Metabolism of ortho-, meta-, and para-toluidine in the adult male rat. Toxicol Appl Pharmacol 56(3), 361-369 (1980)
- Chemische Landesuntersuchungsanstalt Freiburg: Jahresberichte 1986 – 1990 der Chemischen Untersuchungsanstalt Freiburg (1990)
- Chism JP, Rickert DE: Isomer- and sex-specific bioactivation of mononitrotoluenes. Role of enterohepatic circulation. Drug Metab Dispos 13(6), 651-657 (1985)
- Culp SJ, Roberts DW, Talaska G, Lang NP, Fu PP, Lay JO Jr, Teitel CH, Snawder JE, Von Tungeln LS, Kadlubar FF: Immunochemical, <sup>32</sup>P-postlabeling, and GC/MS detection of 4-aminobiphenyl-DNA adducts in human peripheral lung in relation to metabolic activation pathways involving pulmonary N-oxidation, conjugation, and peroxidation. Mutat Res 378(1-2), 97-112 (1997)
- Dallinga JW, Pachen DM, Wijnhoven SW, Breedijk A, van 't Veer L, Wigbout G, van Zandwijk N, Maas LM, van Agen E, Kleinjans JC, van Schooten FJ: The use of 4-aminobiphenyl hemoglobin adducts and aromatic DNA adducts in lymphocytes of smokers as biomarkers of exposure. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 7(7), 571-577 (1998)
- DeBruin LS, Pawliszyn JB, Josephy PD: Detection of monocyclic aromatic amines, possible mammary carcinogens, in human milk. Chem Res Toxicol 12(1), 78-82 (1999)

## Literatur

---

- Del Santo P, Moneti G, Salvadori M, Saltutti C, Delle Rose A, Dolara P: Levels of the adducts of 4-aminobiphenyl to hemoglobin in control subjects and bladder carcinoma patients. *Cancer Lett* 60(3), 245-251 (1991)
- DFG, Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe: MAK- und BAT-Werte-Liste. 39. Lieferung, Wiley-VCH Weinheim (2003)
- Doerge DR, Churchwell MI, Marques MM, Beland FA: Quantitative analysis of 4-aminobiphenyl-C8-deoxyguanosyl DNA adducts produced in vitro and in vivo using HPLC-ES-MS. *Carcinogenesis* 20(6), 1055-1061 (1999)
- Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I: Mortality in relation to smoking: 40 years observation on male British doctors. *BMJ* 309 (6959), 901-911 (1994)
- Ehrenberg L, Hiesche KD, Ostermann-Golkar S, Wennberg I: Evaluation of the genetic risks of alkylating agents: tissue doses in the mouse from air contaminated with ethylene oxide. *Mutat Res* 24, 83-103 (1974)
- Eichhorn U, Weiss T, Gonzalez-Reche LM, Rossbach B, Angerer J: Automated online HPLC-method for the determination of cotinine: differentiation between smokers, passive smokers and non-smokers. *J. Chromatogr. B Biomedical Appl.* (eingereicht) (2004)
- Falter B, Kutzer C, Richter E: Biomonitoring of hemoglobin adducts: aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines. *Clin Investig* 72(5), 364-371 (1994)
- FDA: Food and Drug Administration - Total Diet Study - Summary of Residues Found Ordered by Pesticide - Market Baskets 91-3 - 01-4, FDA Juni 2003 (<http://www.cfsan.fda.gov/~acrobat/TDS1byps.pdf>) (2003)
- Forehand JB, Dooly GL, Moldoveanu SC: Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, phenols and aromatic amines in particulate phase cigarette smoke using simultaneous distillation and extraction as a sole sample clean-up step. *J Chromatogr A* 898(1), 111-124 (2000)
- Grimmer G, Dettbarn G, Seidel A, Jacob J: Detection of carcinogenic aromatic amines in the urine of non-smokers. *Sci Total Environ* 247(1), 81-90 (2000)
- Gunderson EL: Dietary intake of pesticides, selected elements and other chemicals. *J AOAC int.* 78, 910-921 (1995A)
- Gunderson EL: FDA Total Diet Study, July 1986-April 1991, Dietary intake of pesticides, selected elements and other chemicals. *J AOAC int.* 78, 1353-1363 (1995B)
- Hagmann M, Weiß T, Schaller KH, Gebauer J, Angerer J: Untersuchungen zur Belastung und Beanspruchung bei der Entsorgung von Explosivstoffaltlasten in den Munitionszzerlegebetrieben (MZB) des Staatlichen Kampfmittelräumdienstes in NRW. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed*, in Vorbereitung (2004)
- Hansen AM, Omland O, Poulsen OM, Sherson D, Sigsgaard T, Christensen JM, Overgaard E: Correlation between work process-related exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and urinary levels of alpha-naphthol, beta-naphthylamine and 1-hydroxypyrene in iron foundry workers. *Int Arch Occup Environ Health* 65(6), 385-94 (1994)
- Hansen AM, Poulsen OM, Christensen JM, Hansen SH: Determination of 2-Naphthylamine in urine by a novel reversed-phase high-performance liquid chromatography method. *J Chromatogr* 578(1), 85-90 (1992)



## Literatur

---

- Heudorf U, Peters M: Human biomonitoring after a severe chemical accident - results of a study after the Hoechst AG chemical spill 22 February 1993. *Gesundheitswesen* 56(10), 558-562 (1994)
- Hill RH, Head SL, Baker S, Rubin C, Esteban E, Bailey SL, Shealy DB, Needham LL: The use of reference range concentrations in environmental health investigations. In: American Chemical Society (Hrsg.): *Proceedings in field applications of biomarkers for agrochemicals and toxic substances*, Washington (1996)
- Hoffmann D, Wynder EL: Aktives und passives Rauchen. In: Marquardt H, Schäfer SG: *Lehrbuch der Toxikologie*. BI Wissenschaftsverlag Mannheim (1994)
- IARC (International Agency on Research of Cancer) Monographie Vol. 75: Ionizing radiation, Lyon (2000)
- Industrieverband Agrar e.V: Persönliche Mitteilung (1999)
- Kao J, Faulkner J, Bridges JW: Metabolism of aniline in rats, pigs and sheep. *Drug Metab Dispos* 6(5), 549-555 (1978)
- Keller R, Krebs H, Hornung R: Schweizerische Umfrage zum Tabakkonsum 2001/2002. *Psychologisches Institut Universität Zürich* (2003)
- Kiese M, Lenk W: Metabolites of 4-chloroaniline and chloroacetanilides produced by rabbits and pigs. *Biochem Pharmacol* 20(2), 379-391 (1971)
- Koc H, Swenberg JA: Applications of mass spectrometry for quantitation of DNA Adducts. *J Chrom B* 778, 323-343 (2002)
- Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes: Konzept der Referenz- und Human-Biomonitoring-Werte (HBM) in der Umwelt. *Bundesgesundhbl* 6, 221-224 (1996)
- Kulkarni B, Fiala ES, Weisburger JH: Estimation of *N*-hydroxy-*o*-toluidine, a urinary metabolite of *o*-toluidine and *o*-nitrosotoluene, by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Carcinogenesis* 4(10), 1275-1279 (1983)
- Levy GN, Weber WW: Arylamine Acetyltransferases. In: Ioannides C (Hrsg.): *Enzyme Systems that metabolise drugs and other xenobiotics*. Wiley, New York, Weinheim, 441-457 (2002)
- Lewalter J und Biedermann P: Aromatic Amines. In: Angerer J, Schaller KH: *Analysis of Hazardous Substances in Biological Materials*. Vol. 4, Wiley-VCH (1994)
- Lewalter J, Bussmann R, Popp W, Norporth K: Bewertung der Zuverlässigkeit verschiedener Methoden zur Bestimmung des individuellen Acetylierer-Status. In: Kreutz R und Piekarski C (Hrsg.): *Verh Dtsch Ges Arbeitsmed* 32, 420-425 (1992)
- Lewalter J, Gries W: Haemoglobin adducts of aromatic amines. In: Angerer J, Schaller KH: *Analysis of Hazardous Substances in Biological Materials*, Vol. 7, Wiley-VCH, 191-219 (2001)
- Lewalter J, Gries W: Hämoglobinaddukte aromatischer Amine. In: Greim H: *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe: Analysen in biologischem Material*, Loseblattsammlung, Lieferung 15, Wiley-VCH (2000)
- Lewalter J, Korallus U: Blood protein conjugates and acetylation of aromatic amines. New findings on biological monitoring. *Int Arch Occup Environ Health* 56(3), 179-96 (1985)

## Literatur

---

- Lewalter J, Neumann HG: Biologische Arbeitsstoff-Toleranzwerte (Biomonitoring), Teil XII: Die Bedeutung der individuellen Empfindlichkeit beim Biomonitoring. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 33, 352-364 (1998)
- Lewalter J, Neumann HG: Biologische Arbeitstoff-Toleranzwerte (Biomonitoring), Teil VII: Hintergrundbelastung bei beruflich nicht exponierten Personen. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 31, 275-280 (1996)
- Lewalter J: 2-Naphtylamin. In: DFG: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen, 7. Lieferung, Wiley-VCH, Weinheim (1994)
- Liebl B, Schettgen t, Kerscher G, Broding HC, Otto A, Angerer J, Drexler H: Evidence for increased internal exposure to lower chlorinated polychlorinated biphenyls (PCB) in pupils attending a contaminated school. *Int J Hyg Environ Health* 207 (4), 315-324 (2004)
- Lowry LK: Role of Biomarkers of exposure in the assessment of health risks. *Tox Lett* 77, 31-38 (1995)
- Luceri F, Pieraccini G, Moneti G, Dolara P: Primary aromatic amines from side-stream cigarette smoke are common contaminants of indoor air. *Toxicol Ind Health* 9(3), 405-413 (1993)
- Lutz WK, Maisch MG: The Detection of DNA Adducts in Biological Monitoring. In Angerer J, Weiss T (Hrsg.): *Biological Monitoring – Prospects in Occupational and Environmental Medicine*. Wiley-VCH (2003)
- Miller EC, Miller JA: Mechanism of chemical carcinogenesis: nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. *Pharmacol Rev* 18, 805-833 (1966)
- Miller MJ, Sipes IG, Perry DF, Carter DE: Pharmacokinetics of o-nitroanisole in Fischer 344 rats. *Drug Metab Dispos* 13(5), 527-531 (1985)
- Mitchel KR, Warshawsky D: Xenobiotic inducible regions of the human arylamine N-Acetyltransferase 1 and 2 genes. *Toxicol. Letters* 139(1), 11-23 (2003)
- Mooney LA, Santella RM, Covey L, Jeffrey AM, Bigbee W, Randall MC, Cooper TB, Ottman R, Tsai WY, Wazneh L: Decline of DNA damage and other biomarkers in peripheral blood following smoking cessation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4(6), 627-634 (1995)
- Morrison AS, Burning JE, Verhoek WG: Coffe drinking and cancer of the lower urinary tract. *J Natl Cancer Inst* 12; 91-94 (1982)
- Neumann HG, Birner G, Kowallik P, Schütze D, Zwirner-Baier I: Hemoglobin adducts of *N*-substituted aryl compounds in exposure control and risk assessment. *Environ Health Perspect* 99, 65-70 (1993)
- Neumann HG, van Dorp C, Zwirner-Baier I: 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 (1995)
- Neumann HG: Analysis of hemoglobin as a dose monitor for alkylating and arylating agents. *Arch Toxicol* 56, 1-6 (1984)
- Neumann HG: Exposure control versus risk assessment: lessons from the study of genotoxic *N*-substituted arenes. In: Skipper PL, Groopman JD (Hrsg.): *Molecular Dosimetry of Human Cancer; Epidemiological Analytical and Social Considerations*. CRC Press Boca Raton, Florida, 27-52 (1991)

## Literatur

---

- Neumann HG: Haemoglobin binding in control of exposure to and risk assessment of aromatic amines: In: Bartsch, Meminki, O'Neill (Hrsg.): Methods for detecting DNA damaging agents in humans: application in cancer epidemiology and prevention. IARC Scientific Publications 89, 157-165 (1988)
- Neumann H-G: Protein-Addukte als biochemische Effekt-Marker für ein biologisches Monitoring. Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed 35, 351-356 (2000)
- Otteneder M, Lutz WK: Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts. Mutat Res 424, 237-247 (1999)
- Palmiotto G, Pieraccini G, Moneti G, Dolara P: Determination of the levels of aromatic amines in indoor and outdoor air in Italy. Chemosphere 43(3), 355-361 (2001)
- Pastorelli R, Catenacci G, Guanci M, Fanelli R, Valoti E, Minoia C, Airoidi L: 3,4-Dichloroanilinhaemoglobin adducts in humans: preliminary data on agricultural workers exposed to propa-nil. Biomarkers 3(3), 227-233 (1998).
- Patrianakos C, Hoffmann D: Chemical studies on tobacco smoke. J Anal Toxicol 3, 150-154 (1979)
- Perez HL, Segerback D, Osterman-Golkar S: Adducts of acrylonitrile with hemoglobin in nonsmokers and in participants in a smoking cessation program. Chem Res Toxicol 12(10), 869-873 (1999)
- Pinorini-Godly MT, Myers SR: HPLC and GC/MS determination of 4-aminobiphenyl haemoglobin adducts in fetuses exposed to the tobacco smoke carcinogen in utero. Toxicology 107(3), 209-217 (1996)
- Popp W, Brüning T, Straif K: Krebserkrankungen durch den Beruf. Deutsches Ärzteblatt 100 (1-2), A35-A40 (2003)
- Richter E, Rösle S, Scherer G, Gostomzyk JG, Grubl A, Kramer U, Behrendt H: Haemoglobin adducts from aromatic amines in children in relation to area of residence and exposure to environmental tobacco smoke. Int Arch Occup Environ Health 74(6), 421-428 (2001)
- Rickert DE, Long RM: Metabolism and excretion of 2,4-dinitrotoluene in male and female Fischer 344 rats after different doses. Drug Metab Dispos 9(3), 226-232 (1981)
- Riffelmann M, Müller G, Schmieding W, Popp W, Norpoth K: Biomonitoring of urinary aromatic amines and arylamine hemoglobin adducts in exposed workers and non-exposed control persons. Int Arch Occup Environ Health 68(1), 36-43 (1995)
- Ringe D, Turesky RJ, Skipper PL, Tannenbaum SR: Structure of the single stable hemoglobin adduct formed by 4-aminobiphenyl in vivo. Chem Res Toxicol 1, 22-24 (1988)
- RKI (Robert-Koch-Institut in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (Hrsg.)): Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken (2002)
- Ross R, Yuan JM, Yu MC, Wogan GN, Qian GS, Tu JT, Groopman JD, Gao YT, Henderson BE: Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. Lancet 339, 943-946 (1992)
- Sabbioni G, Neumann HG: Biomonitoring of arylamines: hemoglobin adducts of urea and carbamate pesticides. Carcinogenesis 11(1), 111-115 (1990)
- Sabbioni G, Schütze D: Hemoglobin binding of bicyclic aromatic amines. Chem Res Toxicol 11(5), 471-483 (1998)

## Literatur

---

- Sabbioni G, Wei J, Liu YY: Determination of hemoglobin adducts in workers exposed to 2,4,6-trinitrotoluene. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 682(2), 243-248 (1996)
- Sabbioni G: Hemoglobin binding of arylamines and nitroarenes: molecular dosimetry and quantitative structure-activity relationships. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 6, 61-67 (1994A)
- Sabbioni G: Hemoglobin binding of nitroarenes and quantitative structure-activity relationships. *Chem Res Toxicol* 7(2), 267-274 (1994B)
- Schäffler G, Betz C, Richter E: Mass spectrometric analysis of tobacco-specific hemoglobin adducts. *Environ Health Perspect* 99, 187-189 (1993)
- Schettgen T, Broding HC, Angerer J, Drexler H: Hemoglobin adducts of ethylene oxide, propylene oxide, acrylonitrile and acrylamide-biomarkers in occupational and environmental medicine. *Toxicol Lett* 134(1-3), 65-70 (2002)
- Schettgen T, Weiss T, Angerer J: Biological monitoring of phenmedipham: determination of *m*-toluidine in urine. *Arch Toxicol* 75(3), 145-149 (2001)
- Schottenfeld D, Fraumeni JF (Hrsg): *Cancer epidemiology and prevention*. 2nd Ed. Oxford University press (1996)
- Schütze D, Sepai O, Lewalter J, Miksche L, Henschler D, Sabbioni G: Biomonitoring of workers exposed to 4,4'-methylenedianiline or 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate. *Carcinogenesis* 16(3), 573-582 (1995)
- Seidel A, Grimmer G, Dettbarn G, Jacob J: Nachweis von kanzerogenen aromatischen Aminen im Harn von Nichtrauchern. *Umweltmed Forsch Prax* 6 (4), 213-220 (2001)
- Shuker DEG: The enemy at the gates? DNA adducts as biomarkers of exposure to exogenous and endogenous genotoxic agents. *Toxicol Letters* 134, 51-56 (2002)
- Skipper PL, Tannenbaum SR: Protein adducts in the molecular dosimetry of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 11 (4), 507-518 (1990)
- Smith CJ, Dooly GL, Moldoveanu SC: New technique using solid-phase extraction for the analysis of aromatic amines in mainstream cigarette smoke. *J Chromatogr A.* 991(1), 99-107 (2003)
- Son OS, Everett DW, Fiala ES: Metabolism of *o*-[methyl-<sup>14</sup>C]toluidine in the F344 rat. *Xenobiotica* 10(7-8), 457-468 (1980)
- Stabbert R, Schäfer KH, Biefel C, Rustemeier K: Analysis of aromatic amines in cigarette smoke. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 17(18), 2125-2132 (2003)
- Stillwell WG, Bryant MS, Wishnok JS: GC/MS analysis of biologically important aromatic amines. Application to human dosimetry. *Biomed Environ Mass Spectrom* 14(5), 221-7 (1987)
- Suzuki J, Meguro S, Morita O, Hirayama S, Suzuki S: Comparison of in vivo binding of aromatic nitro and amino compounds to rat hemoglobin. *Biochem Pharmacol* 38(20), 3511-3519 (1989)
- 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* 65, 115-118 (1993)
- Tornqvist M, Landin HH: Hemoglobin adducts for in vivo dose monitoring and cancer risk estimation. *J Occup Environ Med* 37(9), 1077-1085 (1995)

## Literatur

---

- Turesky RJ, Freeman JP, Holland RD, Nestorick DM, Miller DW, Ratnasinghe DL, Kadlubar FF: Identification of aminobiphenyl derivatives in commercial hair dyes. *Chem Res Toxicol* 16(9), 1162-1173 (2003)
- Vaughan GT, Kenyon RS: Monitoring for occupational exposure to 4,4'-methylenebis(2-chloroaniline) by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of haemoglobin adducts, blood, plasma and urine. *J Chromatogr B Biomed Appl* 678(2), 197-204 (1996)
- Vineis P, Pirastu R: Aromatic amines and cancer. *Cancer Causes Control* 8, 346-355 (1997)
- Wang JS, Groopman JD: DNA damage by mycotoxins. *Mutat Res* 424, 167-181 (1999)
- Ward EM, Sabbioni G, DeBord DG, Teass AW, Brown KK, Talaska GG, Roberts DR, Ruder AM, Streicher RP: Monitoring of aromatic amine exposure in workers at a chemical plant with a known bladder cancer Excess. *J Natl Cancer Inst.* 88 (15), 10046 - 1052 (1996)
- Weiss T, Angerer J: Simultaneous determination of various aromatic amines and metabolites of aromatic nitro compounds in urine for low level exposure using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 778, Special Issue, 179-192 (2002)
- Weiß T, Ewers U, Flieger A, Angerer J: Innere Belastung der Allgemeinbevölkerung mit Amino- und Nitroaromatischen Verbindungen. *Umweltmed Forsch Prax* 5(2), 101-106 (2000)
- Weston A, Caporaso NE, Taghizadeh K, Hoover RN, Tannenbaum SR, Skipper PL, Resau JH, Trump BF, Harris CC: Measurement of 4-aminobiphenyl-hemoglobin adducts in lung cancer cases and controls. *Cancer Res* 51(19), 5219-5223 (1991)
- Will W: Determination of vinclozolin metabolites in human urine by HPLC and electrochemical detection. *Fresenius J Anal Chem* 353, 215-218 (1995)
- Will W: Vinclozolin als 3,5-Dichloroanilin. In: Greim H. (Hrsg): *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe: Analysen in biologischem Material, Loseblattsammlung 16. Lieferung, Wiley-VCH* (2000)
- Will W: Vinclozolin as 3,5-dichloroaniline. In: Angerer J, Schaller KH (Hrsg.): *Analysis of Hazardous Substances in Biological Materials, Vol. 7, Wiley-VCH* (2001)
- Wittke K, Hajimiragha H, Dunemann L, Begerow J: Determination of dichloroanilines in human urine by GC-MS, GC-MS-MS, and GC-ECD as markers of low-level pesticide exposure. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 5, 755(1-2), 215-228 (2001)
- Wittke K: Bestimmung von Markern nicht-persistenter Pflanzenschutzmittel und polyzyklischer Kohlenwasserstoffe in Körperflüssigkeiten umweltbelasteter Personen. *Dissertation Technische Universität Clausthal* (2001)
- Woollen BH, Hall MG, Craig R, Steel GT: Trinitrotoluene: assessment of occupational absorption during manufacture of explosives. *Br J Ind Med* 43(7), 465-473 (1986)
- Zhu J, Aikawa B: Determination of aniline and related mono-aromatic amines in indoor air in selected Canadian residences by a modified thermal desorption GC/MS method. *Environ Int* 30(2), 135-143 (2004)
- Zielhuis RL: Recent and potential advances applicable to the protection of workers health- biological monitoring II. In: Berlin A, Yodaiken RE, Henman BA. (Hrsg.): *Assessment of Toxic Agents at the Workplace- Roles of Ambient and Biological Monitoring. Martinus Nijhoff Publishers, Boston* (1984)

## **Literatur**

---

Zwirner-Baier I, Kordowich FJ, Neumann HG: Hydrolyzable hemoglobin adducts of polyfunctional monocyclic *N*-substituted arenes as dosimeters of exposure and markers of metabolism. *Environ Health Perspect.* 102 Suppl 6, 43-45 (1994)

# 8 Anhang

## 8.1 Expositionskontrolle

Die Arbeits- und Umweltmedizin hat vornehmlich die Aufgabe der gesundheitlichen Prävention von Arbeitnehmern am Arbeitsplatz bzw. von beruflich unbelasteten, aber über die Umwelt Schadstoff-exponierten Menschen. Um diese Aufgabe zu erfüllen, bedient sich die Arbeits- und Umweltmedizin verschiedener Strategien zur Expositions-kontrolle.

Im Bereich der arbeits- und umweltmedizinischen Toxikologie stellt das Biological Monitoring (neben dem Ambient Monitoring) eine Maßnahme der Individualprävention dar, bei der das Ausmaß der Schadstoffbelastung des Menschen und der daraus resultierenden gesundheitlichen Beanspruchung abgeschätzt wird (Zielhuis 1980; Angerer & Gündel 1996; Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes 1996; Schaller & Angerer 1998).

Beim Biological Monitoring unterscheidet man heute zwischen dem Dosismonitoring, dem Biochemischen Effekt Monitoring und dem Biologischen Effektmonitoring. Das Dosismonitoring befasst sich mit der Bestimmung der Schadstoffe bzw. ihrer Metaboliten in Körperflüssigkeiten. Als biochemisches Effektmonitoring wird die Quantifizierung von Reaktionsprodukten mutagener Substanzen mit der Erbsubstanz bezeichnet. Als Surrogat für die DNA werden dabei Proteine bzw. deren Addukte mit mutagenen Substanzen betrachtet. Von einem biologischen Effektmonitoring sprechen wir, wenn erste Reaktionen des Körpers auf die Schadstoffbelastung messbar sind, z.B. die Veränderung von Enzymaktivitäten (Induktion/Inhibition) oder auch genetische Parameter. Abbildung 19 gibt einen Überblick über die verschiedenen Mess- und Kontrollstrategien der Arbeits- und Umweltmedizin. Dabei steigt die prädiktive Bedeutung innerhalb des Biological Monitoring im Hinblick auf die gesundheitlichen Auswirkungen vom Dosismonitoring über das biochemische Effektmonitoring zum biologischen Effektmonitoring an (Angerer 2001, Angerer 2003).

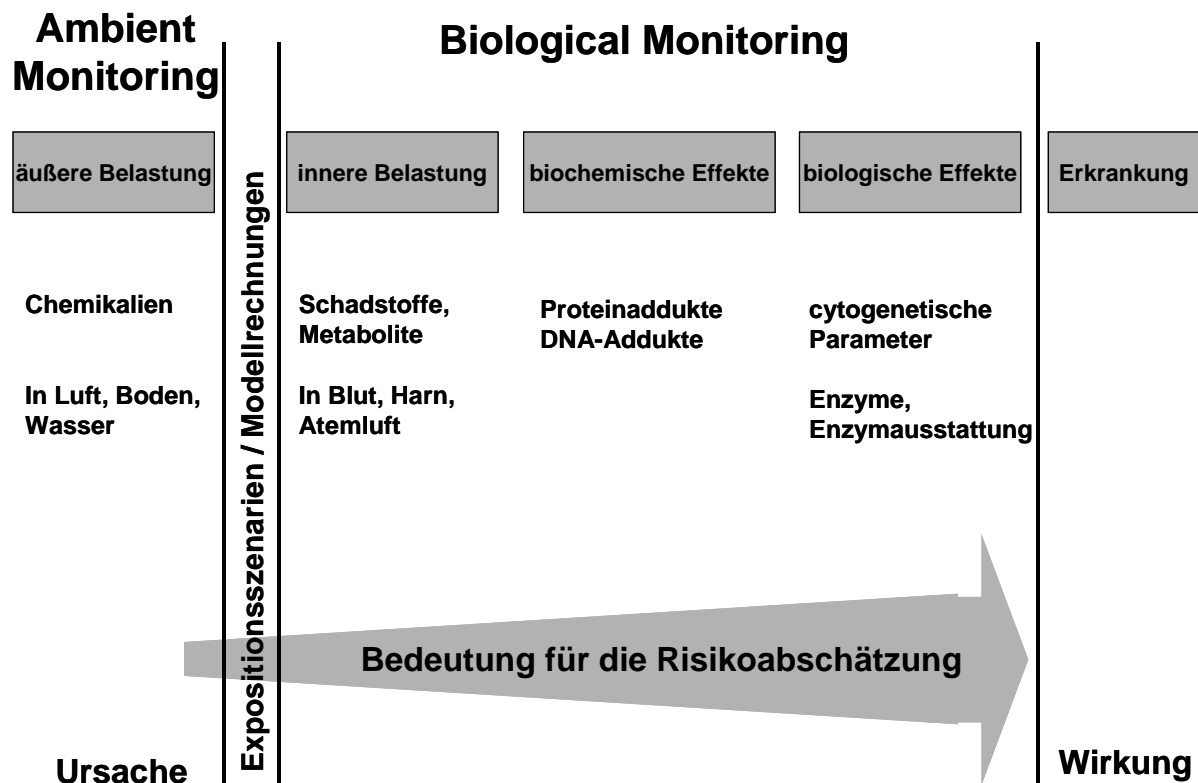


Abbildung 19: Monitoring von Schadstoffen nach Angerer

### 8.1.1 Ambient Monitoring

Eine Möglichkeit zur Erfassung einer Exposition gegenüber einer chemischen Noxe stellt die Messung der äußeren Belastung dar (Ambient Monitoring). Dabei werden die Konzentrationen von Schadstoffen in der Umgebung von Personen bestimmt. Dies bedeutet in der Regel Luftmessungen (stationär oder personenbezogen). Bei partikelgebundenen Stoffen kann auch der Schadstoffgehalt im Staub untersucht werden.

Für den Schadstoffgehalt in der Luft hat die „Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) Grenzwerte festgelegt. Die maximal zulässigen Arbeitsplatz-Konzentrationswerte (MAK-Werte) werden definiert als „die höchstzulässige Konzentration eines Arbeitsstoffes als Gas, Dampf oder Schwebstoff in der Luft am Arbeitsplatz, die nach dem gegenwärtigen Stand der Kenntnis auch bei wiederholter und langfristiger, in der Regel täglich 8-stündiger Exposition, jedoch bei Einhaltung einer durchschnittlichen Wochenarbeitszeit von 40 Stunden im allgemeinen die Gesundheit der Beschäftigten



nicht beeinträchtigt und diese nicht unangemessen belästigt (z.B. durch ekelerregenden Geruch).“ (DFG 2003).

MAK-Werte werden nicht aufgestellt für Substanzen, die beim Menschen oder im Tierversuch erwiesenermaßen zur Krebserzeugung führen, da in diesem Fall nicht von einer aus toxikologischer Sicht unbedenklichen Schwellenkonzentration ausgegangen werden kann. An die Stelle des MAK-Wertes tritt dann die Technische Richtkonzentration (TRK) einer Substanz. Der TRK-Wert stellt die geringstmögliche Luftkonzentration eines Stoffes am Arbeitsplatz dar, die nach dem jeweils aktuellen Stand der Technik erreicht werden kann. TRK-Werte werden nicht von der DFG, sondern vom "Ausschuss für Gefahrstoffe" (AGS) festgelegt. Derzeit existieren mehr als 80 TRK-Werte (DFG 2003).

Zur Vermeidung berufsbedingter Erkrankungen müssen Maßnahmen ergriffen werden, um die potentiell krankheitsauslösenden Faktoren zu beseitigen oder zu minimieren und um Erkrankungen vorzubeugen (Primärprävention). Die Verbesserung der Ventilation als Beispiel einer allgemeinen Schutzmaßnahme, die Verwendung persönlicher Schutzmaßnahmen (Gesichtsmasken und Schutzkleidung) und im Idealfall der Ersatz des Gefahrstoffes durch weniger gefährliche Substanzen stellen wesentliche Maßnahmen zur Reduktion einer Exposition dar.

### **8.1.2 Biological Monitoring**

Das Biological Monitoring ergänzt die Schadstoffmessung in der Luft des Arbeitsplatzes bzw. in den unterschiedlichsten Umweltmedien. Es weist gegenüber dem Ambient Monitoring eine Reihe von Vorteilen auf. Der wesentliche Vorteil des Biological Monitoring besteht darin, dass es eine Aussage darüber zulässt, ob und in welchem Ausmaß der Mensch Schadstoffe aus seiner Umgebung aufnimmt. So werden mit dem Biological Monitoring sämtliche Aufnahmepfade abgebildet über die der Mensch Schadstoffe aufnehmen kann. Dazu zählen die Aufnahme über die Atemluft, die Haut und die Nahrung. Dies ist insbesondere im Bereich der Umweltmedizin von größter Bedeutung, da man bisher meist nur Chemikalien in allen nur denkbaren Materialien wie Holz, Baustoffe, Staubsaugerbeutel etc. bestimmt, ohne dass bisher ein Bezug zwischen dem Schadstoffgehalt dieser Medien und der vom Menschen aufgenommenen Dosis hergestellt wurde (Angerer 2001, Angerer 2003).

### **8.1.2.1 Dosismonitoring**

Im Gegensatz zum Ambient Monitoring wird im Biological Monitoring eine Untersuchung der inneren Belastung vorgenommen. Das heißt, man bestimmt die vom Menschen tatsächlich aufgenommene Menge des Schadstoffs. Unter Biomonitoring versteht man die systematische Sammlung biologischer Proben für die Analyse von Schadstoffen, Metaboliten oder spezifischen biologischen Effektparametern mit dem Ziel, die Exposition und das Gesundheitsrisiko exponierter Personen zu objektivieren. Dafür müssen die Messergebnisse mit Referenz- bzw. Grenzwerten verglichen werden (Zielhuis 1984).

Referenzwerte werden ermittelt, indem eine möglichst große Anzahl an beruflich nicht exponierten Personen bezüglich eines Schadstoffes untersucht wird. Dieser Referenzwert ist eine statistische Größe, der die Konzentration eines chemischen Stoffes im Körpermedium einer Bevölkerungsgruppe beschreibt. Ihm kommt definitionsgemäß keine gesundheitliche Bedeutung zu (Kommission Humanbiomonitoring des UBA 1996). Die Hintergrundbelastung wird durch äußere Exposition verursacht, welche durch Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Fettanteil und Lebensgewohnheiten etc. zusätzlich beeinflusst werden kann (Lewalter und Neumann 1996). Auf der Basis von Referenzwerten kann darüber entschieden werden, ob bei untersuchten Arbeitern eine berufliche Exposition vorliegt (Hill et al. 1996) oder ob bei beruflich nicht belasteten Personen eine Exposition vorliegt.

Analog zum MAK-Wert für die äußere Belastung gibt es für die innere Belastung ebenfalls Grenzwerte, die als „Biologische Arbeitsstoff-Toleranzwerte“ (BAT-Werte) bezeichnet werden. Die BAT-Werte entsprechen per Definition der beim Menschen höchstzulässigen Quantität eines Arbeitsstoffes oder seiner Stoffwechselprodukte oder die dadurch ausgelöste Abweichung eines biologischen Indikators von seiner Norm, die nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand im Allgemeinen die Gesundheit auch bei regelmäßiger Exposition nicht beeinträchtigt (DFG 2003).

Für diese Abschätzung der inneren Belastung sind v. A. human-biologische Materialien wie Urin, Vollblut, Serum oder Plasma geeignet.

Arbeitsstoffe, die als solche, in Form ihrer reaktiven Zwischenprodukte oder ihrer Metaboliten beim Menschen kanzerogene Eigenschaften entfalten, werden aufgrund

des Fehlens einer unbedenklichen Schwellendosis nicht mit BAT-Werten belegt. Dafür werden bei diesen Stoffen, entweder Biologische Leitwerte (BLW) oder Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA) abgeleitet.

Biologische Leitwerte (BLW) werden nur für solche gefährlichen Stoffe benannt, für die keine arbeitsmedizinisch-toxikologisch begründeten Biologischen Arbeitsstofftoleranzwerte (BAT-Werte) aufgestellt werden können (d.h. für Stoffe der Krebskategorie 1 bis 3 und für Stoffe, bei denen nicht ausreichend toxikologische Daten vorliegen).

Expositionsäquivalente (EKA) für krebserzeugende Arbeitsstoffe lassen sich, aus der Korrelation zwischen äußerer und innerer Belastung, ableiten. Als EKA-Wert in biologischem Material legt man den Wert fest der dem TRK-Wert in der Luft des Arbeitsplatzes entspricht.

Die Einhaltung des BLW und der EKA schützen nicht vor der krebserzeugenden Wirkung, sie minimieren diese aber auf das geringste, technisch realisierbare Maß.

### **8.1.2.2 Biochemisches Effektmonitoring**

Besonders bei krebserzeugenden Substanzen ist es von Vorteil, nicht nur die aufgenommene Schadstoffdosis, sondern auch eine auf molekularer Ebene auftretende Wirkung zu erfassen. Genotoxische Substanzen zeichnen sich in der Regel dadurch aus, dass sie in der Lage sind, mit nukleophilen Zentren der DNA zu reagieren. Die so entstehenden kovalent gebundenen Addukte können als Initialisierung der Kanzerogenese aufgefasst werden (Miller und Miller 1966). Ein Beispiel für ein biochemisches Effektmonitoring ist die Bestimmung von Addukten chemischer Substanzen an die DNA. Als Surrogat für die DNA kann man auch Proteine (z.B. Hb) in Betracht nehmen (Angerer 2001, Angerer 2003, Neumann und Ewers 2003).

Ein wichtiger Punkt ist an dieser Stelle aber noch hinsichtlich des Zielgewebes zu beachten: Er betrifft die Bedeutung von DNA-Addukten im Vergleich zu den DNA-Addukten für das Biomonitoring. Werden DNA-Addukte in Leukozyten gemessen, handelt es sich hierbei wie bei den Hb-Addukten um die Vermessung eines Beanspruchungsparameters im Ersatzgewebe. In beiden Fällen erhält man für ein Surrogatgewebe ein Korrelat für die biologisch wirksame Dosis. Dabei steigen die Hb-Adduktspiegel parallel mit den DNA-Adduktspiegeln über mehrere Größenordnungen hinweg dosisabhängig an. Dies gilt ebenso für die DNA-Addukte in Leber und Niere (Neumann und Ewers 2003). Bei den DNA-Addukten wie auch bei Hb-Addukten

kann aus der Beanspruchung eine Gefährdung abgeleitet werden, nicht aber kann das Risiko berechnet werden.

Obwohl ein biochemischer Effektmarker auch einen Hinweis auf die Exposition geben kann, wird dieser Biomarker mehr mit einem gesundheitsschädlichen Effekt verbunden. Effektbiomarker werden oft in epidemiologische Studien benutzt, um eine kausale Verbindung zwischen Exposition und krebserzeugender Wirkung zu belegen.

Wie schon erwähnt, sind die DNA-Addukte und die Hb-Addukte potenziell dazu geeignet, eine biochemische Beanspruchung abzubilden. Die eingesetzten Verfahren zur Bestimmung von DNA- wie auch Hb-Addukten sind vielfältig und gehen vom <sup>32</sup>P-Postlabelling (Beach und Gupta 1992) (PPL) bis zu immunotoxikologischen Ansätzen wie Radioimmunoassay (RIA), „Ultrasensitive Enzyme Radioimmunoassay“ (USE-RIA) oder „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA). Diese Techniken bleiben wegen des Umgangs mit Radioisotopen oder der aufwendigen Herstellung von Antikörpern auf wenige darauf spezialisierte Laboratorien beschränkt. Obwohl die Nachweisgrenze bei diesen Methoden bei bis zu 1 Addukt unter 10<sup>9</sup> unmodifizierten Basen liegt, mangelt es den Ergebnissen dieser Methoden aus analytisch-chemischer Sicht grundsätzlich an Spezifität. Im Analyseergebnis derartiger Methoden ist i.d.R. keine Strukturinformation über die tatsächliche molekulare bzw. chemische Natur des jeweiligen Adduktes enthalten (Koc und Swenberg 2002). Abhilfe schaffen hinsichtlich der fehlenden Spezifität könnte der Einsatz massenspektroskopischer Verfahren wie die HPLC/MS oder die GC/MS. Hier bestehen aber derzeit in der Regel noch Probleme mit der Nachweisempfindlichkeit. (Lutz & Maisch 2003). Bisher sind nur einige wenige Verfahren in der Literatur beschrieben (Übersicht bei Lutz & Maisch 2003)

Die Hb-Addukte haben im Vergleich zu den DNA-Addukten den großen Vorteil, dass sie über die Isolierung von Erythrozyten relativ leicht zugänglich sind und ihre Konzentrationen in der Regel höher liegen als die der DNA-Addukte. Darüber hinaus ist es oftmals nötig, die entsprechenden DNA-Addukte (DNA-Basen-Addukte, DNA-Nucleosid-Addukte bzw. DNA-Nucleotid-Addukte) spezifisch zu synthetisieren, um mit ihnen Kalibrieren und Quantifizieren zu können. Sammelmethode, die DNA-Addukte ganzer Substanzgruppen gleichzeitig erfassen können, sind daher äußerst aufwendig und bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

### 8.1.2.3 Biologisches Effektmonitoring

Wenn erste Reaktionen des Körpers auf die Schadstoffbelastung messbar sind, wie z.B. die Veränderung von Enzymaktivitäten oder auch von genetischen Parametern, dann wird von einem biologischen Effektmonitoring gesprochen (Angerer 2001, Angerer 2003). Solche Veränderungen sind z.B. Chromosomenaberrationen, Mikrokerne, Schwesterchromatidaustausch (SCE) oder DNA-Strangbrüche.

Diese Parameter sind allerdings i.d.R. nicht spezifisch für eine Substanz. Auch unterliegen diese Parameter großen interindividuellen Schwankungen.

Voraussetzung für das Biological Monitoring sind empfindliche spezifische analytische Verfahren, mit denen sich die verschiedenen Parameter in Körperflüssigkeiten bestimmen lassen. Es ist deshalb kein Zufall, dass die Einführung neuer Methoden der instrumentellen Analytik immer auch einen Innovationsschub beim Biological Monitoring als Folge hatte (Angerer 2001, Angerer 2003).

### 8.1.2.4 Biochemisches Effektmonitoring unter Verwendung von Hämoglobin-Addukten im Blut

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 genauso wie DNA-Addukte zur Ermittlung einer Beanspruchung herangezogen werden.

Dazu muss das jeweilige Hb-Addukt jedoch noch weitere Bedingungen erfüllen (Skipper und Tannenbaum 1990, Törnquist und Landi 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 (Ehrenberg et al. 1974). Diese Arbeitsgruppe leitete im Tierexperiment eine mathematische Beziehung zwischen der kontinuierlichen Exposition gegenüber einem alkylierenden Agens und dem „steady-state“ Adduktlevel her. Auf der Grundlage der Bindung von Ethylenoxid an Hämoglobin entwickelte diese Arbeitsgruppe das Konzept der "Tissue dose" bzw. der "target Dose" (Ehrenberg et al. 1974).

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 120mal 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.

Zunächst deuteten Arbeiten von Neumann et al. darauf hin, dass bei der Ratte nicht alle carcinogenen aromatischen Amine Addukte bilden, die so stabil sind, dass ihre Lebenszeit *in vivo* derjenigen unveränderter Erythrozyten entspricht (Neumann 1984). Es wurden bei der Ratte exponentielle Abnahmekinetiken beobachtet. Offensichtlich ist es aber so, dass bei der Ratte (im Gegensatz zum Menschen und der Maus) täglich etwa 3% der Erythrozyten zufällig und unabhängig von ihrem Alter eliminiert werden. Dies täuscht mit einer Abnahmekinetik 1. Ordnung vor, dass die Lebenszeit Addukt-tragender Erythrozyten *in vivo* nicht derjenigen unveränderter Erythrozyten entspricht. Zieht man jedoch die zufällige altersunabhängige Elimination der Rattenerythrozyten mit in Betracht, so ergibt sich auch bei der Ratte eine lineare Abnahmekinetik nullter Ordnung (Neumann et al. 1993).

## 8.2 Einzelbefunde

Tabelle 26: Biomonitoring-Messwerte:Blutwerte in ng/L; Urinwerte in µg/L; n.b. nicht bestimmt

Probe	Anilin Blut	o-T Blut	m-T Blut	p-T Blut	o-A Blut	3-CIA Blut	4-CIA Blut	3,5-DCIA Blut	3,4-DCIA Blut	2NA Blut	4ADP Blut	Anilin Urin	o-T Urin	m-T Urin	p-T Urin	o-A Urin	3-CIA Urin	4-CIA Urin	3,5-DiCIA Urin	3,4-DiCIA Urin	Cotinin Urin
101	658	14,2	22,9	4,0	n.b.	10,5	28,0	16,1	6,7	n.b.	4,8	6,20	0,100	0,169	0,161	0,753	0,025	0,175	0,145	1,016	26,3
102	547	38,6	149,4	18,0	9,9	8,8	96,2	24,2	3,3	n.b.	3,0	6,10	0,128	0,216	0,428	0,719	0,025	0,548	3,084	0,025	29,8
103	366	10,9	25,9	0,9	3,2	3,7	54,5	3,0	5,2	2,5	1,5	6,92	0,204	0,083	1,768	0,533	0,025	2,016	16,294	2,898	2,5
104	297	10,5	18,0	3,6	n.b.	2,9	12,8	15,0	5,2	n.b.	5,4	6,03	0,135	0,067	0,424	0,577	0,025	0,025	2,531	0,025	2,5
105	218	26,1	115,3	22,2	9,1	27,1	61,7	44,0	2,5	n.b.	0,5	3,29	0,218	0,187	0,025	0,471	0,025	0,025	0,025	0,025	2,5
106	675	12,1	48,2	11,0	3,1	6,2	44,1	27,2	6,0	1,8	2,5	2,91	0,125	0,054	0,279	0,315	0,050	0,273	0,116	0,025	2,5
107	133	49,7	122,8	10,5	9,8	8,9	0,5	3,5	0,5	n.b.	1,6	2,07	0,058	0,025	0,057	0,142	0,025	0,137	3,229	0,025	2,5
108	427	15,3	15,6	3,0	n.b.	6,9	21,9	60,3	4,5	n.b.	1,6	5,53	0,157	0,056	0,025	0,373	0,025	2,562	0,907	0,025	5,0
109	250	21,1	50,3	20,8	7,6	5,2	21,4	7,2	3,4	2,0	23,4	1,94	0,290	0,250	0,124	0,250	0,025	0,025	2,983	0,025	1124,9
110	280	10,8	9,7	4,7	n.b.	10,7	26,8	4,6	3,3	n.b.	5,6	4,84	0,141	0,236	0,096	0,318	0,025	0,848	0,025	0,025	473,9
111	594	19,4	17,6	9,5	n.b.	5,1	19,4	4,1	3,9	n.b.	18,1	6,20	0,208	0,209	0,115	0,297	0,025	0,462	0,025	0,025	737,4
112	699	10,1	37,2	6,6	2,1	9,5	35,3	15,0	7,7	2,5	4,6	2,74	0,838	0,133	0,189	0,228	0,025	0,313	3,610	0,025	390,7
113	347	9,2	14,1	1,4	n.b.	2,9	32,5	27,2	3,4	n.b.	4,8	2,15	0,108	0,068	0,025	0,204	0,025	0,025	0,861	0,025	9,3
114	3090	39,7	34,6	12,1	1,4	4,3	24,0	5,2	3,2	1,1	3,7	3,04	0,183	0,214	0,098	0,406	0,025	0,185	0,253	0,025	542,8
115	10438	77,0	30,8	13,2	2,9	14,3	47,6	28,0	5,2	6,2	3,9	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	241,1
116	1354	34,5	78,5	17,4	7,2	3,0	46,5	4,8	0,3	n.b.	0,5	2,72	0,079	0,025	0,174	0,228	0,144	1,205	0,878	0,025	2,5
117	604	10,7	12,4	1,6	n.b.	17,9	30,2	16,4	5,6	n.b.	1,9	3,63	0,094	0,025	0,169	0,149	0,076	0,121	1,403	0,123	2,5
118	3456	35,5	39,4	11,0	1,4	18,4	24,0	13,9	1,0	0,5	6,5	3,24	0,137	0,180	0,079	0,320	0,025	0,050	0,347	0,025	359,8
119	143	11,8	34,0	24,4	18,8	14,9	37,4	3,6	0,4	n.b.	0,5	4,67	0,153	0,203	0,025	0,205	0,025	0,523	0,262	0,025	1020,5
120	5909	39,7	24,6	7,7	1,4	9,7	28,0	25,4	3,1	0,5	1,8	2,64	0,096	0,025	0,025	0,079	0,025	0,050	1,321	0,025	2,5
121	408	52,4	37,8	60,3	2,7	11,9	31,7	18,6	7,8	1,2	5,4	2,35	0,050	0,025	0,091	0,101	0,025	0,132	0,438	0,025	2,5
122	535	0,5	0,5	0,5	0,5	9,0	70,0	7,9	5,4	n.b.	2,2	2,96	0,125	0,025	0,025	0,083	0,552	0,172	0,081	0,025	2,5
123	340	10,9	9,8	2,6	n.b.	11,5	22,3	21,8	4,8	n.b.	1,7	3,18	0,152	0,111	0,649	0,251	0,025	0,275	0,810	0,025	18,4
124	309	33,1	55,4	21,8	9,4	37,8	46,3	90,0	13,6	1,5	3,3	4,59	0,057	0,157	0,050	0,332	0,025	0,214	0,133	0,025	2,5
125	141	24,7	91,0	10,4	4,4	4,4	40,8	17,0	0,0	n.b.	4,9	3,97	0,086	0,129	0,025	0,329	0,025	0,212	2,796	0,025	20,5
126	274	6,6	13,6	1,9	0,9	5,5	21,6	47,7	39,3	1,2	2,4	3,40	0,071	0,137	0,053	0,256	0,025	0,025	1,636	0,436	16,7

# Anhang

Probe	Anilin Blut	o-T Blut	m-T Blut	p-T Blut	o-A Blut	3-CIA Blut	4-CIA Blut	3,5-DCIA Blut	3,4-DCIA Blut	2NA Blut	4ADP Blut	Anilin Urin	o-T Urin	m-T Urin	p-T Urin	o-A Urin	3-CIA Urin	4-CIA Urin	3,5-DiCIA Urin	3,4-DiCIA Urin	Cotinin Urin
127	265	15,6	57,1	7,0	5,9	14,4	35,7	18,8	2,4	n.b.	1,6	3,88	0,064	0,069	0,068	0,539	0,025	0,127	0,258	0,025	2,5
128	131	9,6	20,3	2,9	3,3	4,6	12,2	18,6	0,5	n.b.	1,1	4,45	0,184	0,383	0,173	1,253	0,025	0,025	0,025	0,025	17,7
129	439	21,6	91,9	14,0	7,1	21,7	84,3	38,8	9,6	n.b.	2,0	5,65	0,081	0,088	0,154	0,430	0,025	0,207	0,253	0,188	2,5
130	597	7,0	35,7	1,8	1,7	8,7	94,8	23,7	4,8	2,0	1,5	2,20	0,129	0,025	0,025	0,116	0,025	0,100	0,025	0,025	2,5
131	378	12,5	65,4	20,2	1,6	7,5	22,2	22,1	6,7	2,7	12,5	8,96	0,166	0,203	0,167	0,448	0,025	0,469	0,025	0,025	620,5
132	270	9,5	23,5	1,5	1,5	4,3	29,1	5,4	3,7	1,9	2,2	3,27	0,056	0,074	0,025	0,257	0,526	0,264	0,333	0,025	12,4
133	333	19,2	20,5	6,7	n.b.	3,5	20,5	2,0	1,5	n.b.	19,4	4,59	0,389	0,298	0,234	0,228	0,025	0,288	0,025	0,025	629,0
134	660	9,3	47,3	4,0	1,9	23,2	153,9	41,3	6,3	2,2	4,4	6,00	0,139	0,172	0,317	0,430	0,025	1,763	0,439	0,025	31,7
135	310	8,2	40,5	0,5	0,8	13,0	38,2	18,6	3,7	1,9	1,9	4,81	0,119	0,095	0,135	1,032	0,025	0,251	0,025	0,025	2,5
136	490	21,3	15,1	5,0	n.b.	3,9	14,5	12,4	7,0	n.b.	11,8	5,66	0,353	0,404	0,296	0,398	0,025	0,025	0,025	0,025	1077,7
137	1406	21,9	22,9	4,6	n.b.	8,7	34,6	38,4	13,7	n.b.	3,0	1,65	0,025	0,091	0,100	0,238	0,025	0,212	0,271	0,025	6,4
138	375	21,3	25,4	7,8	n.b.	5,9	17,4	22,2	3,4	n.b.	11,4	6,20	0,101	0,025	0,025	0,327	0,025	0,050	0,025	0,025	2,5
139	242	11,6	12,1	2,2	n.b.	1,8	15,3	14,3	4,0	n.b.	2,2	5,23	0,262	0,025	0,025	0,366	0,025	0,093	0,025	0,060	2,5
140	525	50,6	55,2	17,2	0,5	6,1	28,0	80,5	5,7	2,8	2,9	4,82	0,094	0,183	0,025	0,715	0,025	0,062	0,332	0,025	2,5
141	94	14,3	74,4	6,0	2,6	2,9	28,6	18,6	1,0	n.b.	4,2	2,59	0,051	0,025	0,066	0,342	0,025	0,086	0,566	0,025	9,1
142	1097	26,5	77,5	7,0	6,4	5,4	14,4	1,3	1,7	n.b.	5,8	4,55	0,081	0,025	0,071	0,184	0,025	0,172	0,929	0,025	17,8
201	493	33,6	26,9	16,0	0,5	2,8	19,4	3,2	1,7	1,1	7,3	5,18	0,097	0,025	0,113	0,477	0,025	0,251	0,611	0,025	2,5
202	319	22,6	26,3	8,5	7,0	2,9	28,5	50,4	12,1	1,9	3,5	10,40	0,203	0,070	0,282	0,279	0,025	0,287	6,731	1,243	2,5
203	222	11,0	28,2	2,0	n.b.	4,9	18,0	19,2	2,9	n.b.	0,8	7,31	0,125	0,252	0,025	0,705	0,025	0,284	1,223	0,025	2,5
204	2346	31,4	28,7	12,3	0,5	3,4	32,4	13,1	0,9	2,3	0,5	3,61	0,057	0,061	0,054	0,326	0,025	0,763	2,285	0,025	15,0
205	3603	37,3	29,2	5,3	0,8	2,7	13,9	12,4	2,7	0,5	1,4	5,45	0,051	0,054	0,109	0,095	0,025	0,220	1,995	0,089	2,5
206	165	11,1	17,3	3,4	n.b.	1,4	138,5	7,6	2,4	n.b.	7,7	3,17	0,298	0,113	0,217	0,291	0,132	0,615	0,025	0,025	86,6
207	242	16,8	36,7	2,1	5,3	9,1	21,9	13,1	6,7	1,7	3,5	2,84	0,079	0,054	0,141	0,073	0,025	0,540	0,698	0,025	368,1
208	310	8,6	31,5	0,5	1,8	8,3	43,6	30,9	17,6	2,6	2,0	3,40	0,050	0,050	0,025	0,116	0,025	0,133	1,471	0,025	15,6
209	4386	113,4	98,8	52,0	2,8	7,0	36,5	27,9	3,9	5,3	1,4	2,51	0,054	0,025	0,057	0,203	0,025	0,207	0,929	0,025	2,5
210	309	23,0	36,3	12,3	6,2	7,3	40,7	10,2	0,2	n.b.	1,5	3,16	0,068	0,076	0,025	0,273	0,025	0,025	0,495	0,025	122,3
211	485	10,5	13,8	2,0	n.b.	1,2	88,6	4,7	1,9	n.b.	1,2	2,91	0,086	0,025	0,104	0,225	0,025	0,327	1,422	0,025	2,5
212	203	12,6	14,6	2,4	n.b.	14,7	112,7	14,7	2,5	n.b.	2,6	5,38	0,098	0,025	0,592	0,340	1,337	2,053	0,025	0,025	2,5
213	423	16,7	44,5	16,9	1,5	3,7	22,9	5,7	3,5	2,8	15,7	7,09	0,534	0,705	0,258	0,585	0,025	0,025	0,025	0,025	2152,2
214	453	24,7	34,6	12,8	n.b.	50,7	42,5	29,5	14,9	n.b.	6,3	6,00	0,206	0,209	0,356	0,765	0,149	0,483	0,970	0,025	870,9



## Anhang

Probe	Anilin Blut	o-T Blut	m-T Blut	p-T Blut	o-A Blut	3-CIA Blut	4-CIA Blut	3,5-DCIA Blut	3,4-DCIA Blut	2NA Blut	4ADP Blut	Anilin Urin	o-T Urin	m-T Urin	p-T Urin	o-A Urin	3-CIA Urin	4-CIA Urin	3,5-DiCIA Urin	3,4-DiCIA Urin	Cotinin Urin
215	89	15,3	46,5	8,4	2,1	3,9	103,7	7,8	0,5	n.b.	5,7	4,68	0,162	0,071	0,631	0,452	0,025	0,986	0,025	0,025	168,2
216	259	14,3	27,1	0,5	4,4	2,1	47,8	0,5	1,7	1,6	1,4	3,20	0,025	0,056	0,025	0,251	0,025	0,794	0,111	0,025	29,7
217	286	21,4	19,1	10,4	n.b.	2,1	23,1	7,2	4,2	n.b.	12,9	2,20	0,293	0,209	0,307	0,182	0,025	0,025	0,025	0,025	631,6
218	214	36,3	206,0	30,2	8,9	24,8	97,8	43,1	8,2	n.b.	3,6	1,95	0,085	0,081	0,025	0,667	0,025	0,126	0,025	0,025	2,5
219	304	59,4	73,3	23,7	28,4	9,6	49,3	10,2	0,5	n.b.	3,5	5,38	0,106	0,072	0,025	0,170	0,025	0,025	0,081	0,025	2,5
220	767	79,1	92,1	48,3	11,3	14,3	26,1	5,4	0,1	n.b.	15,1	7,02	0,268	0,285	1,125	0,715	0,025	0,355	0,512	0,025	2361,5
222	256	35,6	22,3	2,5	n.b.	7,9	28,9	14,3	7,3	n.b.	1,8	0,85	0,085	0,057	0,025	0,080	0,025	0,073	0,200	0,025	33,4
223	1506	39,9	73,4	16,6	14,9	4,1	55,7	5,1	0,5	n.b.	3,8	6,31	0,137	0,060	0,347	0,384	0,025	0,025	1,683	0,025	20,9
224	422	17,6	91,3	13,4	7,6	7,6	34,6	11,2	0,5	n.b.	2,0	3,41	0,069	0,060	0,056	0,139	0,025	0,090	0,128	0,025	2,5
301	617	25,6	20,7	13,2	n.b.	2,3	22,4	7,1	5,0	n.b.	9,0	2,24	0,340	0,309	0,253	0,219	0,025	0,025	0,025	0,025	2330,6
302	698	29,8	23,7	11,6	n.b.	4,6	43,9	14,5	5,7	n.b.	12,7	3,56	0,110	0,053	0,822	0,355	0,171	0,129	0,025	0,025	15,6
303	1438	30,7	70,3	33,0	14,3	23,4	210,3	6,3	0,1	n.b.	1,6	3,38	0,112	0,079	0,025	0,376	0,067	0,262	3,634	0,025	18,5
304	109	19,8	41,2	14,6	5,1	17,6	41,3	10,7	0,6	n.b.	1,4	3,02	0,051	0,025	0,092	0,133	0,059	0,266	0,364	0,025	12,2
305	267	15,5	14,6	4,1	n.b.	6,3	8,6	9,2	1,5	n.b.	2,5	2,12	0,131	0,025	0,098	0,144	0,063	0,184	0,782	0,025	73,0
306	598	4,8	24,0	4,9	n.b.	105,6	131,8	85,2	21,6	n.b.	1,6	3,37	0,143	0,051	1,614	0,050	1,034	0,570	0,449	0,025	11,7
307	595	44,1	122,7	33,8	6,4	74,7	1355,8	39,7	8,0	n.b.	17,8	5,34	0,132	0,076	0,277	0,280	0,191	0,609	4,146	0,025	13,1
308	283	13,1	12,0	14,8	n.b.	3,6	10,9	9,1	2,7	n.b.	2,8	10,84	0,851	0,124	0,411	0,339	0,025	0,132	0,269	0,025	2,5
309	251	9,1	11,0	1,5	n.b.	9,2	11,6	6,4	2,4	n.b.	1,2	2,46	0,136	0,025	0,025	0,528	0,395	0,236	1,091	0,100	2,5
310	135	15,2	50,8	6,8	4,5	3,9	16,1	3,6	0,5	n.b.	19,4	5,11	0,091	0,216	0,085	0,512	0,025	0,025	10,291	0,197	2,5
311	518	17,7	11,5	1,7	n.b.	4,2	11,1	16,9	6,9	n.b.	2,3	2,50	0,059	0,025	0,025	0,087	0,072	0,081	0,115	0,053	2,5
312	867	45,3	120,4	35,4	0,5	67,6	141,5	53,0	9,1	n.b.	3,8	2,37	0,065	0,025	0,063	0,151	0,025	0,125	0,097	0,025	2,5
313	834	20,2	26,2	5,5	n.b.	9,2	35,4	46,7	8,5	n.b.	1,4	2,83	0,025	0,025	0,025	0,125	0,025	0,066	0,382	0,025	2,5
314	374	10,9	21,7	2,6	n.b.	1,3	21,8	19,2	4,4	n.b.	0,4	3,55	0,077	0,064	0,146	0,214	0,025	0,249	2,895	0,025	2,5
315	630	41,0	143,2	5,7	12,0	13,7	93,8	11,5	2,5	n.b.	2,0	2,97	0,097	0,025	0,103	0,254	0,025	0,393	1,003	0,025	2,5
316	1132	40,4	72,1	18,4	0,5	18,2	20,7	24,9	1,8	n.b.	14,9	3,26	0,083	0,070	0,025	0,133	0,237	0,213	0,497	0,025	214,1
317	257	11,5	12,9	3,2	n.b.	5,3	42,4	29,4	17,2	n.b.	6,7	2,63	0,103	0,208	0,059	0,246	0,232	0,467	0,025	0,025	536,3
319	236	16,6	12,0	4,3	n.b.	12,7	13,1	30,6	3,7	n.b.	2,4	4,17	0,082	0,025	0,025	0,092	0,025	0,051	6,284	0,025	2,5
320	326	22,4	41,5	14,2	n.b.	9,8	36,9	38,3	1,9	n.b.	11,7	5,36	0,224	0,227	0,186	0,222	0,025	0,025	8,155	0,025	2,5
321	279	54,4	61,9	58,9	34,6	6,7	18,6	1,2	0,5	n.b.	13,7	1,44	0,145	0,057	0,056	0,060	0,025	0,025	0,025	0,025	435,9
322	125	0,5	41,7	5,0	34,0	7,8	28,6	3,5	0,5	n.b.	4,0	7,36	0,121	0,052	0,025	0,372	0,315	0,507	0,087	0,104	2,5

# Anhang

Probe	Anilin Blut	o-T Blut	m-T Blut	p-T Blut	o-A Blut	3-CIA Blut	4-CIA Blut	3,5-DCIA Blut	3,4-DCIA Blut	2NA Blut	4ADP Blut	Anilin Urin	o-T Urin	m-T Urin	p-T Urin	o-A Urin	3-CIA Urin	4-CIA Urin	3,5-DiCIA Urin	3,4-DiCIA Urin	Cotinin Urin
323	4077	81,1	138,8	69,6	10,5	12,0	45,3	18,7	0,3	n.b.	44,6	3,74	0,187	0,218	0,174	0,366	0,025	0,025	0,025	0,025	768,3
324	190	12,4	13,8	1,7	n.b.	5,8	12,1	7,6	2,8	n.b.	1,8	12,29	0,085	0,113	0,144	1,272	0,025	0,172	1,649	0,050	2,5
325	713	19,7	18,0	6,2	0,5	20,7	20,8	15,6	1,9	0,5	1,9	5,92	0,316	0,066	0,213	0,207	0,117	0,143	0,160	0,025	2,5
326	114	12,2	49,0	6,2	5,1	4,2	13,1	15,4	1,1	n.b.	1,3	8,25	0,115	0,025	0,025	0,367	0,025	0,660	6,810	0,025	15,4
327	176	25,6	51,1	20,1	6,0	13,0	49,6	20,5	1,9	n.b.	2,2	3,56	0,072	0,025	0,025	0,108	0,025	0,055	1,325	0,025	21,7
328	426	11,9	9,9	1,0	n.b.	6,2	11,2	10,3	2,2	n.b.	0,5	8,48	0,193	0,025	0,025	0,119	0,025	0,181	0,296	0,025	2,5
329	297	10,8	6,6	1,4	n.b.	4,8	9,5	52,1	2,2	n.b.	0,5	3,20	0,088	0,060	0,140	0,258	0,025	0,198	0,422	0,025	6,3
330	106	25,3	76,3	17,3	3,3	4,7	41,9	10,9	1,5	n.b.	7,9	7,60	0,488	0,286	0,255	0,266	0,025	0,025	0,261	0,025	1972,1
331	4706	39,7	24,3	10,4	2,4	6,0	19,1	18,0	2,6	0,5	2,1	5,65	0,073	0,223	0,296	0,230	0,173	0,864	0,572	0,025	10,5
332	212	21,8	74,0	11,9	5,4	12,3	20,7	22,9	2,4	n.b.	0,7	1,53	0,025	0,025	0,025	0,658	0,025	0,066	0,207	0,025	2,5
333	1859	35,4	38,2	7,2	1,2	4,8	21,0	20,3	5,3	0,9	0,9	2,79	0,052	0,025	0,025	0,343	0,025	0,119	1,178	0,025	2,5
334	5062	72,4	51,3	7,2	1,1	2,5	18,8	6,0	1,5	1,2	1,9	2,86	0,066	0,051	0,096	0,366	0,025	0,213	0,456	0,025	2,5
335	1952	21,7	86,0	7,3	1,2	3,2	19,5	8,9	2,6	1,0	1,6	3,27	0,053	0,172	0,158	0,025	0,025	0,162	0,025	0,025	2,5
336	2222	32,4	34,9	14,5	1,6	10,0	60,0	20,8	3,6	2,7	1,3	2,65	0,115	0,082	3,376	0,240	0,025	1,345	10,289	0,696	2,5
401	151	30,1	84,8	5,8	6,2	7,4	34,3	7,1	1,0	n.b.	3,1	8,08	1,660	0,052	0,025	0,136	0,436	0,244	2,713	0,025	2,5
402	499	12,3	17,7	2,9	n.b.	5,9	20,6	3,9	3,1	n.b.	5,9	4,28	0,148	0,155	0,212	0,370	0,025	0,025	1,357	0,058	17,2
403	453	16,6	16,1	1,0	n.b.	4,0	36,8	17,8	4,1	n.b.	1,8	2,91	0,265	0,025	0,099	0,414	0,025	0,025	1,600	0,078	2,5
404	1719	60,2	41,9	9,0	0,6	2,2	12,8	4,0	2,3	1,6	7,3	6,97	0,353	0,434	0,233	0,596	0,025	3,314	1,643	0,025	1571,2
405	396	37,1	42,0	17,3	0,5	7,7	21,1	51,0	2,9	1,2	0,9	8,35	0,102	0,052	0,405	0,240	0,025	0,350	0,198	0,025	2,5
406	1020	44,7	130,2	12,3	15,9	9,3	384,7	14,8	0,3	n.b.	13,9	6,68	0,096	0,104	0,025	0,401	0,025	0,439	0,455	0,025	7,0
407	360	19,2	89,0	12,4	5,0	19,3	32,0	5,3	1,2	n.b.	0,4	5,48	0,102	0,094	0,025	0,421	0,025	0,142	0,025	0,025	2,5
408	765	25,4	104,1	18,8	7,7	24,1	60,5	30,2	1,5	n.b.	1,6	3,33	0,117	0,025	0,121	0,323	0,025	0,261	0,509	0,025	11,3
409	1692	40,4	37,3	15,4	1,2	4,1	20,2	6,5	1,4	0,5	20,8	6,12	0,248	0,409	0,248	0,653	0,025	0,249	0,025	0,025	2729,1
410	212	49,4	108,6	8,5	10,1	27,7	49,9	21,7	1,7	n.b.	70,5	0,70	0,058	0,052	0,025	0,110	0,025	0,050	0,096	0,025	2,5
411	122	834,2	801,9	502,7	591,2	411,2	391,7	154,6	184,2	n.b.	2,5	2,57	0,290	0,268	0,384	0,296	0,025	0,025	0,025	0,025	2,5
412	1367	34,5	114,4	15,7	15,3	6,4	40,8	27,8	3,2	n.b.	1,9	4,75	0,084	0,057	0,103	0,280	0,025	0,083	0,759	0,025	2,5
413	1155	53,1	116,6	47,5	17,0	30,6	118,5	55,1	4,0	n.b.	2,9	2,27	0,064	0,025	0,025	0,196	0,025	0,249	2,311	0,034	15,8
414	413	20,4	19,3	1,5	n.b.	2,6	15,2	56,3	3,3	n.b.	2,3	5,59	0,092	0,071	0,025	0,469	0,025	0,128	1,673	0,025	2,5
415	261	32,2	30,0	7,5	0,5	3,8	85,8	24,7	3,3	0,5	1,0	1,37	0,110	0,059	0,094	0,090	0,025	0,259	0,991	0,025	2,5
416	53	12,0	37,0	34,0	2,7	12,8	19,3	26,9	1,6	n.b.	1,1	3,88	0,076	0,025	0,025	0,304	0,025	0,445	1,190	0,120	6,7

# Anhang

Probe	Anilin Blut	o-T Blut	m-T Blut	p-T Blut	o-A Blut	3-CIA Blut	4-CIA Blut	3,5-DCIA Blut	3,4-DCIA Blut	2NA Blut	4ADP Blut	Anilin Urin	o-T Urin	m-T Urin	p-T Urin	o-A Urin	3-CIA Urin	4-CIA Urin	3,5-DiCIA Urin	3,4-DiCIA Urin	Cotinin Urin
417	575	19,1	46,6	7,1	4,3	3,6	29,2	1,5	0,5	n.b.	6,6	3,41	0,086	0,124	0,146	0,324	0,025	0,088	0,183	0,025	255,6
418	684	34,1	107,2	27,0	6,9	14,6	242,6	16,6	4,8	n.b.	5,6	3,79	0,265	0,210	0,081	0,287	0,025	1,150	0,025	0,407	1892,5
419	380	34,0	106,3	63,1	19,5	16,2	148,3	11,3	2,2	n.b.	2,5	2,79	0,081	0,080	0,071	0,050	0,025	0,048	0,186	0,025	2,5
420	586	66,1	23,8	3,1	n.b.	4,9	25,0	93,2	10,3	n.b.	1,9	2,44	0,025	0,025	0,104	0,025	0,025	0,137	0,127	0,025	2,5
421	3288	29,5	27,3	12,1	1,1	2,2	31,3	3,3	0,7	0,5	7,9	9,18	0,543	0,431	0,413	0,986	0,025	0,565	1,268	0,025	3312,7
422	4074	57,2	28,9	8,9	1,2	1,6	21,1	11,0	1,1	0,5	2,0	2,99	0,025	0,064	0,066	0,182	0,025	0,100	0,442	0,025	23,8
423	578	30,1	41,7	14,5	1,0	2,8	47,8	1,8	1,1	1,0	8,5	2,22	0,195	0,161	0,147	0,182	0,273	0,243	0,025	0,025	959,9
424	527	12,0	23,1	7,0	1,8	8,2	39,3	17,4	3,9	1,6	7,6	3,59	0,196	0,126	0,065	0,274	1,608	0,491	0,409	0,025	9,4
425	802	42,6	29,4	7,5	2,0	3,1	44,5	11,6	2,3	2,5	1,1	5,64	0,074	0,025	0,025	0,312	0,025	0,025	0,025	0,025	2,5
426	3780	77,2	29,3	12,4	2,1	11,6	38,7	33,9	3,2	1,1	1,5	3,89	0,064	0,051	0,025	0,080	0,025	0,105	0,509	0,025	2,5
427	119	14,6	76,7	7,6	4,4	3,0	17,6	7,4	2,3	n.b.	2,0	4,41	0,095	0,106	0,025	0,462	0,025	0,169	0,025	0,025	2,5
428	3272	50,9	23,4	6,3	1,1	2,5	25,9	3,6	0,6	1,3	1,0	1,86	0,082	0,025	0,086	0,134	0,025	0,132	0,064	0,025	2,5
429	3262	41,5	58,2	11,9	1,7	6,0	19,2	23,6	2,2	0,5	6,2	3,92	0,117	0,069	0,064	0,111	0,025	0,196	0,292	0,025	406,1
430	961	112,7	31,7	8,8	0,9	8,7	15,5	5,3	2,2	0,5	1,5	7,16	0,133	0,099	0,080	0,761	0,025	0,187	0,382	0,025	19,3
431	281	36,0	15,0	6,5	n.b.	4,0	46,8	11,4	3,4	n.b.	12,9	3,31	0,253	0,320	0,149	0,357	0,025	0,025	0,025	0,025	1290,2
432	104	23,5	90,8	10,9	5,6	3,6	26,0	35,2	2,2	n.b.	1,7	3,63	0,050	0,082	0,025	0,116	0,025	0,098	0,887	0,025	2,5
434	267	10,1	77,3	9,5	4496,5	18,8	166,6	6,4	0,5	n.b.	0,5	2,88	0,025	0,052	0,025	0,231	0,025	0,082	0,025	0,025	9,6
435	247	10,2	22,6	3,4	n.b.	5,1	14,9	8,5	2,4	n.b.	2,5	5,44	0,105	0,108	0,025	0,246	0,025	0,158	1,802	0,059	2,5
436	127	25,3	123,9	19,6	3,3	8,9	42,5	18,4	0,8	n.b.	6,8	1,08	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,046	0,025	0,025	571,8
437	290	14,2	19,7	4,0	n.b.	9,2	13,7	5,4	1,8	n.b.	7,6	2,93	0,155	0,209	0,106	0,183	0,025	0,171	0,025	0,025	1942,4
438	274	7,0	24,7	0,5	3,3	2,3	361,6	1,1	2,1	1,9	1,0	5,10	0,129	0,092	0,025	1,394	0,025	0,025	0,080	0,025	2,5
439	1259	24,4	24,4	6,4	1,7	1,9	113,9	0,7	0,6	0,9	1,2	3,90	0,067	0,054	0,102	0,294	0,025	0,591	0,193	0,025	15,7
440	70	16,8	71,9	11,8	3,0	7,8	76,7	15,5	0,6	n.b.	2,1	2,14	0,209	0,074	0,209	0,268	0,025	0,156	0,025	0,025	13,5
441	145	21,4	92,0	10,8	2,6	5,8	50,1	2,6	0,5	n.b.	8,8	3,00	0,252	0,258	0,025	0,243	0,025	0,161	0,025	0,025	1011,8
442	186	14,1	22,6	2,8	n.b.	1,1	26,9	13,0	1,1	n.b.	1,3	5,81	0,154	0,073	0,025	0,317	0,025	0,425	2,325	0,025	8,6
443	63	17,7	35,7	6,7	3,0	5,6	146,4	11,8	0,1	n.b.	1,5	4,45	0,077	0,025	0,025	0,081	0,025	0,326	0,246	0,054	9,9
501	606	13,3	16,6	12,3	2,1	6,7	51,0	54,9	6,4	1,5	2,0	6,16	0,099	0,060	0,079	0,278	0,025	0,180	0,727	0,223	2,5
502	1373	28,2	28,5	8,2	1,5	2,1	26,6	18,0	2,6	4,9	1,5	3,30	0,108	0,148	0,025	0,287	0,025	0,213	1,276	0,025	2,5
503	231	14,5	19,5	0,5	5,2	3,1	24,1	8,3	2,7	1,2	1,6	2,30	0,025	0,025	0,053	0,116	0,025	0,090	0,446	0,025	2,5
504	474	17,2	25,0	6,7	n.b.	27,3	44,0	33,0	9,2	n.b.	2,8	2,04	0,087	0,054	0,050	0,160	0,077	0,130	0,131	0,025	24,4

# Anhang

Probe	Anilin Blut	o-T Blut	m-T Blut	p-T Blut	o-A Blut	3-CIA Blut	4-CIA Blut	3,5-DCIA Blut	3,4-DCIA Blut	2NA Blut	4ADP Blut	Anilin Urin	o-T Urin	m-T Urin	p-T Urin	o-A Urin	3-CIA Urin	4-CIA Urin	3,5-DiCIA Urin	3,4-DiCIA Urin	Cotinin Urin
505	1283	21,2	24,9	11,2	0,5	1,2	18,5	8,6	2,6	0,5	1,7	5,16	0,059	0,025	0,051	0,124	0,025	0,087	0,771	0,025	2,5
506	235	27,3	49,3	10,4	7,7	6,0	19,0	10,7	4,6	2,3	11,0	4,40	0,143	0,185	0,094	0,295	0,025	0,025	0,558	0,025	717,6
507	6683	33,7	30,3	11,8	2,0	8,6	17,5	10,0	1,6	1,2	3,2	1,64	0,025	0,025	0,053	0,061	0,025	0,150	2,369	0,025	2,5
508	293	41,2	26,7	7,5	14,7	3,0	34,2	8,7	6,8	0,5	1,8	5,09	0,077	0,096	0,025	0,373	0,025	0,260	0,437	0,085	34,0
509	1814	123,9	28,4	11,1	2,2	19,0	57,4	9,2	2,0	0,5	3,0	1,71	0,025	0,025	0,025	0,095	0,025	1,089	0,097	0,025	2,5
510	260	34,0	25,5	9,0	1,5	2,9	41,0	18,2	2,8	0,5	1,4	2,46	0,069	0,025	0,234	0,106	0,025	0,268	1,680	0,262	2,5
511	273	39,5	36,8	7,7	2,1	16,5	33,5	21,6	1,7	0,5	1,9	3,59	0,121	0,071	0,025	0,331	0,407	0,529	0,196	0,079	22,2
512	1902	113,3	35,3	8,8	1,8	3,2	56,7	6,9	1,2	0,5	2,2	2,96	0,052	0,025	0,025	0,147	0,025	0,516	0,073	0,025	7,9
513	345	57,0	36,2	16,2	1,9	5,5	24,4	9,0	1,4	2,3	8,0	6,40	0,716	0,347	0,149	0,518	0,025	0,171	0,025	0,025	2243,2
514	1528	110,4	31,9	13,6	1,2	3,3	29,5	1,6	1,1	0,5	4,7	6,69	0,416	0,292	0,071	0,298	0,025	0,091	0,025	0,025	2226,3
515	255	30,2	76,9	13,2	4,6	88,4	474,2	33,1	8,2	n.b.	2,0	4,15	0,149	0,025	0,258	0,387	3,853	1,861	1,544	0,025	2,5
516	1204	32,5	38,2	10,8	1,5	6,8	19,8	7,1	2,1	0,5	2,7	2,17	0,048	0,025	0,063	0,052	0,025	0,168	1,121	0,051	2,5
517	1414	76,0	65,4	7,6	1,7	14,4	23,1	3,7	1,6	0,7	2,9	0,39	0,067	0,025	0,025	0,061	0,220	0,091	0,025	0,025	2,5
518	994	14,1	29,0	13,1	1,0	2,6	16,5	17,5	1,1	1,0	6,5	3,93	0,108	0,071	0,338	0,069	0,025	0,187	1,883	0,025	2100,2
519	864	21,4	46,9	12,7	0,5	1,9	11,9	12,9	2,7	0,9	11,0	1,34	0,158	0,123	0,217	0,079	0,025	0,185	1,086	0,025	1679,4
520	949	22,6	49,8	13,7	1,1	1,9	11,0	12,6	2,6	0,9	11,0	6,87	0,189	0,267	0,182	0,241	0,025	0,365	3,733	0,025	1013,8
521	502	39,0	24,7	6,5	1,4	5,6	25,8	4,2	1,0	0,5	1,2	1,79	0,094	0,025	0,120	0,305	0,025	0,255	0,187	0,025	2,5
522	1340	38,3	22,8	8,6	2,1	8,6	30,9	6,9	0,5	0,5	2,5	4,81	0,051	0,051	0,103	0,106	0,222	0,159	0,483	0,025	2,5
523	365	45,4	28,1	14,9	1,4	2,8	33,2	3,8	2,6	0,5	10,0	3,71	0,246	0,298	0,096	0,343	0,025	0,359	0,692	0,025	1644,0
524	834	1,3	30,2	8,7	1,0	29,5	17,4	6,2	1,3	1,1	3,7	3,79	0,188	0,129	0,141	0,397	0,025	0,025	0,410	0,025	2,5
525	1515	76,1	45,8	11,0	0,5	7,8	141,3	9,6	2,3	0,5	2,2	5,53	0,149	0,119	0,260	0,183	0,570	1,001	0,570	0,025	2,5
526	607	62,2	28,9	9,9	1,3	6,1	20,0	6,5	1,2	1,7	1,3	3,39	0,075	0,025	0,161	0,125	0,025	0,025	0,407	0,025	31,5
527	785,7	35,3	28,8	9,0	2,0	8,7	22,0	2,9	2,7	0,9	1,6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	2,5
528	790,3	7,4	21,6	7,4	2,4	18,0	27,2	10,5	4,5	1,0	3,8	4,84	0,116	0,078	0,086	0,496	0,025	0,406	0,260	0,025	16,9
529	2060,9	98,2	22,3	9,2	3,3	10,7	21,3	3,0	1,9	0,5	2,2	1,97	0,084	0,025	0,176	0,562	0,025	0,250	0,289	0,025	2,5
530	528,1	17,2	31,5	8,2	1,5	23,3	15,2	21,8	2,3	1,7	1,2	6,27	0,112	0,068	0,098	0,337	0,025	0,213	0,403	0,025	2,5
531	1732,0	105,6	19,0	8,6	1,6	18,9	39,7	9,8	3,5	0,5	2,6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	17,5
532	2002	134,9	27,6	12,3	2,1	9,1	33,6	22,4	2,9	0,5	1,5	2,47	0,025	0,025	0,025	0,202	0,025	0,164	2,133	0,056	2,5
533	3783	30,1	21,5	6,2	1,4	6,1	2414,0	7,1	1,9	0,5	2,0	2,61	0,025	0,025	0,025	0,083	0,025	39,067	0,398	0,025	2,5
534	211	16,2	30,8	0,3	6,8	3,2	11,8	8,1	9,2	1,2	2,5	4,74	0,135	0,056	0,104	0,221	1,039	0,641	0,578	0,025	2,5

## Anhang

Probe	Anilin Blut	o-T Blut	m-T Blut	p-T Blut	o-A Blut	3-CIA Blut	4-CIA Blut	3,5-DCIA Blut	3,4-DCIA Blut	2NA Blut	4ADP Blut	Anilin Urin	o-T Urin	m-T Urin	p-T Urin	o-A Urin	3-CIA Urin	4-CIA Urin	3,5-DiCIA Urin	3,4-DiCIA Urin	Cotinin Urin
535	694	8,7	17,2	3,3	1,6	18,7	35,4	3,9	3,6	1,8	2,8	3,77	0,068	0,112	0,060	0,265	0,025	0,158	0,063	0,100	35,1
536	782	30,0	37,1	19,4	0,5	10,6	15,4	3,9	2,1	3,2	17,6	3,58	0,264	0,246	0,240	0,373	0,399	0,426	0,025	0,025	831,0
537	1035	13,2	33,1	8,3	3,5	46,8	40,1	10,4	6,8	2,1	2,5	3,69	0,053	0,025	0,053	0,262	0,226	0,101	0,226	0,025	2,5
538	141	20,4	49,6	10,0	2,9	29,0	43,6	29,3	0,4	n.b.	4,7	3,09	0,078	0,075	0,025	0,317	0,461	0,160	0,055	0,025	2,5
539	103	5929,5	79,1	7,3	4,6	6,9	65,8	51,5	1,7	n.b.	1,8	5,05	1,581	0,066	0,178	0,189	0,025	0,830	1,086	0,025	2,5
540	112	35,2	136,3	18,2	4,9	11,3	27,5	12,3	2,0	n.b.	10,3	6,05	0,380	0,438	1,049	0,112	0,025	0,227	0,025	0,025	1247,3
542	290	22,3	32,8	8,5	7,4	3,9	26,5	48,2	8,5	1,7	1,3	4,86	0,066	0,054	0,313	0,280	0,025	0,078	0,554	0,201	9,1
543	99	13,2	44,8	6,2	2,7	4,6	62,3	11,2	0,7	n.b.	0,7	1,49	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	1,078	0,025	2,5
684	2917	31,6	25,8	6,8	1,6	9,8	25,4	9,6	2,5	1,1	0,5	2,38	0,079	0,025	0,069	0,307	0,058	0,149	0,453	0,025	2,5
685	925	27,4	21,1	6,0	0,4	26,8	14,1	10,2	1,5	0,5	1,8	5,26	0,074	0,025	0,025	0,201	0,025	0,087	0,089	0,050	2,5
686	3477	25,1	20,5	8,6	1,1	33,1	33,5	4,5	5,3	1,5	1,6	4,41	0,132	0,103	0,067	0,229	1,052	0,407	0,714	0,025	15,8
687	660	22,2	20,3	7,7	0,5	18,7	54,0	1,2	1,2	1,3	2,5	5,50	0,103	0,080	0,072	0,370	0,025	0,482	0,025	0,025	2,5
688	2332	52,9	39,3	9,4	1,4	8,6	49,6	18,9	2,8	0,5	2,7	4,34	0,096	0,117	0,025	0,343	0,025	0,136	0,025	0,025	2,5
689	300	15,5	23,4	3,5	6,0	35,8	41,2	15,1	2,9	1,2	3,8	5,51	0,025	0,025	0,288	0,111	0,410	0,150	0,150	0,025	2,5
690	1133	29,1	18,8	8,5	1,4	57,4	23,3	23,6	5,6	0,9	0,6	0,78	0,053	0,025	0,223	0,025	5,203	0,425	0,462	0,025	2,5
691	618	62,4	37,7	21,9	1,3	14,1	10,2	3,0	1,9	2,4	16,1	3,77	0,058	0,195	0,025	0,369	0,473	0,212	1,438	0,025	2,5
692	1120	50,5	25,7	10,1	0,7	23,6	19,3	74,4	20,8	0,5	1,4	2,24	0,088	0,091	0,218	0,354	1,842	0,609	1,520	0,979	2,5
693	4134	33,5	36,6	10,7	2,0	15,5	23,4	6,7	2,0	8,9	2,7	13,01	0,081	0,078	0,501	0,158	0,025	0,646	0,461	0,025	2,5
694	520	16,4	32,1	7,3	1,7	11,3	70,2	25,5	7,9	2,2	2,3	3,25	0,067	0,025	0,082	0,385	0,025	0,226	1,248	0,111	2,5
695	1030	11,5	63,4	17,7	4,7	97,4	80,1	17,6	10,2	2,3	1,6	5,38	0,073	0,081	0,025	0,424	0,078	0,115	0,191	0,025	2,5
696	381	16,4	50,7	0,5	5,7	141,8	44,4	21,8	6,3	0,9	4,9	5,83	0,063	0,064	0,025	0,507	3,672	0,393	3,584	0,025	18,7
697	460	7,6	27,0	6,8	1,9	44,1	33,7	9,2	4,7	2,1	1,3	3,74	0,056	0,025	0,025	0,188	0,025	0,279	0,025	0,025	2,5
698	443	9,7	32,8	8,2	2,5	7,4	35,2	20,2	5,0	1,8	5,4	3,14	0,100	0,052	0,076	0,271	0,025	0,346	1,081	0,025	2,5
699	662	8,3	51,6	0,5	2,0	59,0	662,0	21,6	4,6	1,5	1,9	4,69	0,054	0,071	0,025	0,104	0,025	0,616	0,981	0,025	2,5

## Anhang

**Tabelle 27:** Anamnese über Fragebogen Teil 1 (Legende siehe im Anschluss an Tabelle 28)

Probe	Alter	Geschlecht	Gewicht	Größe	Beruf_j	BJ_seit	Beruf_a	Ba_von	Ba_bis	Stoffe	genannte Stoffe
101	30	2	60	167	2	83				1	Chemikalien, Metallstammlösungen, Säuren
102	49	1	64	180	2	76		0	0	0	
103	61	1	65	170	2	54		0	0	1	Acetonitril, Cyclohexan, Hexan, Methanol
104	61	1	84	164	2	51		0	0	1	Tetrachlorkohlenstoff, Lösungsmittel, Chloroform, Methanol, Ethylacetat
105	48	1	125	178	2	68		0	0	1	Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Methanol, Ethylacetat, Hexan, Toluol, Dichlormethan
106	56	1	99	181	1	90	1	70	90	0	
107	40	1	86	177	1	83	3	72	83	1	Formalin, Xylol
108	59	1	110	182	2	63	5	59	63	1	Lösemittel, Arsenanorganika
109	53	1	82	175	1	75	2	62	75	0	
110	25	1	71	179	2	90	5	93	94	1	Formalin, Xylol
111	41	1	81	178	1	90	1	79	89	0	
112	41	2	75	180	2	73		0	0	1	Chemikalien, Säuren, Chloroform
113	38	2	58	161	2	78		0	0	1	Säuren, Laugen, Lvsungsmittel
114	47	1	88	181	1	86	3	67	86	0	
115	32	2	77	168	1	88	1	82	87	1	Aceton, Reinigungsmittel, Säurendämpfe
116	46	2	59	158	1	74	2	66	72	0	
117	44	1	89	175	9	76	2	68	71	0	
118	49	1	90	176	1	90		0	0	0	
119	42	2	51	160	2	78		0	0	1	Jod 125
120	25	2	64	173	2	92		0	0	1	Trichlor-Trifluorethan
121	52	2	60	168	2	88	2	66	73	1	Jod 125
122	44	1	72	169	2	80		0	0	0	
123	32	2	61	170	2	0		0	0	1	Diverse Chemikalien
124	32	2	53	168	2	88		0	0	1	Diverse Chemikalien
125	50	2	68	167	2	74	2	64	72	1	Lösungsmittel
126	55	1	88	184	2	75	2	0	58	1	Methanol, Acetonitril
127	41	2	82	169	2	91	9	78	89	1	Hexan, Acetonitril, Toluol, Methanol, Pentachlorphenol, Quecksilber(V)thiocyanat
128	59	1	92	180	2	75		0	0	0	
129	36	2	64	173	2	90	2	87	89	1	

## Anhang

Probe	Alter	Geschlecht	Gewicht	Größe	Beruf_j	BJ_seit	Beruf_a	Ba_von	Ba_bis	Stoffe	genannte Stoffe
130	48	2	55	165	1	87	9	66	74	1	Medizinische Untersuchungsproben
131	47	2	71	168	1	86	9	65	68	0	
132	32	2	74	168	1	84		0	0	0	
133	53	1	85	176	2	75		0	0	0	
134	53	2	69	165	1	74	1	62	69	0	
135	58	1	88	187	1	61	3	55	60	0	
136	42	1	84	173	2	80	2	72	80	1	Organische Lösungsmittel
137	43	2	81	180	2	87	2	73	79	0	
138	53	1	78	169	2	62		0	0	1	Lösungsmittel, Radioaktiv markierte Substanzen
139	39	1	73	183	2	87	5	78	79	0	
140	42	1	79	184	2	86	2	76	86	0	
141	39	2	68	171	2	88		0	0	0	
142	49	2	69	167	2	68		0	0	1	Organische Lösungsmittel, Halogenverbindungen
201	45	2	65	173	1	87	2	69	77	1	Lösungsmittel, Umweltgifte
202	36	1	92	188	2	89		0	0	1	Lösungsmittel
203	28	2	67	168	9	0	2	92	93	0	
204	44	2	46	158	0	0	9	74	87	0	
205	31	2	54	163	2	92		0	0	1	Lösungsmittel
206	34	2	67	170	2	93	9	79	93	1	Färbemittel
207	25	2	50	150	9	91		0	0	0	
208	25	2	71	170	9	0		0	0	0	
209	46	1	77	180	9	97		0	0	1	Diverse Laborchemikalien
210	29	1	80	176	2	88		0	0	1	Diverse Laborchemikalien
211	42	2	58	162	2	76		0	0	1	Farbstoffe
212	23	2	50	168	9	94		0	0	1	organische Lösungsmittel, Ethidiumbromid, Polyacrylamid
213	49	1	92	180	2	75	1	65	75	1	Benzol, Hexan
214	50	1	66	160	2	83	3	66	83	0	
215	27	2	53	157	9	93	2	90	93	0	
216	37	2	80	177	2	96	2	80	91	1	organische Lvsungsmittel
217	44	1	74	177	2	0	3	68	92	1	
218	36	1	70	184	2	93		0	0	0	

## Anhang

Probe	Alter	Geschlecht	Gewicht	Größe	Beruf_j	BJ_seit	Beruf_a	Ba_von	Ba_bis	Stoffe	genannte Stoffe
219	26	2	65	165	2	91		0	0	1	Diverse Laborchemikalien
220	28	1	66	178	9	92	9	90	91	1	Diverse Laborchemikalien
222	36	1	73	179	2	89		0	0	1	Schwermetalle, Lösungsmittel, Säuren
223	34	1	80	173	2	90		0	0	1	Diverse Laborchemikalien
224	30	1	75	186	9	0		0	0	0	
301	30	1	78	175	9	0		0	0	0	
302	22	2	59	170	2	95		0	0	1	Diverse Laborchemikalien
303	31	2	54	174	2	88		0	0	1	EMS, DMBA, Ochratoxin A
304	61	2	71	170	1	77		0	0	0	
305	32	1	83	186	9	90	9	87	90	0	
306	35	2	98	165	2	95	2	78	88	0	
307	35	2	62	166	2	88				1	Dichlormethan, Isophoron
308	39	1	68	170	2	86		0	0	1	Potentielle Kanzerogene
309	28	1	110	194	2	96		0	0	1	Potentielle Kanzerogene
310	28	1	77	187	2	96	5	88	89	0	
311	47	1	72	172	2	78		0	0	0	
312	27	2	65	176	2	87		0	0	1	Formaldehyd, Ethidiumbromid, Epoxide, Chloroform
313	31	2	55	170	2	97		0	0	0	
314	28	2	54	167	9	91		0	0	0	
315	31	2	67	182	2	92		0	0	1	Pestizide, Dioxine
316	27	2	57	162	9	91		0	0	0	
317	33	1	75	180	9	98	9	84	97	0	
319	35	2	54	168	9	92	2	79	90	0	
320	26	2	55	160	9	92		0	0	1	Acrylamid, Ethidiumbromid
321	32	1	77	186	9	98	9	93	95	0	
322	23	1	66	186	2	95	5	94	95	1	Diverse Laborchemikalien
323	35	2	50	163	1	90	1	79	89	0	
324	41	1	67	176	2	83		0	0	0	
325	28	1	73	178	2	92	5	91	98	0	
326	38	1	89	173	3	74		0	0	1	Lacke
327	33	1	71	183	3	80		0	0	1	Lacke, Verdünnungen



## Anhang

Probe	Alter	Geschlecht	Gewicht	Größe	Beruf_j	BJ_seit	Beruf_a	Ba_von	Ba_bis	Stoffe	genannte Stoffe
328	34	1	88	183	3	96	3	93	96	1	Lacke
329	32	2	56	165	9	89	9	85	89	0	
330	34	1	80	178	9	85		0	0	0	
331	68	2	82	168	9	52		0	0	0	
332	63	2	72	168	9	76	1	52	76	0	
333	65	2	68	155	9	61		0	0	0	
334	64	2	74	163	9	67	1	49	67	0	
335	73	2	80	176	9	84	9	44	84	0	
336	62	2	73	164	9	58	1	50	58	0	
401	51	2	82	164	2	67		0	0	0	
402	42	1	80	190	2	87		0	0	0	
403	60	1	80	179	1	60		0	0	0	
404	40	2	62	170	1	77	2	75	77	0	
405	41	2	63	168	2	82		0	0	0	
406	40	2	61	164	1	90		0	0	0	
407	27	2	65	163	1	89		0	0	0	
408	29	2	66	163	1	84		0	0	0	
409	44	2	72	163	1	71		0	0	0	
410	33	1	112	185	1	82		0	0	0	
411	35	1	82	185	2	85	5	81	82	1	Desinfektionsmittel
412	62	1	82	184	1	54		0	0	0	
413	26	2	69	175	1	87		0	0	0	
414	25	2	57	165	1	90		0	0	0	
415	47	1	110	188	9	75	3	65	73	0	
416	25	1	81	200	1	91	5	94	94	0	
417	27	1	83	185	1	91	5	90	91	0	
418	38	1	75	176	1	78	5	79	80	0	
419	46	1	70	173	9	78	9	66	73	0	
420	47	2	62	167	2	89	2	69	75	0	
421	39	1	98	185	1	71	4	54	70	0	
422	49	2	68	172	1	81	1	71	74	0	

## Anhang

Probe	Alter	Geschlecht	Gewicht	Größe	Beruf_j	BJ_seit	Beruf_a	Ba_von	Ba_bis	Stoffe	genannte Stoffe
423	38	1	69	176	1	90	5	82	89	1	Entwickler, Fixierlösung
424	32	2	60	172	1	90	1	62	75	0	
425	52	2	97	164	2	79	2	63	67	0	
426	46	2	85	180	1	71	1	68	71	0	
427	23	2	68	178	1	91		0	0	0	
428	39	1	86	179	1	74		0	0	0	
429	38	2	59	170	1	94	2	75	90	0	
430	41	1	90	187	1	81		0	0	0	
431	48	1	90	179	2	78		0	0	0	
432	54	2	57	154	1	78	1	58	78	0	
434	38	1	75	179	1	79		0	0	0	
435	35	2	52	162	2	80		0	0	0	
436	35	2	64	175	1	86	2	78	86	0	
437	36	2	62	173	9	78		0	0	0	
438	40	1	79	176	1	89	5	77	89	0	
439	33	1	79	182	9	95	1	91	95	0	
440	37	1	82	176	9	91	9	75	91	0	
441	39	1	64	170	1	83	5	77	78	0	
442	58	1	95	180	1	54		0	0	0	
443	45	1	84	181	9	75		0	0	0	
501	36	2	67	173	1	80		0	0	0	
502	67	1	79	182	0	0	2	63	93	0	
503	26	2	60	164	1	92		0	0	0	
504	53	2	67	165	1	63	9	59	63	0	
505	42	2	53	163	2	75		0	0	1	Labor- und Röntgenchemikalien
506	42	1	85	186	9	85	9	73	79	1	Asbest, PCB, Formaldehyd
507	55	1	120	202	9	69		0	0	1	PCB, Asbest
508	58	1	81	185	1	57		0	0	0	
509	22	1	71	183	1	91	2	96	97	0	
510	32	2	67	174	2	96	2	83	92	0	
511	44	2	62	166	1	70		0	0	0	

## Anhang

Probe	Alter	Geschlecht	Gewicht	Größe	Beruf_j	BJ_seit	Beruf_a	Ba_von	Ba_bis	Stoffe	genannte Stoffe
512	50	2	53	164	2	72		0	0	0	
513	42	1	86	180	2	80		0	0	0	
514	50	1	85	173	9	77	9	74	77	0	
515	37	1	81	178	1			0	0	0	
516	55	1	103	176	3	68	3	57	68	1	Giftige Kunststoffe
517	30	1	85	185	2	93	2	86	92	1	Desinfektionsmittel
518	27	2	65	173	1	90		0	0	0	
519	54	2	55	157	2	81	2	63	72	0	
520	30	2	60	168	1	91	2	85	91	0	
521	63	2	71	166	0	0		0	0	0	
522	68	1	86	169	0	0	4	45	93	0	
523	68	1	82	167	0	0	4	47	93	0	
524	33	1	70	179	9	89		0	0	0	
525	23	2	53	165	1	97		0	0	0	
526	30	2	79	168	1	87		0	0	0	
527	23	1	83	196	2	98	5	95	96	1	Desinfektionsmittel
528	59	1	84	186	1	55	5	59	60	0	
529	30	1	102	189	4	88	4	85	89	0	
530	39	1	110	196	9	74	5	0	0	0	
531	20	1	87	197	1	94		0	0	1	Tonerpatronen
532	48	2	81	161	1	67		0	0	0	
533	38	2	63	170	9	98		0	0	0	
534	43	1	92	193	1	70		0	0	0	
535	34	2	65	168	1	81		0	0	0	
536	44	2	68	169	1	91	1	70	82	0	
537	46	1	86	182	9	68	5	72	73	0	
538	33	2	62	165	9	84		0	0	0	
539	51	2	85	175	0	0	9	61	79	0	
540	23	2	69	178	1	91		0	0	0	
542	37	1	58	160	2	91		0	0	0	
543	44	1	74	178	1	78		0	0	0	

## Anhang

---

Probe	Alter	Geschlecht	Gewicht	Größe	Beruf_j	BJ_seit	Beruf_a	Ba_von	Ba_bis	Stoffe	genannte Stoffe
684	41	1	87	184	1	87	1	81	86	0	
685	39	2	80	163	2	90	2	76	80	0	
686	42	1	72	185	1	72	5	75	76	0	
687	35	1	92	180	1	90	9	80	88	0	
688	27	2	50	170	1	95	1	87	94	0	
689	21	2	83	174	1	97	9	94	97	0	
690	31	2	58	170	1	91	1	83	90	0	
691	46	2	62	162	1	82		0	0	0	
692	33	2	68	172	1	90		0	0	0	
693	37	2	66	167	1	75		0	0	0	
694	40	2	61	173	1	80	1	74	80	0	
695	31	2	56	172	1	88	1	84	88	0	
696	40	2	74	183	1	72		0	0	0	
697	28	1	68	180	1	86		0	0	0	
698	42	2	53	172	2	84		0	0	0	
699	43	1	89	182	1	74	9	71	74	0	

## Anhang

**Tabelle 28:** Anamnese über Fragebogen Teil 2 (Legende siehe im Anschluss an Tabelle 38)

Probe	Raucher	R_vor	Medik	Med	Spreng	Leber	Niere	Blutb	Wohn	W_seit
101	1	0	0		0	0	0	0	4	67
102	1	0	0		0	0	0	0	4	80
103	1	1	1	Acercomp	0	0	0	0	4	83
104	1	0	1	Atenolol 100, Nifical Retard	0	0	0	0	3	70
105	1	1	1	Tensobon, Berotec, Berodual, Euphylin	0	0	0	0	3	80
106	1	1	1	Foligan, Isoket, Bisoprolol	0	0	0	0	3	41
107	1	1	1	Betablocker	0	0	0	0	3	57
108	1	1	0		0	0	0	0	4	77
109	3	1	0		0	0	0	0	4	75
110	2	0	0		0	0	0	0	4	72
111	3	0	0		0	0	0	0	4	57
112	2	0	1	Carbimazol, Eferox	0	0	0	0	4	86
113	1	1	0		0	0	0	0	4	78
114	2	0	0		0	0	0	0	4	81
115	3	0	1	Pille	0	0	0	0	4	96
116	1	1	1	Eisenprparat	0	0	0	1	4	94
117	1	1	0		0	0	0	0	3	84
118	2	0	1	Insulin, Nifedipin, Aspirin	0	0	0	0	4	83
119	2	0	1	Jodthyrox	0	0	0	0	4	55
120	1	0	0		0	0	0	0	3	73
121	1	1	1	Hormone	0	0	0	0	3	88
122	1	0	0		0	0	0	0	1	92
123	1	0	0		0	0	0	0	4	94
124	1	0	0		0	0	0	0	4	73
125	1	1	0		0	0	0	0	3	80
126	1	1	0		0	0	0	0	4	80
127	1	1	1	L-Thyroxin	0	0	0	0	4	89
128	1	1	0		0	0	0	0	3	64
129	1	0	1	Gestagen-Vstrogen-Kombination	0	0	0	0	4	90
130	1	0	0		0	0	0	0	4	58
131	2	0	1	Concor, Dynorm, Jodid 200	0	0	0	0	4	50
132	1	1	0		0	0	0	0	4	65
133	3	0	0		0	0	0	0	4	44
134	1	1	1	Ortholmmun C	0	0	0	0	4	47
135	1	1	1	Lopresor	0	0	0	0	4	80
136	2	0	0		0	0	0	0	4	56
137	1	1	0		0	0	0	0	3	91
138	1	1	1	Ismo, Ass, Nifedipin	0	0	1	0	4	84
139	1	1	1	Antibiotika, Magensdureblocker	0	0	0	0	1	93
140	1	0	0		0	0	0	0	2	92
141	1	0	1	Pille, Dihydergot	0	0	0	0	1	95
142	1	0	0		0	0	0	0	3	91
201	1	0	0		0	0	0	0	4	52
202	1	0	0		0	0	0	0	3	62
203	1	0	1	Diane 35, Aspirin	0	0	0	0	4	69

## Anhang

Probe	Raucher	R_vor	Medik	Med	Spreng	Leber	Niere	Blutb	Wohn	W_seit
204	1	0	0		0	0	0	0	4	53
205	1	0	0		0	0	0	0	3	93
206	2	0	0		0	0	0	0	4	63
207	2	0	1	Valette	0	0	0	1	3	97
208	1	0	1	Liserdol	0	0	0	0	2	92
209	1	1	0		0	0	0	0	1	89
210	5	0	0		0	0	0	0	4	94
211	1	1	1	Pille	0	0	0	0	4	80
212	1	0	0		0	0	0	0	4	96
213	3	0	1	Allopurinol	0	0	0	0	3	85
214	2	0	0		0	0	0	0	4	87
215	2	0	1	Diane-35	0	0	0	0	4	96
216	1	1	1	Jodthyrox	0	0	0	0	4	85
217	3	0	0		0	0	0	0	1	94
218	1	0	0		0	0	0	0	4	96
219	1	0	0		0	0	0	0	4	92
220	3	0	0		0	0	0	0	3	69
222	1	0	0		0	0	0	0	4	91
223	1	0	0		0	0	0	0	4	64
224	1	0	0		0	0	0	0	4	79
301	3	0	0		0	0	0	0	3	83
302	1	0	0		0	0	0	0	4	80
303	1	0	0		0	0	0	0	4	96
304	1	0	1	Pociton, Befilerat	0	0	0	0	4	75
305	2	0	1	Aerodur-Pulver, Serevent-Dosier-Aerosol	0	0	0	0	4	91
306	2	0	1	Agnucaston	0	0	0	0	4	62
307	1	0	0		0	0	0	0	4	95
308	1	0	0		0	0	0	0	4	90
309	1	0	0		0	0	0	0	4	73
310	1	0	0		0	0	0	0	4	89
311	1	0	0		0	0	0	0	4	85
312	1	0	0		0	0	0	0	4	71
313	1	1	0		0	0	0	0	4	93
314	kA	0	1	Cilest, Foradil	0	0	0	0	4	92
315	1	0	1	Orale Contraceptiva	0	0	0	0	4	93
316	2	0	1	Monostep	0	0	0	0	4	91
317	2	0	0		0	0	0	0	4	70
319	1	0	0		0	0	0	0	4	62
320	2	0	1	Pille	0	0	0	0	4	93
321	3	0	0		0	0	0	0	4	65
322	1	0	0		0	0	0	0	4	76
323	2	0	0		0	0	0	0	4	97
324	1	0	0		0	1	0	0	4	87
325	1	0	0		0	0	0	0	4	95
326	1	0	0		0	0	0	0	4	59
327	1	0	0		0	0	0	0	4	64
328	1	0	0		0	0	0	0	4	93
329	1	1	1	Pille	0	0	0	0	4	65

## Anhang

Probe	Raucher	R_vor	Medik	Med	Spreng	Leber	Niere	Blutb	Wohn	W_seit
330	3	0	0		0	0	0	0	4	95
331	1	0	1	Venostatin, Vitamin B	0	0	0	0	4	66
332	1	0	1	Imodium akut, Pasperfin	0	0	0	0	4	70
333	1	0	1	Digimerck minor, Atemolol, Captroprie	0	0	0	0	4	52
334	1	0	1		0	0	0	0	4	67
335	1	0	0		0	0	0	0	4	24
336	1	0	1	Jodthyrox, Kliogest N	0	0	0	0	4	55
401	1	0	1	Delixplus	0	0	0	0	2	71
402	1	1	0		0	0	0	0	3	85
403	1	1	0		0	0	0	0	2	37
404	2	0	0		0	0	0	0	3	83
405	1	0	0		0	0	0	0	2	87
406	1	0	0		0	0	0	0	2	77
407	1	0	1	Marvelon	0	0	0	0	2	70
408	1	0	0		0	0	0	0	2	68
409	2	0	0		0	0	0	0	3	66
410	1	1	1	Avelix, Norvase, Agopton, Diclopfenae	0	0	0	0	3	65
411	3	0	1	Euthyrox	0	0	0	0	2	86
412	1	0	1	Herzmedikamente, Beruhigungsmittel	0	0	0	0	2	67
413	1	0	0		0	0	0	0	1	71
414	1	0	0		0	0	0	0	3	72
415	1	0	0		0	0	0	0	1	77
416	1	0	0		0	0	0	0	1	73
417	2	0	0		0	0	0	0	2	97
418	2	0	0		0	1	0	0	2	59
419	1	0	0		0	0	0	0	1	51
420	1	0	0		0	0	0	0	2	97
421	2	0	0		0	0	0	0	2	38
422	1	0	0		0	0	0	0	2	86
423	3	0	0		0	0	0	0	3	60
424	1	0	0		0	0	0	0	2	45
425	1	1	1	Cardular, Moduretik	0	0	0	0	2	49
426	1	0	1	Hormone	0	0	0	0	2	71
427	1	0	1	Jodminerase, Pramino	0	0	0	0	2	0
428	1	1	0		1	0	0	0	2	58
429	2	0	1	Blutdrucktabletten	0	0	0	0	3	59
430	5	0	0		0	0	0	0	3	83
431	2	0	0		0	0	0	0	3	97
432	1	0	0		0	0	0	0	2	56
434	1	1	0		0	0	0	0	3	90
435	1	0	0		0	0	0	0	3	85
436	2	0	1	Pille	0	0	0	0	2	86
437	2	0	1	Triquilar	0	0	0	0	3	74
438	1	0	0		0	0	0	0	3	77
439	1	0	0		0	0	0	0	1	64
440	1	1	0		0	0	0	0	2	84

## Anhang

Probe	Raucher	R_vor	Medik	Med	Spreng	Leber	Niere	Blutb	Wohn	W_seit
441	2	1	0		0	0	0	0	3	92
442	1	1	0		0	0	0	0	1	49
443	1	0	1	Solosin retard, Decortin, Aarane	0	0	0	0	3	52
501	1	0	1	Microgynon 50	0	0	0	0	3	96
502	1	0	1	Diblocin, Locor 20	0	0	0	0	2	72
503	1	0	0		0	0	0	0	2	72
504	1	0	1	Xanef 5, Gingko-Stada, Sedariston, Cyclo-Menorette	0	0	0	0	3	45
505	1	0	1	Euthyrox	0	0	0	0	3	78
506	2	0	0		0	0	0	0	3	85
507	1	0	0		0	0	0	0	3	69
508	1	1	0		0	0	0	0	3	65
509	1	0	0		0	0	0	0	3	75
510	1	1	1	Jodthyrox	0	0	0	0	3	81
511	1	0	0		0	0	0	0	3	80
512	1	0	1	Euthyrox 100, Klimonorm	0	0	0	0	2	80
513	5	0	0		1	0	0	0	1	55
514	2	0	1	Unat RR	0	0	0	0	1	59
515	1	0	0		0	0	0	0	2	66
516	1	1	1	ASS 300	0	0	0	0	3	81
517	1	0	1	Concor 5	0	0	0	0	1	93
518	2	1	0		0	0	0	0	3	71
519	2	0	1	Ossofortil	0	0	0	0	3	82
520	2	0	0		0	0	0	0	2	91
521	1	0	0		0	0	0	0	1	61
522	1	1	1	Merinacor, Zieloric, Azuprortat	0	0	0	0	1	45
523	5	0	0		0	0	0	0	1	61
524	1	0	0		0	0	0	0	3	64
525	1	0	1	Sultanol-Spray	0	0	0	0	1	74
526	1	1	1	Jodid, Kalium, Folsdure-Prdparat	0	0	0	0	3	68
527	1	0	0		0	0	0	0	3	75
528	1	1	1	Betablocker	0	0	0	0	3	38
529	1	0	0		0	0	0	0	1	67
530	1	0	0		0	0	0	0	1	76
531	1	0	0		0	0	0	0	3	83
532	1	0	1	Lorzaar 50	0	0	0	0	2	50
533	1	1	1	Pleon RA, Allergospasmin, Pulmicort	0	0	0	0	1	97
534	1	1	0		0	0	0	0	1	83
535	1	0	0		0	0	0	0	3	63
536	3	0	0		0	0	0	0	2	76
537	1	0	0		0	0	0	0	2	52
538	2	0	1	Microgynon	0	0	0	0	2	64
539	1	1	1	Hormone	0	0	0	0	3	80
540	2	1	0		0	0	0	0	3	96
542	1	0	0		0	0	0	0	1	94



## Anhang

Probe	Raucher	R_vor	Medik	Med	Spreng	Leber	Niere	Blutb	Wohn	W_seit
543	1	0	0		0	0	0	0	3	78
684	1	0	0		0	0	0	0	3	87
685	1	1	0		0	0	0	0	3	81
686	1	0	0		0	0	0	0	2	93
687	1	0	0		0	0	0	0	2	63
688	1	0	0		0	0	0	0	2	71
689	1	1	1	Pille	0	0	0	0	3	94
690	1	0	1	Thyreostatikum	0	0	0	0	1	67
691	1	1	1	L-Thyroxin	0	0	0	0	3	52
692	1	1	0		0	0	0	0	1	93
693	1	1	0		0	0	0	0	1	98
694	1	1	1	Femranette	0	0	0	0	3	90
695	1	0	0		0	0	0	0	2	67
696	1	1	1	Marvelon	0	0	0	0	3	57
697	1	0	0		0	0	0	0	1	91
698	1	1	0		0	0	0	0	2	88
699	1	0	0		0	0	0	0	2	81

**Tabelle 29:** Anamnese über Fragebogen Teil 3 (Legende siehe im Anschluss an Tabelle)

Probe	Abgas	Verkehr	Garten	Renov	Ernaeh	Demet	Kaff	SwTee	KrTee	Kakao	Bier	Wein	Obsts
101	0	1	0	0	1	0	2	0	2	0	0	0	0
102	0	0	0	0	1	0	4	1	0	0	0	1	1
103	0	0	1	0	1	1	3	3	0	0	0	2	0
104	0	0	0	1	1	0	2	2	0	0	0	0	0
105	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0
106	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0
107	0	1	1	0	1	0	2	0	5	0	3	0	0
108	0	0	1	0	1	0	3	6	0	0	0	1	0
109	0	1	0	0	1	0	5	0	0	0	2	0	1
110	0	1	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	1
111	0	0	1	1	1	0	0	7	0	0	0	0	1
112	0	0	1	0	1	1	4	0	2	0	0	0	2
113	0	0	0	0	1	0	2	2	3	0	0	0	0
114	0	1	0	1	1	0	4	0	2	0	1	0	1
115	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
116	0	0	0	1	1	0	3	0	4	0	0	0	0
117	0	0	1	0	1	0	6	0	0	0	0	2	0
118	0	0	0	0	1	0	5	0	0	0	0	0	0
119	0	0	0	0	1	0	4	2	0	0	0	0	0
120	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0
121	0	0	0	0	1	0	4	0	2	0	0	0	2
122	0	0	1	1	1	0	0	6	0	0	0	0	0
123	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	3
124	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	1
125	1	0	1	0	1	0	5	0	1	0	0	0	0
126	0	0	1	0	1	0	3	2	0	0	0	0	0
127	1	0	1	0	1	0	2	0	8	0	0	0	1
128	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	2	0	0
129	0	1	0	0	1	0	1	4	1	0	0	0	0
130	0	1	0	0	1	0	2	0	2	0	0	0	0
131	0	0	0	1	1	0	4	0	2	0	0	0	0

## Anhang

Probe	Abgas	Verkehr	Garten	Renov	Ernaeh	Demet	Kaff	SwTee	KrTee	Kakao	Bier	Wein	Obsts
132	1	0	1	0	1	0	5	0	0	0	1	0	0
133	0	0	1	1	1	0	0	4	0	0	3	0	0
134	0	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0	1	1
135	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
136	0	1	1	1	1	0	4	0	0	0	1	0	2
137	1	1	1	0	1	0	4	6	2	0	0	0	0
138	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	3	0	1
139	0	0	1	0	1	0	0	0	5	0	0	0	0
140	0	0	1	0	1	0	6	0	2	0	0	0	1
141	0	0	1	0	1	0	5	0	0	0	0	0	2
142	0	0	1	0	1	0	2	1	1	0	0	0	2
201	1	1	1	0	1	0	3	1	0	1	0	0	2
202	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
203	1	0	1	0	2	0	2	2	1	0	0	0	0
204	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	0	0	1
205	0	0	0	0	1	0	2	2	0	0	0	0	1
206	0	1	0	0	1	0	2	1	0	0	1	1	9
207	0	1	0	0	1	0	1	2	0	0	0	0	1
208	0	1	0	1	1	0	3	0	0	0	0	0	2
209	0	0	1	0	1	0	0	4	0	0	0	1	1
210	0	1	0	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0
211	0	0	1	0	1	1	2	2	0	0	0	0	6
212	0	0	1	0	1	0	0	5	0	0	0	0	1
213	0	0	1	1	1	0	5	0	0	0	0	0	0
214	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
215	0	1	0	0	1	0	1	2	0	0	0	0	2
216	0	0	1	0	1	0	2	0	2	3	0	0	2
217	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2
218	0	0	1	0	1	0	3	3	1	0	2	0	0
219	0	1	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	1
220	0	0	1	0	1	0	5	0	0	2	3	0	5
222	0	0	0	0	1	0	3	0	3	0	0	1	1
223	0	0	1	1	1	0	2	2	2	0	0	2	0
224	0	0	1	0	1	1	2	1	0	1	0	0	2
301	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	2	0	2
302	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
303	0	0	0	1	1	0	3	0	2	0	0	0	2
304	0	0	0	0	1	0	2	0	4	0	0	0	3
305	0	1	1	0	1	0	4	1	0	0	0	0	0
306	0	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0
307	0	1	0	0	1	0	6	6	0	0	0	0	0
308	1	1	1	0	1	0	2	2	0	0	0	0	0
309	0	0	1	1	1	0	2	0	0	1	0	0	1
310	0	0	1	0	1	0	1	3	0	2	0	0	1
311	0	0	1	0	1	0	5	1	2	0	0	0	0
312	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1
313	0	0	0	0	1	0	3	3	1	0	0	0	0
314	0	0	0	0	2	1	1	0	1	0	0	1	2
315	0	0	0	0	1	0	2	4	2	0	0	0	0
316	0	1	0	0	1	0	3	1	5	0	1	0	0
317	0	0	0	1	1	0	4	0	0	0	0	0	0
319	0	0	0	0	1	0	0	5	0	0	0	0	0
320	0	0	0	0	1	0	3	1	2	0	1	1	0
321	0	1	0	0	1	0	4	0	0	0	5	0	0
322	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	9

## Anhang

Probe	Abgas	Verkehr	Garten	Renov	Ernaeh	Demet	Kaff	SwTee	KrTee	Kakao	Bier	Wein	Obsts
323	0	0	1	0	1	0	8	0	0	0	0	0	0
324	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
325	0	1	0	1	1	0	4	0	0	0	2	2	2
326	0	0	1	0	1	0	5	0	0	0	0	0	0
327	0	0	1	1	1	0	2	0	0	0	0	1	0
328	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
329	0	0	1	0	1	0	6	0	0	0	0	0	0
330	0	0	1	1	1	0	8	0	0	0	0	0	0
331	0	0	1	0	1	0	2	0	3	0	1	0	2
332	0	0	1	0	1	0	2	2	1	0	0	0	1
333	0	0	1	0	1	0	2	0	6	0	0	0	0
334	0	0	1	0	1	0	4	3	0	0	0	0	2
335	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
336	0	0	0	0	1	0	3	0	4	0	0	0	2
401	0	0	1	0	1	0	2	5	0	0	0	0	2
402	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	1	0	2
403	0	0	1	0	1	0	0	3	2	0	1	1	1
404	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	0	0	1
405	0	0	1	0	1	0	0	2	2	0	0	0	0
406	0	0	1	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0
407	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0
408	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0
409	0	0	1	1	1	0	6	0	2	0	0	0	0
410	0	0	0	0	1	0	4	1	0	0	0	0	2
411	0	0	0	0	1	0	3	0	3	0	4	0	3
412	0	0	1	1	1	0	4	0	2	0	0	0	0
413	0	0	1	0	1	0	2	0	2	0	0	0	1
414	0	0	1	1	1	0	2	0	1	2	0	0	0
415	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0
416	0	0	1	0	1	0	4	0	0	0	0	0	1
417	1	0	1	0	1	0	2	1	0	0	2	0	2
418	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0
419	0	0	1	0	1	0	1	0	3	0	0	0	0
420	0	0	1	1	1	0	1	2	1	1	0	0	1
421	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	1	1	0
422	0	1	1	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0
423	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	3	0	1
424	0	0	1	0	1	0	3	0	0	1	0	0	0
425	0	0	1	0	1	0	6	0	0	0	0	0	0
426	0	0	1	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0
427	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0
428	0	0	1	0	1	0	1	3	0	0	0	0	3
429	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	2
430	0	0	1	0	1	0	4	2	0	0	0	1	0
431	0	0	1	0	1	0	9	0	0	0	2	0	0
432	0	0	1	0	1	1	3	0	2	0	0	2	1
434	0	0	1	0	1	0	5	1	0	0	2	0	1
435	0	0	1	1	1	0	3	0	1	0	0	0	0
436	0	1	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0
437	0	0	1	0	1	0	7	0	0	2	0	0	2
438	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	2
439	0	0	1	1	1	0	0	0	0	2	0	0	2
440	1	1	1	0	1	1	4	0	0	0	0	0	0
441	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	0	0	2
442	0	0	1	1	1	1	2	0	2	0	0	5	5

## Anhang

Probe	Abgas	Verkehr	Garten	Renov	Ernaeh	Demet	Kaff	SwTee	KrTee	Kakao	Bier	Wein	Obsts
443	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	0	1	0
501	0	0	1	0	1	0	3	1	2	0	1	1	1
502	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
503	1	0	1	0	1	0	3	0	0	1	0	0	2
504	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0
505	0	0	1	0	1	1	1	4	1	0	0	1	0
506	0	0	1	1	1	0	6	0	0	0	0	0	0
507	0	0	1	0	1	0	0	0	4	0	0	0	0
508	0	0	1	0	1	0	4	0	0	0	1	0	1
509	0	0	1	0	1	0	5	0	0	0	1	0	3
510	0	0	1	0	1	0	3	2	0	0	0	0	1
511	0	0	1	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0
512	0	0	1	0	1	0	1	4	1	0	0	0	1
513	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0
514	0	0	1	1	1	0	0	0	4	0	0	0	1
515	0	1	1	0	1	0	0	4	0	0	0	0	0
516	0	0	1	0	1	0	8	0	0	0	2	0	0
517	0	0	1	1	1	0	4	0	0	0	0	1	0
518	0	0	1	0	1	0	3	0	0	3	0	0	2
519	0	0	1	1	1	0	4	0	0	0	1	0	4
520	0	1	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	1
521	0	0	1	0	1	1	3	0	5	0	0	0	2
522	0	0	1	0	1	0	5	0	0	0	0	0	0
523	0	0	1	0	1	1	3	0	1	0	1	0	0
524	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0
525	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
526	0	0	1	0	1	0	2	3	0	0	0	0	2
527	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
528	0	1	1	0	1	0	3	0	0	0	2	0	0
529	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
530	0	0	1	0	1	0	5	0	0	0	0	0	0
531	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	2
532	0	1	1	0	1	0	3	3	0	0	0	0	0
533	0	0	1	0	1	0	6	0	0	0	0	1	1
534	1	0	1	0	1	0	5	0	0	0	1	0	1
535	0	1	0	1	1	0	4	0	0	0	0	0	0
536	0	0	1	0	1	0	6	0	0	0	1	0	2
537	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	2	0	0
538	0	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0	1	0
539	0	0	1	0	1	0	4	0	0	0	0	0	2
540	0	1	0	0	1	0	3	0	0	1	0	0	2
542	0	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0	0	3
543	0	0	1	0	1	1	1	4	1	0	0	1	0
684	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	2
685	0	1	0	0	1	0	4	0	2	0	0	0	1
686	0	0	1	0	1	1	5	0	0	0	0	0	3
687	0	0	1	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0
688	0	0	1	0	1	0	4	0	0	0	0	0	1
689	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	3
690	0	0	1	0	2	0	0	2	6	0	0	0	1
691	0	1	1	1	1	0	6	0	0	0	0	0	0
692	0	0	0	0	1	0	8	0	2	0	0	0	0
693	0	0	1	0	1	0	6	0	0	0	0	0	0
694	0	0	1	0	1	0	0	0	6	0	0	0	0
695	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0

## Anhang

Probe	Abgas	Verkehr	Garten	Renov	Ernaeh	Demet	Kaff	SwTee	KrTee	Kakao	Bier	Wein	Obsts
696	0	0	1	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0
697	0	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0	0	0
698	0	0	1	0	1	0	5	0	0	0	0	2	2
699	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0

## Legende

Probe	Code-Nr.: >100 und <400 = Ruhrgebiet Code-Nr.: >400 = Münsterland
Alter	Alter in Jahren
Geschlecht	männlich = 1; weiblich = 2
Gewicht	Gewicht in kg
Größe	Größe in cm
Beruf_j	derzeit ausgeübter Beruf: 1= Verwaltung; 2=Medizin und Labor; 3=Handwerk, 4=Land- und Forstwirtschaft; 5=Bundeswehr oder Armee; 9= Andere
BJ_seit	Jahr seit dem Beruf_j ausgeübt wird
Beruf_a	früher ausgeübter Beruf: 1= Verwaltung; 2=Medizin und Labor; 3=Handwerk, 4=Land- und Forstwirtschaft; 5=Bundeswehr oder Armee; 9= Andere
Ba_von	Jahr von dem an Beruf_a ausgeübt wurde
Ba_bis	Jahr bis zu dem an Beruf_a ausgeübt wurde
Stoffe	Kontakt/Umgang mit gesundheitsschädlichen Stoffen am Arbeitsplatz: 1=ja; 0=nein
genannte Stoffe	freie Nennung der gesundheitsschädlichen Stoffe, mit denen während der Arbeit umgegangen wird
Raucher	Raucher: 1 = nein; 2 = bis 20 Zigaretten; 3 =>20 Zigaretten; 4 = Zigarre; 5 = Pfeife
R_vor	Exraucher: 1=ja; 0=nein
Medik	Einnahme von Medikamenten: 1=ja; 0=nein
Med	freie Nennung der eingenommenen Medikamente
Spreng	Umgang mit Sprengstoffen: 1=ja; 0=nein
Leber	Bekannte Störung der Leberfunktion: 1=ja; 0=nein
Niere	Bekannte Störung der Nierenfunktion: 1=ja; 0=nein
Blutb	Bekannte Störung des blutbildenden Systems: 1=ja; 0=nein
Wohn	Wohnort: 1=Dorf; 2=Kleinstadt; 3=größere Stadt; 4= Großstadt
W_seit	Wohnort seit: Jahreszahl
Abgas	Belästigung durch Abgase: 1=ja; 0=nein
Verkehr	Wohnhaus an einer verkehrsreichen Straße: 1=ja; 0=nein
Garten	Eigener Garten: 1=ja; 0=nein
Renov	Renovierungsarbeiten innerhalb der letzten 6 Wochen: 1=ja; 0=nein
Ernaeh	Ernährungsgewohnheiten: 1=Mischkost; 2=Vegetarier und Veganer
Demet	Ernährung bevorzugt mit Demeterprodukten: 1=ja; 0=nein
Kaff	Kaffeekonsum: Anzahl getrunkene Tassen pro Tag
SwTee	Konsum von schwarzem Tee: Anzahl getrunkene Tassen
KrTee	Konsum von Kräutertee: Anzahl getrunkene Tassen pro Tag
Kakao	Konsum von Kakao: Anzahl getrunkene Tassen pro Tag
Bier	Bierkonsum: Anzahl getrunkene Flaschen pro Tag
Wein	Konsum von Wein und Sekt: Anzahl getrunkene Gläser pro Tag
Obsts	Konsum von Obstsaft: Anzahl getrunkene Gläser pro Tag