

Charakterisierung
von
genotoxischen organischen Luftstaubextrakten

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Chemiker Michael Fried
aus Heidelberg

2001

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemiker Michael Fried

aus Heidelberg

Datum der mündlichen Prüfung:

30.10.2001

Charakterisierung
von
genotoxischen organischen Luftstaubextrakten

Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Schramm

Prof. Dr. Dr. h.c. Hans-Günther Sonntag

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernhard Schramm gilt mein besonderer Dank für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit, die hilfsbereite Unterstützung und die gewährte Freiheit bei der Anfertigung.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H.-G. Sonntag danke ich für die Möglichkeit meine experimentellen Untersuchungen am Hygiene-Institut durchzuführen und für die organisatorische Unterstützung.

Herrn Dr. Lothar Erdinger danke ich für viele Anregungen, die Beratung bei zahlreichen analytischen und hygienischen Problemen und seine stete Diskussionsbereitschaft in wissenschaftlichen Fragen.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Höpker und seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern von der Landesanstalt für Umweltschutz in Karlsruhe für die gute Zusammenarbeit und die gewährte Unterstützung.

Herrn Dr. Heinz Schmeiser und Herrn Dr. Christian Bieler (DKFZ Heidelberg) danke ich für die Zusammenarbeit und die gewährte Unterstützung.

Herrn Dr. Wolf (GSF München) danke ich für die Zusammenarbeit und die gewährte Unterstützung.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Radim Scram und seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Hygiene-Instituts in Prag für die gute Zusammenarbeit, die gewährte Unterstützung und die Gelegenheit meine Ergebnisse im Rahmen des Copernicus-Projektes in Prag zu präsentieren.

Ingrid Dörr, Matthias Dürr danke ich für die gute Zusammenarbeit und die hilfsbereite Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mechtild Stauder, Frank Kirsch, Rainer Kern, Urs Geisel, Andrew Rastall, Klaus Alföldi und Peyman Rezvani sorgten immer für ein gutes Arbeitsklima und haben mich bei umwelthygienischen Fragen in Rat und Tat unterstützt.

Ute Riffler und Blanka Novak verdienen besondere Anerkennung für die Durchführung der unzähligen Ames-Tests und ihre Unterstützung in biologischen Fragen.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Partnern und den Mitarbeitern der CPVision GmbH für ihre Geduld und das in mich gesetzte Vertrauen.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders, daß sie mir die Möglichkeit gegeben haben meinen naturwissenschaftlichen Interessen nachzugehen und mir dieses Chemiestudium ermöglicht haben.

Prolog

*Ein Geschlecht geht, und ein anderes kommt;
doch die Erde bleibt ewig bestehen. Die Sonne geht auf,
und die Sonne geht unter und eilt an ihren Ort, wo sie aufgeht.
Der Wind weht nach Süden, dann wendet er nach Norden;
er dreht sich, kehrt um und kommt wieder;
so wiederholt der Wind seinen Umlauf ...*

Das Buch der Prediger (Kohélet oder Ecclesiastes)

Altes Testament

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	3
2	EINLEITUNG	6
2.1	EINFÜHRUNG	6
2.2	AUFGABENSTELLUNG	8
3	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	10
3.1	ATMOSPHÄREN-CHEMIE DER TROPOSPHÄRE	10
3.1.1	<i>Organische Luftinhaltsstoffe</i>	10
3.1.2	<i>Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe</i>	10
3.1.3	<i>Nitrierte Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe</i>	12
3.2	MIKROBIOLOGISCHE TESTVERFAHREN	15
3.2.1	<i>Der Salmonella typhimurium Plate Incorporation Assay (Ames-Test)</i>	15
3.2.2	<i>³²P-postlabeling Methode nach Randerath</i>	22
3.3	BIOASSAY DIRIGIERTE FRAKTIONIERUNG	26
4	MATERIAL UND METHODEN	30
4.1	PROBENAHEME	30
4.1.1	<i>Beschreibung der Probenahmestandorte</i>	30
4.1.2	<i>Projektproben</i>	32
4.1.3	<i>Bulkprobenahme – „Langzeitproben“</i>	34
4.1.4	<i>Probenvorbereitung und Lagerung</i>	35
4.1.5	<i>Probenaufarbeitung</i>	35
4.1.6	<i>Standardstaubextrakte</i>	36
4.2	CHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	37
4.2.1	<i>Extraktionsversuche</i>	37
4.2.2	<i>Glühverlust</i>	38
4.2.3	<i>Flüssig/Flüssig Extraktion</i>	39
4.2.4	<i>HPLC-Trennungen</i>	41
4.2.5	<i>Gaschromatographische Untersuchungen</i>	44
4.2.6	<i>Synthese von d₉-l-Nitropyren</i>	46
4.2.7	<i>Derivatisierungen mit etherischer Diazomethanlösung</i>	46
4.2.8	<i>Quantifizierung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen</i>	47
4.2.9	<i>Quantifizierung von nitro polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen</i>	50
4.3	BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	53
4.3.1	<i>Ames-Test der Luftstaubextrakte</i>	53
4.3.2	<i>Ames-Test der fraktionierten Luftstaubextrakte</i>	54
4.3.3	<i>³²P-Postlabeling der Luftstaubextrakte</i>	55
5	ERGEBNISSE	56
5.1	EXTRAKTIONSVERSUCHE	56
5.1.1	<i>Extrahierbarer organischer Massenanteil (EOM)</i>	56
5.1.2	<i>Extrahierbare Genotoxizität</i>	58
5.1.3	<i>Sequentielle Extraktion mit Lösungsmitteln aufsteigender Polarität</i>	62
5.2	FLÜSSIG/FLÜSSIG-EXTRAKTION	64
5.2.1	<i>Untersuchung der Genotoxizität im Ames-Test</i>	65
5.2.2	<i>Untersuchung der Genotoxizität mit TA700x-Teststämmen</i>	70

5.3	HPLC-METHODENENTWICKLUNG	73
5.3.1	<i>Reversed-Phase Trennungen</i>	73
5.3.2	<i>Nichtwässrige Größenausschlußchromatographie</i>	76
5.3.3	<i>Normalphasenchromatographie</i>	78
5.4	MUTAGENTITÄTSPROFILE DER FRAKTIONIERTEN LUFTSTAUBEXTRAKTE	83
5.4.1	<i>Optimierung der HPLC-Mutagramme</i>	83
5.4.2	<i>Mutagramme von unterschiedlichen Luftstaubextrakten</i>	91
5.4.3	<i>Mutagramme von vorbehandelten Extrakten</i>	97
5.4.4	<i>Mutagramme aus unterschiedlicher biologischer Testdurchführung</i>	100
5.5	UNTERSUCHUNGEN MIT DEM ³² P-POSTLABELING VERFAHREN NACH RANDERATH....	103
5.6	CHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	107
5.6.1	<i>Zuordnung von Stoffgruppen zu den HPLC-Fractionen</i>	107
5.6.2	<i>Quantitative Analyse der PAK und NitroPAK</i>	110
5.6.3	<i>Quantitative Analyse der tschechischen Luftstaubextrakte</i>	112
5.6.4	<i>Quantitative Analyse von Luftstaubextrakten aus Baden-Württemberg</i>	116
5.6.5	<i>Analyse der mutagen wirksamen Flüssig/Flüssig-Extraktionsfraktionen</i>	118
5.6.6	<i>Analyse der mutagen wirksamen HPLC-Fractionen</i>	122
6	DISKUSSION	133
6.1	EXTRAKTION	136
6.2	FRAKTIONIERUNG	138
6.3	CHARAKTERISIERUNG DER INHALTSSTOFFE	142
7	ANHANG	146
7.1	UMEG MEBSTATIONEN	146
7.2	MS/MS PARAMETER DER NITRO PAK METHODE	148
7.3	MSD-PARAMETER DER PAH METHODE	151
7.4	AQS PAH-RINGVERSUCHSZERTIFIKAT	152
7.5	ABKÜRZUNGEN	153
7.6	ABLAUFSHEMA DER ³² P-POSTLABELING METHODE.....	154
7.7	PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN	155
7.7.1	<i>Publikationen</i>	155
7.7.2	<i>Posterpräsentationen</i>	157
7.7.3	<i>Vorträge</i>	158
7.8	ORIGINALDATEN	159
8	LITERATUR	181

1 Zusammenfassung

Emissionen aus Kfz-Verkehr, Industrie und Hausbrand belasten die Atmosphäre mit gasförmigen Schadstoffen und Staubpartikeln. An der Partikeloberfläche sind organische Verbindungen adsorbiert, die eine genotoxische Aktivität in biologischen Testsystemen wie z.B. dem Ames-Test aufweisen.

Zur Identifizierung der partikelgebundenen, genotoxisch wirksamen Luftschadstoffe wurden kommerziell erhältliche, zertifizierte Standardstäube (NIST SRM1649, NIST SRM1648, NIST Vehicle Exhaust Particulate Matter), Luftstaubproben aus 8 verschiedenen Städten Baden-Württembergs (Deutschland) sowie Industrieabgaspartikel aus Kosice (Tschechien) und Ostrava (Slovakei) untersucht. Der organisch extrahierbare Anteil (EOM) wurde über eine 24-stündige Soxhletextraktion mit Aceton als Extraktionsmittel erhalten und ergab zwischen 9 und 21 Gew.-% je nach Art und Herkunft des Probematerials.

Eine Charakterisierung der Säure/Base-Eigenschaften der genotoxischen Verbindungen wurde über eine Flüssig/Flüssig Trennung der acetonischen Luftstaubextrakte vorgenommen. Es wurden vier Fraktionen erhalten, die Verbindungen mit stark sauren, schwach sauren, basischen bzw. neutralen Eigenschaften enthielten. Die Fraktionen der untersuchten Luftstaubmaterialien zeigten unterschiedliche Verteilungsmuster der biologischen Aktivität im Ames-Test. Für die Extrakte von atmosphärischen Luftstäuben zeigte die Fraktion der stark sauren Verbindungen die höchste genotoxische Aktivität. Die Kfz- bzw. Kokereiabgaspartikelextrakte wiesen die höchste Genotoxizität in der Fraktion der neutralen Substanzklassen auf.

Diese unterschiedliche Verteilung läßt sich über den Gehalt an polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in den Extrakten erklären. Der Anteil an polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) ist in den direkt emittierten Staubpartikeln größer als in den atmosphärischen Luftstäuben.

Zur Überprüfung dieser biologischen Befunde wurden aus Kokereiabgaspartikelextrakten sowie ausgewählten, atmosphärischen Luftstaubextrakten die Konzentrationen für 16 Referenz-PAK mittels GC/MS sowie für 6 Referenz nitro-PAK über GC/MS² bestimmt. Für die Quantifizierung wurde d₉-1-Nitropyren synthetisiert und als interner Standard eingesetzt. Die Gehalte der einzelnen PAK aus Kokereiabgaspartikelextrakten lagen zwischen 0,5-17 µg/mg EOM, die nitro-PAK Konzentrationen erreichten Werte zwischen 0,2-2 ng/mg EOM. Vergleichsweise wurden die PAK-Konzentrationen (0,2-3 µg/mg EOM) einer Luftstaubprobe

aus der tschechischen Stadt Teplice ermittelt. Die PAK-Konzentrationen der Standorte Mannheim Nord, Mannheim Mitte und Freiburg Mitte liegen in einem Bereich zwischen 0,1 bis 2,9 ng/m³ Luft. Die wesentlich höheren PAK-Konzentrationen in den Luftstaubextrakten aus Teplice sind zum größten Teil auf die Verfeuerung von Braunkohle zurück zu führen.

Ein Schwerpunkt der experimentellen Arbeit zur stofflichen Charakterisierung der mutagenen, luftgetragenen Verbindungen lag in der Entwicklung einer HPLC-Methode zur Fraktionierung der organischen Luftstaubextrakte. Das wichtigste Kriterium für die Eignung der Trennmethode war die direkte Verwendbarkeit der HPLC-Fractionen für anschließende biologische und chemische Experimente. Die Problemstellung der Biotest-Kompatibilität sowie der direkten Analyse mittels GC/MS der HPLC-Fractionen konnte mit einer cyanopropyl-modifizierten Silicagelsäule und einem n-Hexan/1,4-Dioxan Gradienten gelöst werden. Die Aufzeichnung der HPLC-Chromatogramme erfolgte über einen UV/VIS Detektor und einem nachgeschalteten Fluoreszenzdetektor. Das Eluat wurde mit einem automatischen Fraktionsprobensammler in Fraktionen von konstanter Zeitauflösung gesammelt und das genotoxische Potential jeder einzelnen Fraktion im Ames-Test bestimmt.

Die erhaltenen zeitlichen Mutagenitätsprofile „Mutagramme“ der Luftstaubproben aus den verschiedenen Probenahmestandorten sowie der Referenzstäube aus Washington DC (NIST SRM1649) und St. Louis (NIST SRM1648) zeigten ein ausgeprägtes Maximum der biologischen Aktivität in einem für polare Substanzklassen charakteristischen Retentionszeitbereich. Vergleicht man das Mutagramm der „stark sauren Fraktion“ aus der Flüssig/Flüssig Trennung mit den Mutagrammen der unbehandelten Extrakte liegt das Maximum der genotoxischen Aktivität bei der gleichen Retentionszeit.

Die Variation der biologischen Testparameter, wie Salmonellenstamm oder Zugabe eines metabolisch aktiven Enzymsystems, veränderte die Peakmuster im Mutagramm. Bei der Durchführung mit Rattenleberhomogenat verschwand das Maximum im Mutagramm. Diese Beobachtung kann so interpretiert werden, daß die genotoxischen Verbindungen direkt wirksame Mutagene sind, die durch das eingesetzte Enzymgemisch metabolisiert bzw. desaktiviert werden können. Eine ähnliche Beobachtung ergibt sich, wenn als Teststamm TA100 verwendet wurde. In diesem Fall zeigte sich kein Maximum im Mutagramm. Die mutagenen Verbindungen, die mit der HPLC-Methode aufgetrennt werden konnten, scheinen somit Rasterschubmutationen und nur in geringem Umfang Basenaustauschmutationen hervorzurufen.

Neben dem in-vitro Bakterientestsystem Ames-Test wurden Luftstaubextrakte aus Freiburg und dem Referenzmaterial NIST SRM1648 sowie deren Fraktionen im ^{32}P -postlabeling Verfahren auf ihre DNA-Adduktbildung untersucht. Die Fraktion der starken Säuren aus dem Flüssig/Flüssig Trennungsgang wies die größten Adduktierungsraten auf. Die RAL-Werte der Fraktionen zeigten im ^{32}P -postlabeling an Kalbsthymus-DNA jedoch wesentlich geringere Unterschiede als im Ames-Test auf. Für die Fraktionen aus der HPLC-Trennung konnten mit einer zeitlichen Auflösung von 10 Minuten die Adduktierungsraten bestimmt werden.

Parallel zu den Untersuchungen in biologischen Testsystemen zur Bestimmung der genotoxischen Aktivität wurden die Luftstaubextrakte mit analytischen Methoden untersucht, um die genotoxischen Inhaltsstoffe chemisch zu charakterisieren. Die Luftstaubextrakte sowie deren Fraktionen wurden mit gaschromatographischen Gerätekopplungen wie GC/FID, GC/ECD, GC/EI-MSD, GC/EI-MS (Iontrap), GC/CI-MS (Iontrap) und GC/AED untersucht.

Unpolare Verbindungen wie PAK oder einfach nitrierte PAK liessen sich nur in den Fraktionen vor dem Maximum der genotoxischen Aktivität im Mutagramm identifizieren. Diese Substanzklassen können somit nicht direkt das genotoxische Potential der Luftstaubextrakte bewirken.

Die Fraktion der „starken Säuren“ aus dem Flüssig/Flüssig Trennungsgang enthält hauptsächlich aliphatische und aromatische Oxyverbindungen wie z.B. Fettsäuremethylester oder Fluoren-9-on. In den methylierten HPLC-Fraktionen am Maximum im Mutagramm konnten massenspektrometrisch einige Verbindungen identifiziert werden. Unter den identifizierten methylierten Verbindungen finden sich aromatische Carbonsäuremethylester wie Phthalsäuredimethylester, 1,8-Naphthalindicarbonsäuremethylester, 1-Phenanthren-carbonsäuremethylesteranaloga, Indol-derivate und höhere aliphatische Carbonsäureester. Über diese Verbindungen kann das genotoxische Potential der Fraktionen jedoch bislang nicht quantitativ erklärt werden. Von großer Bedeutung können schwefelhaltige heterozyklische Verbindungen sein, die in der mutagen wirksamen Fraktion mittels GC/AED und GC/MS nachweisbar sind. Einige dieser Stoffe wie das 2-Methylthiobenzothiazol konnten massenspektrometrisch identifiziert werden.

2 Einleitung

2.1 Einführung

Das Umweltbewußtsein der Bevölkerung der westlichen Industrienationen hat sich in den letzten 25 Jahren verändert. Die Bevölkerung reagiert sensibler auf ihre Umwelt und nimmt Veränderungen in der Umwelt und ihrer Lebensqualität durch anthropogene Eingriffe deutlich wahr. Dieser Wandel spiegelt sich auch in den Forschungsarbeiten der wissenschaftlichen Institutionen wider.

Als Mitte der sechziger Jahre bekannt wurde, daß in US-amerikanischen Städten die zunehmende Belastung der Luft durch den Kraftfahrzeugverkehr zu einem dramatischen Anstieg der Ozonkonzentration in den bodennahen Schichten der Atmosphäre resultierte, führte dies zunächst lediglich in den USA zu staatlichen Maßnahmen. Dort wurden Katalysatoren in Kfz-Abgasanlagen eingebaut, lange bevor erkannt wurde, daß die Emission von Schadstoffen aus Kraftfahrzeugen keineswegs nur auf diesen Erdteil beschränkt ist.

Mit der Entwicklung der massenspektrometrischen Gerätekopplungen in den siebziger Jahren wurde der Grundstein zur Erforschung der organischen Bestandteile der Atmosphäre und ihrer Chemie gelegt. Über die nächsten 15 Jahre entwickelte sich ein eigenständiges Forschungsgebiet mit einem rasanten Anstieg an publizierten Arbeiten^{1, 2, 3}.

Die Hauptaufgabe der Atmosphärenchemie ist die Beschreibung der globalen Verteilung und des Schicksals von chemischen Verbindungen in der Atmosphäre. Der Aufbau, die Dynamik, der Stofftransport und die verfügbare Energie innerhalb der Atmosphäre sind hierbei die bestimmenden Faktoren. Um eine Stoffbilanz eines Luftinhaltsstoffes zu ziehen, ist es notwendig die Ursprünge (Emissionsquellen) und den Mechanismus der Abscheidung dieser Verbindung (Senken) in der Atmosphäre zu kennen. Die regelmäßigen Emissionsmessungen in der Industrie und die Luftqualitätsüberwachung durch staatliche Institutionen geben Auskunft über die Konzentration und die Quelle vieler Verbindungen.

Zwischen Emission und Deposition können diese Verbindungen in der Atmosphäre Reaktionen eingehen. Das Ausmaß an Transformationsreaktionen ist stark an die Verweilzeit und die Reaktionsbedingungen in der Atmosphäre gekoppelt. Die atmosphärische Lebensdauer einiger organischer Verbindungen aus Industrie-, Hausbrand- und KFZ-Emissionen wie z.B. Benzol mit 5 Tagen oder Formaldehyd mit 0,5 Tagen⁴ konnten bestimmt

werden. Bei diesen Transformationsreaktionen spielt das „Waschmittel“ der Atmosphäre, das Hydroxylradikal, eine herausragende Rolle. In Umweltkammern wurden an Einzelverbindungen die Transformationsreaktionen unter Einwirkung von Ozon und nitrosen Gasen simuliert. Über diese atmosphärischen Transformationsprozesse können toxikologisch bedenkliche Substanzen abgebaut werden, jedoch auch gesundheitsschädliche bzw. genotoxische Verbindungen neu entstehen⁵.

Die Untersuchung der genotoxischen, organischen Verbindungen in der Luft erfordert biologische Testsysteme zum Nachweis der genotoxischen Aktivität. Das am häufigsten verwendete Testverfahren ist der „Salmonella typhimurium Plate Incorporation Assay“ (Ames-Test), der gleichzeitig das bislang einzige validierte Testverfahren zur Bestimmung der genotoxischen Potenz darstellt. Aktuelle Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit den komplexen Vielstoffgemischen von Luftstaubextrakten aus belasteten Ballungsgebieten. Diese Luftextrakte stellen eine Mischung aus vielen Einzelverbindungen dar. Bislang ist ungeklärt, durch welche der darin enthaltenen Verbindungen die biologische Aktivität konkret hervorgerufen wird, bzw. ob es sich um einen Effekt handelt, der durch eine Vielzahl von Substanzen bedingt ist⁶. Einige der Verbindungen aus den Extrakten sind identifiziert, die Identität des überwiegenden Teils ist jedoch bislang nicht bekannt. Für die bekannten Einzelverbindungen existieren nur teilweise toxikologische Daten und nur für wenige Substanzen sind Daten aus Biotestverfahren verfügbar⁷. Die Identität der mutagen wirksamen organischen Verbindungen ist der Schlüssel zum Verständnis der genotoxischen Aktivität und der Frage nach der Entstehung dieser Luftschadstoffe.

2.2 Aufgabenstellung

Diese Arbeit entstand im Rahmen von zwei durch das Land Baden-Württemberg geförderten Forschungsprojekten („Projekt Angewandte Ökologie (PAÖ)“, Projektnummer 2095504.02⁸; „Projekt Umwelt und Gesundheit (PUG)“, Projektnummer PUG L96 011).

Eine zentrale Problemstellung dieser Forschungsprojekte lag in der Charakterisierung sowie der Identifizierung von genotoxischen Inhaltsstoffen aus organischen Luftstaubextrakten. Diese Problematik ist der thematische Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Zur Bearbeitung der Aufgabenstellung wurden einzelne Teilaufgaben definiert, die nachfolgend aufgeführt sind.

- In welchem Umfang bestimmt die Polarität des Extraktionsmittels unter Verwendung der Soxhletextraktionsmethode die Extraktionsausbeute hinsichtlich Masse und genotoxischer Aktivität im Ames-Test und welche Rückschlüsse lassen sich hierbei über die Eigenschaften der genotoxischen Verbindungen ziehen?
- Wie hoch ist der theoretisch extrahierbare, organische Anteil an der Partikelmasse?
- Die Entwicklung einer Methode zur Fraktionierung von organischen Luftstaubextrakten unter Berücksichtigung der Biokompatibilität der verwendeten Lösungsmittel sowie der direkten Verwendbarkeit der Fraktionen für anschließende biologische und chemische Experimente.
- Welche Änderung der genotoxischen Aktivität ergibt sich bei der Verwendung unterschiedlicher Bakterienstämme sowie bei der Zugabe von metabolisch aktiven Enzymsystemen und welche Rückschlüsse können so über die Art der genotoxischen Verbindungen gezogen werden?
- Wie können die Fraktionen in der ³²P-postlabeling Methode nach Randerath untersucht werden und welche Informationen können über die Addukte erhalten werden?
- Welche Informationen können bei einem Vergleich der Ames-Test Daten und den Ergebnissen des ³²P-postlabeling Verfahren gewonnen werden?
- Welchen Einfluß hat das untersuchte Staubmaterial und die Belastungssituation zum Zeitpunkt der Probenahme auf die im Ames-Test bestimmbare genotoxische Aktivität?

- Inwieweit unterscheiden sich die Partikelemissionen einer definierten Emissionsquelle (Kokereiabgase CSR) und atmosphärische Luftstäube in biologischen Testsystemen und in ihrer chemischen Zusammensetzung?
- Quantifizierung ausgewählter partikulärer, organischer Luftschadstoffe wie PAK und nitro-PAK als Leitparameter und der Vergleich zwischen atmosphärischen Luftstäuben und direkt emittierten Industrieabgaspartikeln.
- Die Charakterisierung und Identifizierung mutagen wirksamer Verbindungen in organischen Luftstaubextrakten mit Hilfe gaschromatographischer Gerätekopplungen wie GC/FID, GC/ECD, GC/MS und GC/MS² sowie GC/AED.

Um die oben genannten Fragestellungen zu bearbeiten, wurde innerhalb der vorgestellten Arbeit die folgende Vorgehensweise angewandt.

1. Gewinnung der Luftstaubproben mittels „high volume sampling“
2. Soxhletextraktion der Luftstäube mit organischen Lösungsmitteln
3. Fraktionierung der organischen Luftstaubextrakte
4. Untersuchung der Luftstaubextrakte und der Fraktionen in biologischen Testsystemen zur Bestimmung der genotoxischen Aktivität
5. Chemische Analyse der Luftstaubextrakte und der Fraktionen
6. Quantifizierung der PAK und nitro-PAK Konzentrationen in den organischen Luftstaubextrakten als Kenngröße der Belastung der Staubprobe

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Atmosphärenchemie der Troposphäre

3.1.1 Organische Luftinhaltsstoffe

Um das zu untersuchende Probematerial „Luftstaubextrakt“ zu separieren, die Inhaltsstoffe zu charakterisieren und deren genotoxische Potenz zu bestimmen, ist es sinnvoll die Herkunft, die Entstehung und Schicksal einiger prominenter Vertreter der organische Luftinhaltsstoffe zu betrachten. Zu den in der Literatur am besten beschriebenen, relevanten Stoffklassen zählen die Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe sowie ihre nitrierten Derivate⁹. Im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit konnte gezeigt werden, daß die PAK-Konzentration in Luftstaubextrakten mit routinemäßig gemessenen Luftqualitätsparametern wie NO oder CO korreliert und ein direkter Zusammenhang mit der genotoxischen Aktivität des Luftstaubextraktes besteht¹⁰. Ein Großteil dieser Substanzen anthropogenen Ursprungs entsteht durch die unvollständige Verbrennung fossiler Energieträger wie Erdöl oder Kohle. Die direkt emittierten Verbindungen können während des Transports durch die Atmosphäre Reaktionen eingehen. Unter der Einwirkung von Sonnenlicht, Stickoxiden, Ozon und anderen Oxidantien entstehen neue Substanzen deren gesundheitsschädliches Potential weitgehend unbekannt ist¹¹.

3.1.2 Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe

Von besonderem Interesse sind die aliphatischen Kohlenwasserstoffe und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) als direkt emittierte Verbindungen. Durch die Verbrennung fossiler Energieträger wie Kohle oder Erdöl in industriellen Anlagen, in Verbrennungsmotoren und zur Energiegewinnung in Heizkraftwerken entstehen die PAK als unerwünschte Nebenprodukte. Die Bildung von PAK bei diesen anthropogenen Verbrennungsprozessen wird durch unvollständige Verbrennung hervorgerufen, die unter Pyrolysebedingungen, d.h. bei zu geringen Verbrennungstemperaturen und/oder Sauerstoffmangel ablaufen^{12, 13}. Bei Verbrennungsvorgängen werden Staub-, Ruß- und Aschepartikel freigesetzt, an denen die PAK adsorbieren können¹⁴. Bei der räumlichen Ausbreitung spielen Witterungseinflüsse wie z.B. Niederschläge und vorherrschende Windrichtungen sowie die Größe der Partikel an denen PAK adsorbiert sind, eine

entscheidende Rolle. Die durchschnittlichen Benzo[a]pyren-Konzentrationen in der Luft liegen für unbelastete Gebiete zwischen 0,1 und 0,5 ng/m³, in industriellen Belastungsräumen können die Konzentrationen bis auf 74 ng/m³ ansteigen. Die messbaren Konzentrationen sind stark ortsabhängig und unterliegen großen zeitlichen Schwankungen durch meteorologische Einflüsse^{15, 16}.

Die PAK sind potente indirekt wirksame Mutagene, wie z.B. das Benzo[a]pyren oder das Benzo[a]anthracen^{17, 18}. In Simulationen von atmosphärischen Transformationsreaktionen werden sie häufig als Ausgangs- bzw. Modellverbindungen eingesetzt¹⁹. Von besonderem Interesse ist die Entstehung der direkt mutagen wirksamen nitro-PAK Verbindungen und der PAK-Oxyderivate²⁰.

Das nachfolgende Reaktionsschema (Abbildung 1) zeigt zwei mögliche Transformationswege zur Bildung von oxy-PAK-Derivaten am Beispiel des Alkylphenanthrens. Die Alkyl-PAK entstehen in großen Ausmaß bei der Verbrennung von Dieselkraftstoffen. Die Transformationsprodukte, das zyklische Keton sowie der Aldehyd, stellen je nach meteorologischen Randbedingungen Ausgangspunkte für weitere Reaktionen dar²¹.

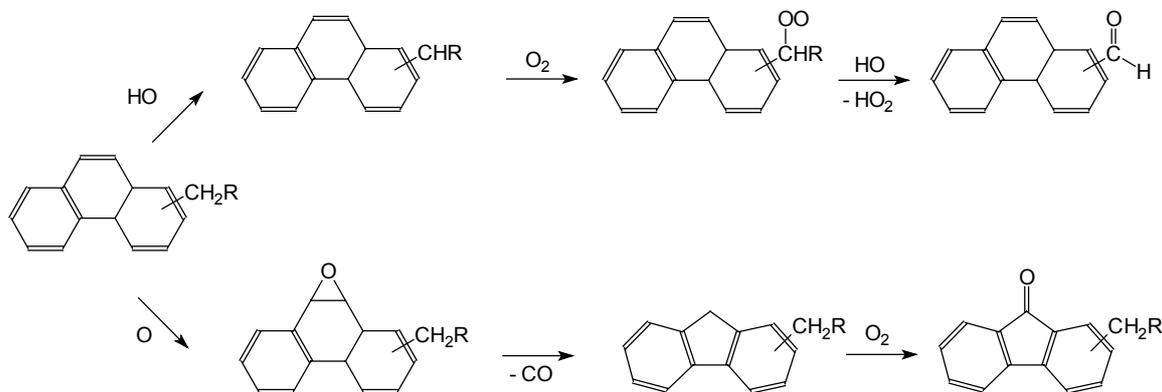


Abbildung 1: Reaktionsschema zur Bildung von oxy-PAK-Derivaten

Weitere oxidative Transformationsschritte führen zu einer Ringöffnung des zyklischen Systemes und / oder der Abspaltung der Alkylgruppe und der Bildung von Carboxylverbindungen. Diese Reaktionsprodukte haben einen deutlich höheren polaren Charakter und können über nasse Deposition aus der Troposphäre ausgewaschen werden. Am Beispiel des Toluols wurden die unterschiedlichen Reaktionspfade und die resultierenden Produkte für den vollständigen Abbau des aromatischen Systems untersucht²².

3.1.3 Nitrierte Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe

Neben der Bildung von oxidierten PAK durch Reaktionen mit dem Hydroxylradikal bzw. dem Peroxhydroxylradikal sind die Transformationsreaktionen unter Beteiligung der nitrosen Gase wie NO, NO₂ von besonderem Interesse. Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchen den Mechanismus und die Kinetik dieser Nitrierungsreaktionen unter simulierten Atmosphärenbedingungen^{23, 24, 25}. Die Arbeiten von Atkinson et al. beschreiben die photochemischen Reaktionen von Naphthalin bzw. Phenanthren unter Beteiligung von Ozon, NO₃- und OH-Radikalen^{26, 27}. Die Reaktionsprodukte sind nitrosubstituierte aromatische Ringsysteme, die im Gegensatz zu ihren Vorläuferverbindungen potente direkt wirksame Mutagene darstellen. Um diese Verbindungen über eine GC/MS²-Methode zu quantifizieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit d₉-1-Nitropyren als interner Standard synthetisiert.

Nitro-PAK können durch photochemisch induzierte Substitutionsreaktionen, durch Dunkelreaktionen in der belasteten Atmosphäre oder direkt bei der Verbrennung fossiler Brennstoffe gebildet werden^{28, 29}. Die verschiedenen Reaktionswege führen zur Bildung unterschiedlicher Nitroarenisomere. 1-, 3-, 7- und 8-Nitrofluoranthren sowie 1-Nitropyren werden direkt durch Dieselabgase emittiert³⁰, während 2-Nitrofluoranthren und 2-Nitropyren in einer Reaktion zwischen gasförmige, Fluoranthren bzw. Pyren und Hydroxylradikalen unter photochemischen Bedingungen gebildet werden³¹.

Das folgende Reaktionsschema (Abbildung 2) zeigt die photochemische Bildung von Pyren zu 2-Nitropyren in der Atmosphäre³².

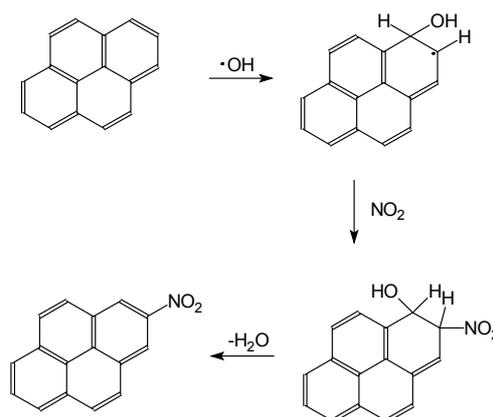


Abbildung 2: Mechanismus der 2-Nitropyrenbildung in der Atmosphäre

Die Gasphasenreaktion zwischen Pyren und NO₂ und NO₃ oder N₂O₅ ergibt 1-Nitropyren als Hauptprodukt neben 4-Nitropyren und 2-Nitropyren. In der Reaktion zwischen partikelgebundenem Pyren und NO₂ oder NO₂+NO₃ oder N₂O₅ im Dunkeln wird ausschließlich 1-Nitropyren gebildet.

In der Atmosphäre sind höher kondensierte aromatische Ringsysteme, wie z.B. 1-Nitropyren und 6-Nitrobenzo[a]pyren fast vollständig an Partikel adsorbiert zu finden³³. Die Photochemie von nitro-PAK auf Partikeln unterscheidet sich deutlich von den Reaktionen in der freien Gasphase³⁴. Es ist daher wichtig, die Dunkelreaktionen von nitro-PAK auf realen Rußpartikeln zu untersuchen³⁵. Es gibt nur sehr wenige Studien über die nitro-PAK Transformationen mit anderen Verunreinigungen wie O₃ oder NO₂³⁶. Grosjean et al. untersuchten die Transformation von 1-Nitropyren auf Glas und Teflonfiltern, die gegen NO₂, O₃ und SO₂ exponiert wurden und konnten keine physikalischen oder chemischen Verluste messen³⁷. Bei Experimenten mit O₃ oder NO₂ und 1-Nitropyren auf frisch generierten Partikeln liessen sich 1,3-, 1,6-, und 1,8-Dinitropyrene beobachten. Die Stabilität von nitro-PAK an Dieselrußpartikeln wurde in einer großen Smog-Kammer untersucht, wobei unter dem Einfluß von Sonneneinstrahlung ein schneller Abbau von 6-Nitrobenzo[a]pyren, 1-Nitropyren, 2-Nitropyren und Mononitrofluoranthenen beobachtet werden konnte³⁸. Die Halbwertszeit für diese Verbindungen lagen zwischen 0,5 und 1,2 Stunden in Abhängigkeit von der Strahlungsintensität.

Die Abbildung 3 zeigt den Reaktionsmechanismus der photochemisch induzierten Transformationsreaktion am Beispiel des 1-Nitropyrens³⁹.

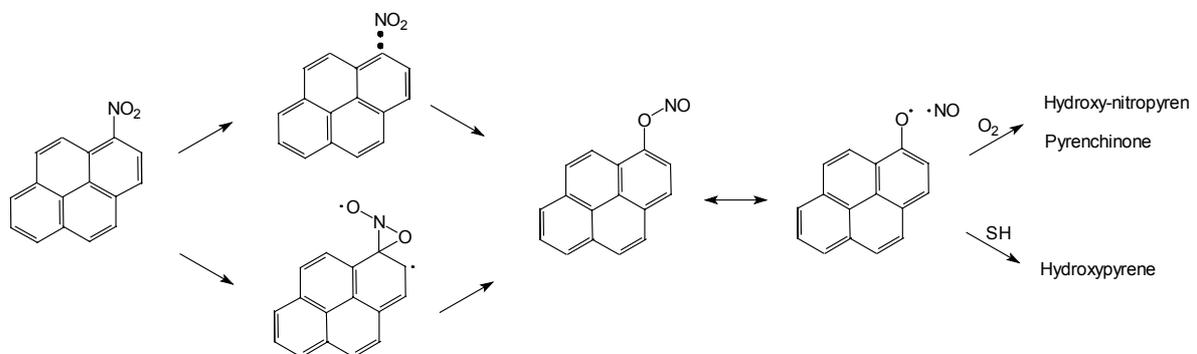


Abbildung 3: Reaktionsmechanismus der Transformation von 1-Nitropyren

Die Produkte dieser Umwandlungsreaktionen zeigen meist eine höhere biologische Aktivität als ihre Vorläuferverbindungen. Als starke Mutagene konnten in Laborexperimenten und realen Luftproben aromatische Nitrolactone bzw. Nitroketone identifiziert werden^{40, 41}. Diese Substanzklasse weist eine außerordentlich hohe Genotoxizität auf. Die Verbindung 3-Nitrobenzanthron konnte in Dieselmotorabgasen identifiziert werden und stellt das stärkste aus Luftstaubextrakten präparierte Mutagen im Ames-Test dar. 3-Nitrobenzanthron induziert eine Revertanzahl von mehr als 6 Millionen Revertanten pro nmol Substanz. Die zuvor stärkste mutagen wirksame Verbindung, das 1,8-Dinitropyren weist zum Vergleich einen

Wert von 4,8 Millionen Revertanten pro nmol Substanz auf und wird ebenfalls durch Dieselmotorabgase emittiert⁴².

3-Nitrobenzanthron ist ein Transformationsprodukt und wird durch Reaktionen zwischen Ketonen, die bei der Verbrennung des Dieselkraftstoffes entstehen, und nitrosen Gasen auf Abgaspartikeln gebildet. Eine starke Belastung der Dieselmotoren und Photosmog-Perioden begünstigen die Bildung der Nitroketonen. Der Einfluß von Stickstoffdioxid und Ozon auf die Bildungsreaktion von 3-Nitrobenzanthron wurde in Laborexperimenten untersucht.

Das nachstehende Reaktionsschema (Abbildung 4) zeigt den Einfluß der Polarität des Lösungsmittel auf den Reaktionsablauf^{43, 44}.

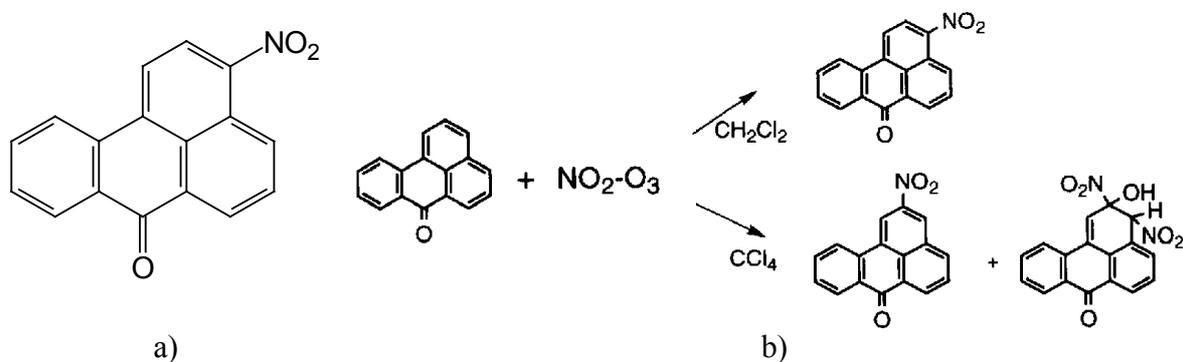


Abbildung 4: a) Struktur von 3-Nitrobenzanthron; b) Reaktionsablauf in Lösung mit Ozon oder NO₂

Die Reaktion von Benzanthron mit NO₂ mit und ohne Ozon wurde in polaren und unpolaren Lösungsmitteln bei verschiedenen Reaktionstemperaturen untersucht. Eine Veränderung der Produktverteilung konnte in Abhängigkeit von dem verwendeten Lösungsmittel beobachtet werden. 3-Nitrobenzanthron war das Hauptprodukt bei der Reaktion in Dichlormethan während 2-Nitrobenzanthron in Tetrachlorkohlenstoff als Hauptprodukt entsteht.

3.2 Mikrobiologische Testverfahren

3.2.1 Der *Salmonella typhimurium* Plate Incorporation Assay (Ames-Test)

Zur Abschätzung der Genotoxizität und des mutagenen Potentials von Umweltproben können „*in vitro*“-Testsysteme dienen. Ein häufig angewandtes Testsystem ist der „Plate Incorporation Assay“ oder kurz Ames-Test genannt^{45, 46}. Der Ames-Test stellt ein validiertes Testverfahren zur Bewertung der Mutagenität von Einzelverbindungen bzw. Chemikalien dar⁴⁷. In der Umweltanalytik wird diese Methode auch zur genotoxischen Bewertung von komplexen Schadstoffgemischen eingesetzt⁴⁸. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Ames-Test als „Quasi-Indikator“ zur Ermittlung des genotoxischen Potentials von Luftstaubextrakten und deren Fraktionen eingesetzt.

Alle Teststämme sind abgeleitet von dem Wildtyp-Stamm von „*Salmonella typhimurium*“ (Mäuse typhus-Erreger). Sie tragen eine revertierbare *his*-Mutation im Histidin Operon sowie weitere Mutationen, die nicht revertieren. Diese nicht revertierbaren Mutationen beeinflussen die Fähigkeit zur DNA-Schadensreparatur und die Permeabilität der Zellwand und erhöhen damit die Empfindlichkeit der Stämme. Hierzu gehören die *uvrB*- und *rfa*-Mutation sowie das Plasmid pKM101. Die *uvrB*-Mutation bewirkt den Ausfall der Nukleotid-Exzisionsreparatur, die für die fehlerfreie DNA-Reparatur zuständig ist, und führt hierüber zu vermehrter Mutagenese. Die *rfa*-Mutation erhöht die Empfindlichkeit über die Störung der normalen Zellwand-Lipopolysaccharid und erleichtert das Eintreten der Mutagene in die Zelle.

Die Histidin-Auxotrophie der Teststämme kann durch spontane oder durch äußere Einflüsse, wie z.B. Chemikalien oder Strahlung rückgängig gemacht werden. Man spricht in diesem Fall von einer Rückmutation oder Reversion. Die mutierten Bakterienzellen (Revertanten) sind wieder in der Lage Histidin zu synthetisieren und können auf Histidin-freien Nährböden wachsen. Die Veränderung des Erbgutes kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen, wobei Punktmutationen wie die Basenaustausch- und die Rasterschubmutationen die bedeutsamsten sind.

Bei Basenaustauschmutationen (base pair substitution) wird eine Base innerhalb des Erbgutes durch eine der vier möglichen Basen ausgetauscht. Im Falle der Rasterschubmutation (frame shift) kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters auf der DNA. Beide Mechanismen verändern die ursprüngliche Erbinformation und können zu Veränderungen an der Zelle führen.

In der folgenden Abbildung 5 sind die beiden Punktmutationsarten und ihre unterschiedlichen Mechanismen schematisch dargestellt⁴⁹.

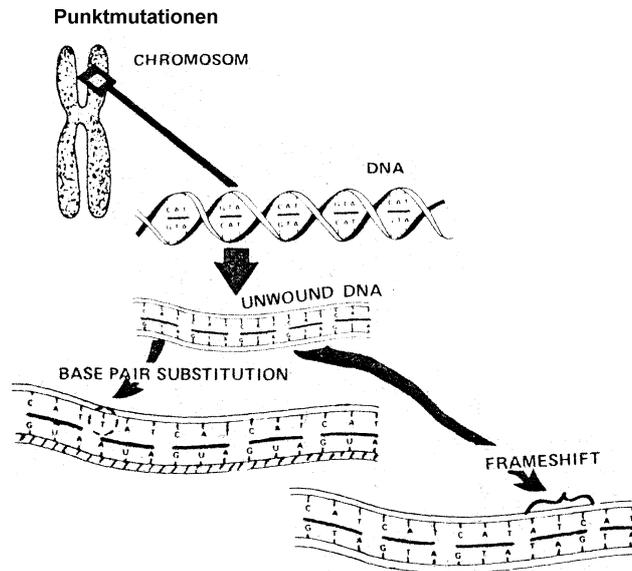


Abbildung 5: Mechanismus der Rasterschub- und Basenpaaraustauschmutation

Durch die Mutation erfolgt die Selektion der Bakterien. Die ursprünglich im Test eingesetzten Bakterien können selbst kein Histidin produzieren und sterben auf einem Histidin-freien Nährboden ab. Dies ist die Grundlage der quantitativen Bestimmung des genotoxischen Potentials einer Substanz. Jede Beeinflussung der Erbinformation der Salmonellenstämme kann die Histidin-Produktion wieder ermöglichen. Der makroskopische Effekt ist das Wachstum der mutierten Bakterien und die Bildung von Kolonien auf dem Histidin-freien Nährmedium.

3.2.1.1 Ames-Test Stämme

Die Tabelle 1 zeigt verschiedene in dieser Arbeit verwendete Teststämme. In der Spalte his Mutation wird das Gen geführt auf dem die Mutation lokalisiert ist. Der Mutationstyp beschreibt die Art der Punktmutation, die mit den Stämmen detektiert wird. Die weiteren genetischen Merkmale verweisen auf die Mutationen zur Steigerung der Empfindlichkeit der Stämme.

TESTSTAMM	HIS MUTATION	MERKMALE
TA100	hisD3052	Bevorzugt Basenaustauschmutationen Nachweis von alkylierenden Mutagenen und UV-Strahlung Basenpaarsubstitution: Wildtyp = CTC hisG46 = CCC uvrB, rfa, pKM101
TA98	hisG46	dient zur Erkennung von „Frameshift“-Mutationen z.B. durch Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe Aromatische Amino- und Nitroverbindungen 1-frameshift-Mutation mit GCGCGCGC-Sequenz uvrB, rfa, pKM101
TA98NR		„Frameshift“-Mutationen Nitroreduktase defizienter Stamm Nitroverbindungen erzeugen keine Revertanten, basierend auf Stamm TA98

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Teststämme und ihre Merkmale

Der Nitroreduktase-Defizientenstamm TA98NR leitet sich von dem Teststamm TA98 ab. Die Eignung des Stamms TA98 ohne metabolische Aktivierung für die Detektion von aromatischen Nitroverbindungen beruht auf der Fähigkeit der Bakterien, die Nitrogruppe zur prämutagenen Hydroxylaminogruppe zu reduzieren. Beim Teststamm TA98NR- ist das hierfür zuständige Enzymsystem blockiert, so daß hier Nitroaromaten keine oder reduzierte mutagene Aktivität zeigen. Für Schadstoffgemische kann eine relative Aussage über den Anteil der nitroreduktaseabhängigen Mutagenen getroffen werden, in dem das Verhältnis zwischen den Revertanzahlen im TA98 und TA98NR- bestimmt wird.

3.2.1.2 TA700x Teststämme

Zur Klassifizierung von Basenpaarsubstitutionen induzierenden Mutagenen ist ein Set von gentechnisch präparierten „*Salmonella typhimurium*“ Stämmen verfügbar. Bisher liegen nur wenige Untersuchungsdaten zu Einzelverbindungen mit den Ames-Test II Teststämmen vor. Mutationsspektren komplexer Schadstoffgemische mit diesen Stämmen sind bislang nicht bekannt. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit sollte die Verwendbarkeit dieser Teststämmen für komplexe Schadstoffgemische wie z.B. Luftstaubextrakte bzw. deren Fraktionen überprüft werden. Weiterhin sollte der Fragestellung nachgegangen werden, inwieweit die Ergebnisse der einzelnen TA700x und ihrer spezifischen Mutationsmuster Auskunft über den Charakter des genotoxischen Probematerials geben.

Mit den als TA7001 bis TA7006 (TA700x) bezeichneten Teststämmen können die sechs möglichen Basenpaarsubstitutionen der vier DNA-Basen identifiziert werden. Die Teststämme TA700x besitzen eine einzelne „missense-Mutation“ im Histidin-Biosyntheseoperon, die eine autogene Histidinproduktion verhindert. Die Stämme TA7001 bis TA7003 und TA7006 revertieren durch basenpaarsubstitutionen-induzierende Mutagene zu ihrem Wildtyp-Codon. Für die Teststämme TA7004 und 7005 entspricht der resultierende Revertanten-Codon nicht dem des Wildtyps.

Die Charakteristiken der Teststämmen sind in Tabelle 2 aufgeführt⁵⁰.

NAME DES TESTSTAMMES	BESONDERE EIGENSCHAFTEN	
TA700X	Gentechnisch, manipulierte Teststämme zur Detektion bestimmter Basenaustauschmutationen, basierend auf Stamm TA100	
	His-Mutation	Substitution
TA7001	HisG1775	A*T ⇒ G*C
TA7002	HisC9138	T*A ⇒ A*T
TA7003	HisG9074	T*A ⇒ G*C
TA7004	HisG9133	G*C ⇒ A*T
TA7005	HisG9130	C*G ⇒ A*T
TA7006	HisG9070	C*G ⇒ G*C

Tabelle 2: Übersicht über die Ames-Test II Stämme und ihre Eigenschaften

In der mit „His-Mutation“ bezeichneten Spalte ist das Gen aufgeführt, auf dem die genetische Veränderung gegenüber dem Urstamm lokalisiert ist. Die Spalte „Substitution“ beschreibt den spezifischen Basenpaaraustausch des betreffenden Stammes. Alle Stämme enthalten das Plasmid pKM101, eine Deletion in der *uvrB*-Region und *rfa*-Mutationen. Die sechs neuen

Teststämme ermöglichen eine differenzierte Aussage über das Mutagen über das Muster der Basenpaaraustauschmutation. Die vier DNA-Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) bilden komplementäre Basenpaare und werden durch eine Basenaustauschmutation nach dem in der Spalte Substitution aufgeführten Muster verändert.

3.2.1.3 Versuchsablauf

Verschiedene Mutagene entfalten erst durch ihre Metabolisierung im Organismus von Säugetieren eine genotoxische Wirkung. In den bakteriologischen Testsystemen, wie auch im Ames-Test, fehlen viele der zur metabolischen Aktivierung erforderlichen Enzymsysteme. Aufgrund dieser Tatsache wird in bakteriellen Mutagenitätstestsystemen der Säugetiermetabolismus simuliert. In einem Standardverfahren erfolgt dies durch die Zugabe von Rattenleberhomogenat, dem S9-Mix. Dieser S9-Mix wird durch Zentrifugieren mit 9000 Umdrehungen pro Minute aus Rattenleberhomogenat gewonnen. Er enthält weiterhin Kofaktoren wie NADP, G-6-P, Mg^{2+} und K^{+} , um die oxidative Metabolisierung durch molekularen Sauerstoff und Monooxygenasen zu optimieren. Die metabolische Aktivität des S9-Mix wird durch eine Vorbehandlung der Ratten mit Induktoren der Monooxygenasen wie zum Beispiel PCB-Mischung Arochlor 1254 erhöht. Die Zugabe von Rattenleberhomogenat S9 stellt die Standardmethode für die Durchführung des Tests dar und wurde daher im Rahmen dieser Untersuchungen eingesetzt.

Die Abbildung 6 zeigt schematisch den Versuchsablauf eines Ames-Tests mit metabolischer Aktivierung.

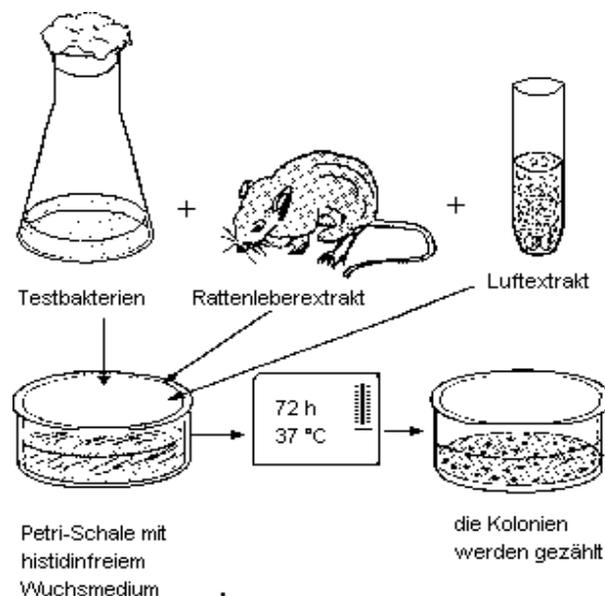


Abbildung 6: Ablaufschema des Ames-Tests

Nach Inkubation bei 37°C für 72 Stunden wird die Revertanzahl sowie der Hintergrundrasen der Platten bestimmt. Hierfür wird der Rasen der Testplatten mit dem der Negativkontrollen verglichen. Der Hintergrundrasen dient der Unterscheidung von negativen

Ames-Ergebnissen und Bakterientoxizität. Falls die Probe bakterientoxisch wirkt, ist der Rasen schwach ausgeprägt oder nicht zu erkennen. Die Spontanrevertanzahl oder Negativkontrolle wird für jeden Versuch mit dem jeweiligen Lösungsmittel der Proben (DMSO oder H₂O) ermittelt. Als Positivkontrollen wurden für jeden Teststamm spezifische Mutagene eingesetzt. Alle Proben werden im Doppel- oder Dreifachansatz untersucht, um Schwankungen im Testsystem zu erkennen bzw. zu kompensieren.

Man führt den Test gewöhnlich mit mehreren Verdünnungen der zu testenden Substanz durch. In dieser Versuchsdurchführung kann man Konzentrationsabhängigkeiten der Mutagenität über eine Dosis-Wirkungsbeziehung feststellen. Die Dosis-Wirkungsbeziehung unterhalb der Toxizitätsgrenze wird über eine lineare Regressionsanalyse bestimmt. Die Steigung der Regressionsgeraden ist eine Masszahl für das genotoxische Potential der Probe z.B. Revertanten/mg EOM.

Über den sogenannten Induktionsfaktor können unterschiedliche Ames-Testexperimente miteinander verglichen werden. Der Induktionsfaktor ist der Quotient aus der ausgezählten Koloniezahl und der Negativkontrolle und somit eine Maßzahl für Mutagenität im Verhältnis zur Spontanreversionsrate. Auf Grund des relativen Zahlenwertes treten Schwankungen innerhalb der Testdurchführung in den Hintergrund und machen die Vergleiche zwischen unterschiedlichen Testdurchführungen aussagekräftiger.

3.2.2 ³²P-postlabeling Methode nach Randerath

1981 stellten Randerath und seine Mitarbeiter Gupta und Reddy eine neue Methode zum Nachweis von DNA-Addukten vor. DNA-Addukte sind kovalente Reaktionsprodukte von chemischen Substanzen mit Nukleotiden. Diese Reaktionen finden vorwiegend an den nukleophilen Zentren der Basen statt und repräsentieren prämutagene DNA-Schäden, die während der Replikation zu Mutationen führen können. Die Veränderung der DNA durch solche Addukte werden als Auslöser der Krebsentstehung durch chemische Substanzen angesehen^{51, 52}.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ³²P-postlabeling-Methode unter mehreren Gesichtspunkten eingesetzt. Zum einen sollte untersucht werden wie komplexe Luftstaubextrakte sowie deren Fraktionen mit dem ³²P-postlabeling-Verfahren auf ihre DNA-Adduktierung untersucht werden können. Neben dieser methodischen Fragestellung war von besonderem Interesse, welche Informationen aus den Experimenten über den Charakter bzw. die Identität der genotoxischen Luftinhaltsstoffe ableitbar sind und ob sich einzelne DNA-Addukte isolieren und identifizieren lassen.

Die Verwendung der postlabeling-Methode bildet eine Ergänzung zu den Versuchen mit dem Ames-Test als „Genotoxizitätsindikator“. Die Ergebnisse aus dem Ames-Test zeigen relativ unspezifisch erfolgreiche Mutationen der Salmonellen-DNA an. Im Gegensatz hierzu wird mit dem postlabeling-Verfahren die primäre DNA-Schädigung detektiert. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß nicht alle DNA-Addukte an der Salmonellen DNA zu Mutationen und Kolonienwachstum führen, lässt sich mit der postlabeling-Methode ein breiteres genotoxisches Substanzspektrum detektieren. In diesem Kontext ist es interessant zu überprüfen, ob und wenn ja welche Zusammenhänge sich zwischen den Ergebnissen des Ames-Test und denen der postlabeling-Methode darstellen lassen.

3.2.2.1 Versuchsablauf

Vor 1981 konnte eine Bindung an die DNA zumeist nur mit radioaktiv markierten (^1H oder ^{14}C) Verbindungen nachgewiesen werden. Die Bestimmung von DNA-Addukten gelang wegen der sehr geringen Menge an modifizierten Basen nur mit äußerst empfindlichen und spezifischen Methoden. Die Markierung wurde in dieser Zeit vor der Adduktbildung eingeführt.

Mit der „Postlabeling Methode“ wurde die radioaktive Sonde Phosphor 32 nach der Adduktbildung eingesetzt (^{32}P -Nachmarkierungsmethode). Hieraus ergaben sich zwei wesentliche methodische Vorteile der ^{32}P -Postlabeling-Methode:

- Verbindungen konnten auf DNA-Adduktbildung untersucht werden, deren radiochemische Synthese nicht möglich war.
- Die Möglichkeit DNA-Adduktanalysen am Menschen durchzuführen.

Diese neue Analysenmethode wurde durch das Enzym T4 Polynukleotidkinase (PNK) ermöglicht. Dieses Enzym erkennt neben den normalen 3'-Nukleosidphosphaten auch adduktierte 3'-Nukleosidphosphate als Substrate und überträgt die γ -Phosphatgruppe aus dem Adenosintriphosphat (ATP) auf die freie 5'-OH Gruppe der Desoxyribose im Nukleosid.

Die Abbildung 7 stellt diesen Reaktionsablauf vereinfacht dar⁵³.

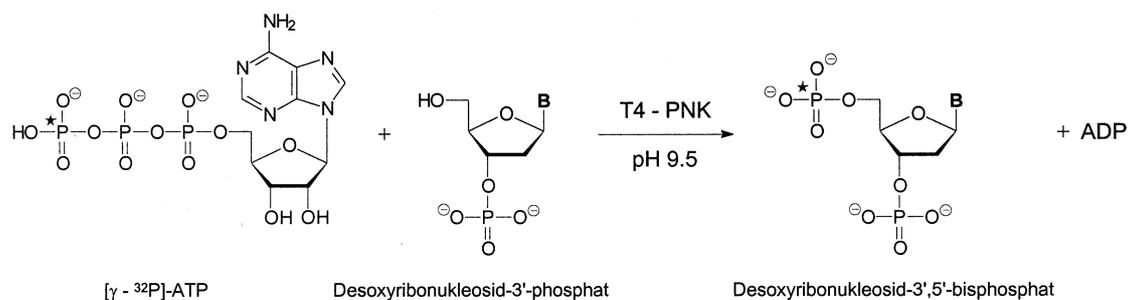


Abbildung 7: Enzymreaktion zur Übertragung des radioaktiven Phosphors

Die zu untersuchende DNA wird enzymatisch zu Desoxyribonucleosid-3'-Phosphaten verdaut. Nach der Standard-Methode werden nun mit einem Überschuß ATP und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ alle Nucleosid-3'-Phosphate am 5'-OH der Desoxyribose markiert. Nach einer multidimensionalen, dünn-schichtchromatographischen Auftrennung der radioaktiven Produkte und anschließender Autoradiographie erhält man als Ergebnis adduktierte Nucleosid-3',5'-bisphosphate als schwarze Addukt-Flecken. Die Radioaktivitätsmenge in den

Addukt-Flecken im Vergleich zu der Gesamtradioaktivitätsmenge in normalen Bisphosphaten plus Addukten ergibt den sogenannten RAL-Wert (relative adduct labeling).

Die hohe Nachweisempfindlichkeit des Postlabeling-Verfahrens wird durch die große spezifische Aktivität des eingesetzten [γ - ^{32}P]-ATP (7000Ci/mmol) erreicht. Mit der Standardmethode kann eine Empfindlichkeit von ca. 1 Addukt pro 10^6 - 10^7 normalen Nukleotiden erzielt werden, während beide Anreicherungsverfahren durch den Einsatz von trägerfreiem [γ - ^{32}P]-ATP auf Werte von 1 Addukt pro 10^{10} Nukleotide kommen.

Die Tabelle 3 zeigt einen Vergleich verschiedener Methoden zum Nachweis von DNA-Addukten und die erreichbaren Nachweismengen.

METHODE	EMPFINDLICHKEIT		BENÖTIGTE DNA-MENGE
	Addukte pro Nukleotide	amol/ μg DNA	
DNA-Bindung mit ^1H -Markierung	$1/10^7$ - 10^9	3-300	1 mg
HPLC mit Fluoreszenz-Detektion	$1/10^7$	300	100 μg
Immunoassay (RIA, ELISA)	$1/10^8$	30	50 μg
Synchrone Fluoreszenzspektroskopie	$1/10^8$	30	100 μg
HPLC-MS, GC/MS mit MALDI oder ESI	$1/10^9$	3	100 μg
^{32}P -postlabeling	$1/10^{10}$	0,3	1 μg

Tabelle 3: Vergleich verschiedener Methoden zum Nachweis von DNA-Addukten

Das ^{32}P -Postlabeling Verfahren ist die meist verwendete Methode zum Nachweis von DNA-Addukten. Die hohe Nachweisempfindlichkeit und die geringe benötigte DNA-Menge machen sie den anderen Methoden überlegen. Die immunologischen Methoden (RIA, ELISA) haben im Vergleich den Nachteil, daß das Addukt in reiner Form und in ausreichender Menge vorliegen muß, um spezifische Antikörper erzeugen zu können.

Andere Methoden benutzen spezifische Eigenschaften einiger DNA-Addukte, wie z.B. die starke Fluoreszenzintensität der polyzyklischen Kohlenwasserstoff-Addukte und sind daher auf diese speziellen Addukte beschränkt. Die massenspektrometrischen Nachweisverfahren benötigen im Vergleich zur ^{32}P -Postlabeling Methode bedeutend mehr DNA, haben aber den entscheidenden Vorteil der direkten Identifizierung des Adduktes während der Analyse. Diese

fehlende direkte Identifizierung ist der Hauptnachteil der ^{32}P -Postlabeling-Methode. Weitere Nachteile sind die Belastung durch die β -Strahlung des ^{32}P und die schwierige absolute Quantifizierung der Addukt mengen.

Weitere wesentliche Vorteile zur genauen Bestimmung von Expositionen gegenüber Schadstoffen beruhen auf den allgemeinen Eigenschaften von DNA-Addukten. DNA-Addukte sind Biomarker der inneren Exposition, d.h. DNA-Adduktmessungen berücksichtigen im Gegensatz zu den äußeren Expositionsmessungen die Aufnahme, Verteilung, Metabolismus und Entgiftung des Schadstoffs im Organismus. Im Hinblick auf mechanistische Studien zur Wirkung von genotoxischen Stoffen haben DNA-Addukte die Eigenschaft, daß sie direkt an der Initiation des mutagenen bzw. carcinogenen Prozesses beteiligt sind und damit Rückschlüsse auf zu erwartende biologische Effekte zulassen.

3.3 Bioassay dirigierte Fraktionierung

Umweltproben stellen den Analytiker durch ihre komplexe Zusammensetzung vor eine schwierige Aufgabe, wenn es um die Identifizierung unbekannter Einzelverbindungen geht. In der Umweltanalytik beruhen die Methoden zur Quantifizierung einzelner Substanzen oder Stoffklassen auf der Abtrennung von irrelevanten Verbindungen bzw. der Matrix durch chemische oder physikalische Techniken. Dieser Ansatz kann nicht übernommen werden, wenn das Untersuchungsziel die Identifizierung unbekannter Substanzen und die Betrachtung der biologischen Aktivität des Stoffes ist. Der experimentelle Ablauf muß für diese Zielsetzung die folgenden Schritte umfassen.

1. Fraktionierung des komplexen Stoffgemisches
2. Chemische Analyse der Fraktionen
3. Untersuchung der biologischen Aktivität
4. Identifizierung von Einzelverbindungen

Die Schritte werden iterativ für die biologisch aktivste Fraktion wiederholt, um die Identität der Schadstoffe zu ermitteln. Diese Strategie wird in der Literatur als „bioassay directed fractionation“ beschrieben⁵⁴.

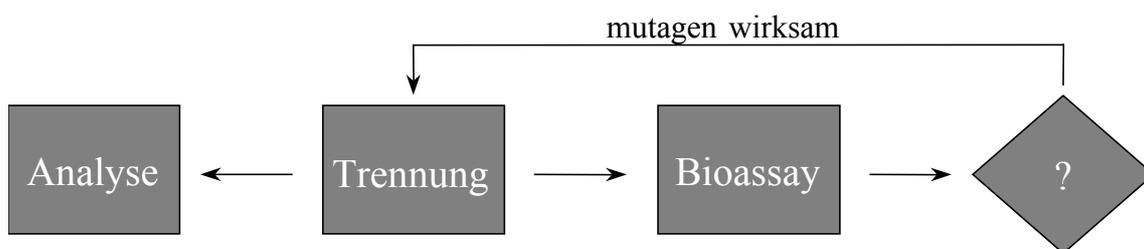


Abbildung 8: Ablaufschema der „bioassay directed fractionation“

Bei der Anwendung dieser Strategie müssen drei Faktoren berücksichtigt werden. Diese Faktoren schränken die heute zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden ein. Der erste Faktor ist der erhöhte Materialbedarf dieser Methodik im Vergleich zu rein biologisch oder chemisch ausgerichteten Analysen. Die Entwicklung und der Einsatz von Probenahmetechniken zur Gewinnung großer unveränderter Probemenge ist daher essentiell für die Anwendung der „bioassay directed fractionation“. Des weiteren entscheiden die Massenwiederfindung des Probematerials, die Wiederfindung der biologischen Aktivität und die Gefahr, daß durch die einzelnen Arbeitsschritte die Probe verändert wird und Fehlbefunde entstehen, über die Verwendbarkeit aller Einzelschritte im Rahmen der Gesamtstrategie.

Drittens müssen die aus der Trennung erhaltenen Fraktionen in einem Lösungsmittel vorliegen, das mit geringem Aufwand weiterführende chemische Analysen erlaubt und mit dem eingesetzten Bioassay kompatibel ist.

Das komplexe Stoffgemisch von atmosphärischen Luftstaubextrakten kann grundsätzlich mit Hilfe verschiedener chemisch-analytischer Trennmethode fraktioniert werden. Die ersten Trennungen wurden über Flüssig/Flüssig-Extraktionen (Trennung über die Polarität, Trennung über Säure/Base-Eigenschaften) oder die klassische, offene Säulenchromatographie an Silicagel durchgeführt^{55, 56}. Der Vorteil dieser Methoden liegt in der Möglichkeit große Probemengen zu verarbeiten, nachteilig sind jedoch die geringe Trennleistung und die Bildung von Artefakten. Mit der Entwicklung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) werden die klassischen säulenchromatographischen Methoden als Vortrennstufen eingesetzt.

Verschiedene Arbeitsgruppen wenden die Strategie der „bioassay directed fractionation“ in Kombination mit der HPLC zur Trennung von unterschiedlichen Kompartimenten an. Organische Extrakte von Dieselabgaspartikeln, Holzfeuerrauchpartikeln und atmosphärischen Staubpartikeln wurden über Normalphasenchromatographie an Kieselgel mit unterschiedlichen Wiederfindungsraten für Masse und biologische Aktivität fraktioniert^{57, 58}.

Ein anderer methodischer Ansatz ist die Trennung über nicht-wässrige Ionenaustausch- oder Größenausschlusschromatographie (SEC). Die Arbeiten einer niederländischen Arbeitsgruppe vergleichen die Trennung über die verschiedenen Materialien Aluminiumoxid⁵⁹, Kieselgel und XAD-2 Harz und berichten über Massenwiederfindungen von 98-100%⁶⁰. Die Fraktionierung durch Anionenaustauscherharze mittels Festphasenextraktion erweist sich jedoch als problematisch bei der Trennung zwischen sauren und neutralen Verbindungen.

Die Fraktionierung von atmosphärischen Luftstaubextrakten über nicht-wässrige Gelpermeationschromatographie wurde von einer spanischen Forschergruppe angewendet⁶¹. Die drei erhaltenen Fraktionen wurden als Lipide, PAK, und polare Verbindungen charakterisiert. Durch die HPLC-Chromatographie dieser 3 Fraktionen über Kieselgel bzw. über C₁₈-modifiziertes Kieselgel konnten 82 Verbindungen identifiziert werden⁶².

Bei der Anwendung all dieser verschiedenen Trennmethode müssen die resultierenden Fraktionen in einem nicht-wässrigen Lösungsmittel vorliegen, das die weiterführenden chemischen und biologischen Untersuchungen erlaubt.

Die organischen Extrakte von Luftstäuben und deren Fraktionen lassen sich mit den unterschiedlichsten biologischen Testsystemen untersuchen. Bei der „bioassay directed

fractionation“ dient das biologische Testsystem als „Bioindikator“ zur Bestimmung des genotoxischen Potential der erhaltenen Fraktionen. Das Auftragen der biologischen Aktivität gegen die Elutionszeit ergibt ein zeitliches Verteilungsprofil der Aktivität – das Mutagramm. Das biologische Testsystem sollte für die Eignung als Bioindikator mehrere Grundvoraussetzungen erfüllen⁶³.

- Kompatibilität zu den eingesetzten Probematerialien und Lösungsmitteln
- Einfache und schnelle Durchführung des Tests
- Kurze Inkubations- bzw. Testdauer zur schnellen Auswertung der Ergebnisse
- Bestimmung einer einfachen Maßzahl für die biologische Aktivität
- Hohe Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen mehreren Experimenten

Der Ames-Test als Genotoxizitätstest erfüllt alle diese Bedingungen und hat durch die Verfügbarkeit verschiedener, spezifischer Teststämme einen weiteren Vorteil. Vergleichbare biologische in vitro Testsysteme wie der Comet-Assay, SOS-Chromotest oder der Mutatox-Test haben den Nachteil, daß bedeutend weniger Referenz- bzw. Vergleichsdaten in der Literatur zu finden sind⁶⁴.

Neben der Bestimmung der biologischen Aktivität ist die Identifizierung der Inhaltsstoffe ein weiteres Ziel der „bioassay directed fractionation“ Strategie. Für diese Aufgabenstellung sind gaschromatographische Gerätekopplungen prädestiniert, da die Fraktionen auch nach der Trennung ein Stoffgemisch darstellen. Die nicht identifizierenden Detektionsmethoden wie Flammenionisation (FID), Elektroneneinfang (ECD) oder Stickstoffphosphordetektoren (NPD) werden eingeschränkt für Substanzklassen spezifische Quantifizierungen verwendet. Die größte Verbreitung haben Kopplungen mit Massenspektrometern unterschiedlichster Bauart wie Quadropol- oder Iontrap-Geräte. Für die gaschromatographische Untersuchung muß das Probematerial und das Lösungsmittel unzersetzt verdampfbar sein. Diese Einschränkung schließt Wasser als Lösungsmittel weitgehend aus und bereitet große Schwierigkeiten bei der Untersuchung von stark polaren Verbindungen oder Substanzen mit hohem Molekulargewicht. Zur Verbesserung der Verdampfbarkeit werden die Proben derivatisiert untersucht und temperaturprogrammierbare Injektoren verwendet.

Über die Massenspektren der gaschromatographisch getrennten Fraktionen konnten bisher etwa 1500 verschiedene Einzelverbindungen identifiziert werden. Der größte Anteil dieser Substanzen wurde aus der unpolaren bzw. der Aromaten-Fraktion bestimmt^{65, 66}. Die Arbeiten

von Wise et al. und Lewtas et al. zur Charakterisierung von kommerziell erhältlichen Referenzmaterialien wie NIST SRM1648 und NIST SRM1649 zeigen, daß nitro-PAK einen Beitrag zur direkten, PAK zur indirekten mutagenen Wirksamkeit dieser Fraktion liefern^{67, 68}. Verschiedene Stoffklassen wie organische Mono- und Dicarbonsäuren konnten isoliert und Einzelverbindungen quantifiziert werden^{69, 70}. Diese Substanzen tragen jedoch nicht oder nur in geringem Umfang zur Mutagenität der polaren Fraktionen bei. Für Dieselabgasextrakte konnten nitro-PAK als die Hauptträger der Genotoxizität identifiziert werden⁷¹.

4 Material und Methoden

4.1 Probenahme

4.1.1 Beschreibung der Probenahmestandorte

Die Probenahme erfolgte in 8 unterschiedlich stark belasteten Städten Baden-Württembergs in einer Zusammenarbeit der Landesanstalt für Umweltschutz, Referat für Umweltüberwachung, Sachgebiet Ökotoxikologie und des Hygiene-Instituts der Universität Heidelberg.

Die Lage der einzelnen Probenahmestellen ist in Abbildung 9 ersichtlich.



Abbildung 9: Geographische Lage der 8 Probenahmestellen in Baden-Württemberg

In den ersten beiden Projektjahren wurden an insgesamt 8 Meßstationen in regelmäßigem Abstand Luftstäube gesammelt (alle 4 Wochen). An jeweils 2 Probenahmestellen wurden zeitlich parallel Luftproben entnommen. Das Untersuchungsgebiet erstreckte sich von Mannheim im Norden bis nach Weil am Rhein als der südlichsten Meßstation. Im Osten stellte Reutlingen und im Westen Weil am Rhein die äußersten Probenahmestellen dar (Abbildung 9).

Durch die UMEG werden die Meßstationen wie folgt beschrieben:

ORT	RECHTSWERT	HOCHWERT	HÖHE	LOKALISIERUNG
Karlsruhe-Mitte	3457500	5430520	115	Durlachertor (Gelände Kinderklinik)
Mannheim-Mitte	3462250	5482225	95	Reichskanzler-Müllerstr
Mannheim-Nord	3461425	5489825	95	Gewann Steinweg Flst.Nr. 30720
Stuttgart-Mitte	3512275	5405075	260	Ecke Hegel/Lerchenstr.
Reutlingen	3515400	5372370	385	Ebertstr. Gelände „Pomologie“
Weil am Rhein	3396900	5273225	250	Oberbaselweg
Freiburg-Mitte	3412900	5318815	240	Fehrenbachallee
Freudenstadt	3456630	5370665	750	Gelände Theodor-Gerhard-Schule
Schwarzwald-Süd	3407525	5297430	920	Nähe Kälbelescheuer/Kleiner Kaibenkopf

Tabelle 4: Beschreibung der UMEG-Meßstationen

Das Land Baden-Württemberg betreibt ein Luftmeßnetz zur Routineüberwachung mit über 60 Meßstationen. Die meteorologischen und lufthygienischen Daten werden als Halbstundenwerte eines Tages in automatischen Meßstationen generiert. Die aktuellen Meßwerte sind online über Videotext, T-Online oder das Internet abrufbar. Das Meßnetz wird durch die Gesellschaft für Umweltmessungen und Umwelterhebungen (UMEG) betrieben⁷². Eine detaillierte Beschreibung der Meßstationen findet sich im Anhang Kapitel 7.1.

4.1.2 Projektproben

Die Beprobung der einzelnen Probenahmestellen erfolgte regelmäßig im Abstand von vier Wochen. Zur Probenahme wurde ein sogenannter “High Volume Air Sampler” verwendet (Modell Digital DHA 80; Firma Riemer), der mit Glasfaserfiltern und einer Polyurethanschaumkartusche mit einem Durchmesser von 15 cm ausgestattet war.

Die Probenahmeapparatur ist in Abbildung 10 dargestellt.

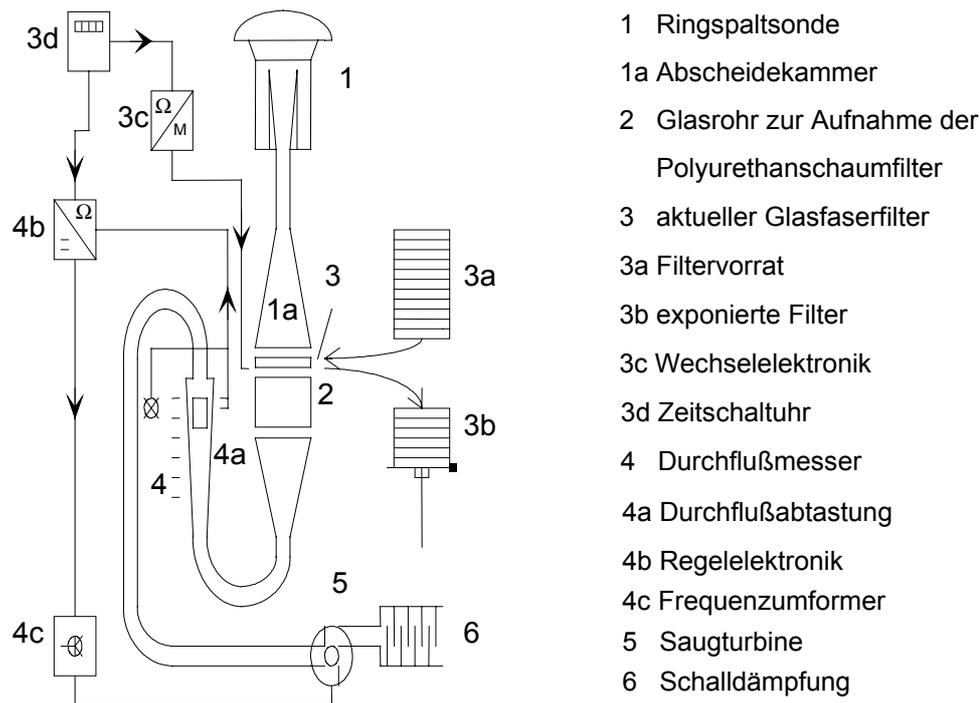


Abbildung 10: Schematischer Aufbau des verwendeten High-Volume-Samplers

Die Durchflußrate kann im Bereich von 100 bis 1000 lmin⁻¹ eingestellt werden und wird durch eine elektronische Steuerung der Saugturbine konstant gehalten (4-4c). Der Probenehmer ist mit einem automatischen Filterwechselmechanismus ausgestattet (3). Aus einem Filtervorrat können in einstellbaren Zeitintervallen oder in Abhängigkeit von bestimmten Ereignissen (z.B. zu hoher Filterwiderstand) unbeladene Glasfaserfilter (Ø 15 cm; Firma Macherey&Nagel) in den Ansaugkanal eingebracht werden. Dem Glasfaserfilter nachgeschaltet ist ein Glasrohr (Innendurchmesser 15 cm), das zur Aufnahme eines Polyurethanschaumfilter (Ø 15 cm; Stärke 5 cm; Fa. Ziemer) dient.

Die Luft wurde bei allen Probenahmen innerhalb des Projektes mit einer Leistung von 800 Liter pro Minute angesaugt, d. h. pro Stunde werden die Inhaltsstoffe aus 48 m³ Luft abgeschieden.

Nach 24 Stunden (1152 m³, 6,52 m³cm⁻²) wird der Glasfaserfilter automatisch gewechselt. Für die Untersuchungen werden die Filter der Tage Montag bis Samstag gemeinsam aufgearbeitet (Inhaltsstoffe aus 5760 m³ Luft). Der Polyurethanschaumfilter kann nicht automatisch gewechselt werden und verbleibt daher über den Probenahmezeitraum von einer Woche im Ansaugluftstrom. Während auf dem Glasfaserfilter die partikulären Luftinhaltsstoffe abgeschieden werden, dient der nachgeschaltete Polyurethanschaumfilter zur adsorptiven Rückhaltung der mittelflüchtigen Luftinhaltsstoffe.

4.1.3 Bulkprobenahme – „Langzeitproben“

Zur Gewinnung von Proben über lange Zeiträume wurde ebenfalls der “High Volume Air Sampler” Modell Digital DHA 80 der Firma Riemer eingesetzt. Die Probenahme erfolgte zu verschiedenen Jahreszeiten über einen Zeitraum von jeweils 3-4 Wochen. Die Probenahme wird bei einer Ansaugleistung von 1000 lmin^{-1} ohne nachgeschalteten Polyurethanschaumfilter durchgeführt. Ein Glasfaserfilter verblieb im Ansaugluftstrom bis der Strömungswiderstand einen Schwellwert erreicht. Die Beladungsdauer eines Filters und die Filterwechselzeitpunkte werden über einen Drucker protokolliert. Die Glasfaserfilter einer Probenahmeperiode wurden zusammenfaßt und analog den Routineproben gelagert und aufgearbeitet.

Folgende Proben wurde im Rahmen dieser Arbeit entnommen und untersucht.

PROBENNAHMEORT	MANNHEIM MITTE				
	Januar I	Juli II	August III	Oktober IV	November V
Anzahl beladener Filter	12	7	8	8	10
Luftvolumen	27440 m ³	35207 m ³	25109 m ³	25920 m ³	29203 m ³
Ausgewogene Staubmenge	1,5937 g	1,0245 g	1,2645 g	1,2010 g	1,4864 g
Staubkonzentration	58,1 µgm ⁻³	29,1 µgm ⁻³	50,4 µgm ⁻³	46,8 µgm ⁻³	50,8 µgm ⁻³
UMEG-Staubmittel	50,7 µgm ⁻³	22,5 µgm ⁻³	-	-	-

Tabelle 5: Daten der „Langzeit“-Probenahme

Diese Proben wurden über entsprechend lange Zeiträume gesammelt, um ausreichend Probematerial (>1g Luftstaub) für die experimentellen Untersuchungen zur Verfügung zu haben. Die „Langzeit“-Beprobung wurde parallel zu der projektbezogenen Routineprobenahme durchgeführt. In der Tabelle 5 sind für die Proben I und II die durchschnittlichen Staubkonzentrationen in µgm⁻³ aus der eigenen Beprobung und aus der UMEG-Messung aufgeführt. Für die restlichen Proben III bis V liegen keine vollständigen UMEG-Messwerte vor. Die unterschiedlichen Werte sind auf die verschiedenen Messverfahren zurück zu führen. Die eigenen Staubgewichte wurden gravimetrisch ermittelt. Die Messung der UMEG beruht auf einem β-Meter.

4.1.4 Probevorbereitung und Lagerung

Die Glasfaserfilter (Rundfilter ohne organische Binder; Ø15 cm; Rückhaltevermögen 0,5µm; Firma Machery&Nagel) werden in einem Vakuumtrockenschrank über Blaugel getrocknet. Die getrockneten Glasfaserfilter werden anschließend ausgewogen und in Aluminiumfolie verpackt bis zur Probenahme aufbewahrt.

Die Polyurethanschaumfilter (Stärke 5 cm; Ø15 cm; Firma Ziemer) werden mit Toluol für 10h und anschließend mit Aceton für 10 h mittels Soxhletextraktion gereinigt. Die Schäume werden im Vakuumtrockenschrank bei 50 °C getrocknet und ebenfalls in Aluminiumfolie verpackt bis zur Verwendung gelagert.

Nach Abschluß der Probenahme werden die beladenen Glasfaserfilter sowie der Polyurethanschaumfilter einzeln in Aluminiumfolie verpackt, etikettiert, in Plastiktüten eingeschweißt und bis zur Aufarbeitung bei -75 °C gelagert.

4.1.5 Probenaufarbeitung

Die 5 Glasfaserfilter einer Probenahmestelle werden gemeinsam in einer Extraktionshülse (38 x 200 mm; Firma Schleicher & Schuell) für 24 h mit ca. 400 ml Aceton p.a. (Firma Baker) im Soxhletextraktor extrahiert. Der meist gelbbraune Extrakt wird anschließend für die chemische und biologische Untersuchung aufbereitet.

Der Extrakt wird in einem Rotationsverdampfer eingedunstet. Anschließend wird das Lösemittel durch Abblasen im schwachen Stickstoffgasstrom bei Raumtemperatur vollständig entfernt.

Der braune Rückstand wird in 6 ml Aceton p.a. (Firma Baker) aufgenommen und für biologische und chemische Untersuchungen geteilt (2x3 ml).

Die Probeflächen für die biologischen Untersuchungen werden in sterile Reagenzgläser mit Schraubverschluß überführt. Anschließend wird das Lösungsmittel gegen DMSO getauscht, da Aceton für die meisten biologischen Testverfahren aufgrund zu hoher Toxizität ungeeignet ist. Das Aceton wird durch Abblasen im schwachen Stickstoffgasstrom bei Raumtemperatur vollständig entfernt und der Rückstand in 7 ml DMSO (Firma Baker) aufgenommen. Die Proben werden bis zur Untersuchung bei -30 °C aufbewahrt.

Für chemische Untersuchungen der Glasfaserfilterproben stehen nach der Aufarbeitung 3ml Suspension zur Verfügung. In diesen 3ml befinden sich die organischen Luftinhaltsstoffe aus 2822,58 m³ Luft, im entsprechenden Extrakt aus den Polyurethanschaumfilter sind die organischen Komponenten aus 3384 m³ Luft enthalten.

4.1.6 Standardstaubextrakte

Zur Methodenentwicklung wurden verschiedene kommerziell erhältliche Referenzmaterialien verwendet. Die zertifizierten Standardstäube NIST SRM1649 Washington DC, NIST SRM 1648 St. Louis und NIST Vehicle Exhaust Particulate Matter wurden von der Fa. Promochem bezogen. Das Standardmaterial NIST SRM1649 ist für organische Inhaltsstoffe (Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe) zertifiziert, das Standardmaterial NIST SRM1648 ist für Schwermetalle (Arsen, Blei) zertifiziert. Das Referenzmaterial NIST „Vehicle Exhaust Particulate Matter“ enthält partikuläre Dieselmotoremissionen.

Die Referenzstäube NIST SRM1648, NIST SRM1649 (Fa. Promochem) und NIST „Vehicle Exhaust Particulate Matter“ wurden direkt in die Extraktionshülsen (80 x 22 mm; Firma Schleicher & Schuell) eingewogen und analog den Probestäuben aufgearbeitet.

4.2 Chemische Untersuchungen

4.2.1 Extraktionsversuche

Zur Ermittlung der optimalen Extraktionsausbeute hinsichtlich extrahierbarem Anteil und mutagenem Potential wurde das Referenzmaterial NIST SRM1649 verwendet. Als Versuchsbedingungen wurden die Extraktionszeitdauer sowie die Polarität des Extraktionslösemittels variiert. Es wurden 11 Lösungsmittel aufsteigender Polarität überprüft.

Die Tabelle 6 zeigt die verwendeten Lösemittel und ausgewählte physikalische Eigenschaften⁷³.

LÖSUNGSMITTEL	SIEDEPUNKT [°C]	POLARITÄT [ϵ^0]
n-Pentan	36,1	0
Cyclohexan	80,7	0,04
t-Butylmethylether	55,2	0,2
Toluol	110,6	0,29
Dichlormethan	40	0,42
Tetrahydrofuran	67	0,45
Aceton	56,2	0,56
2-Propanol	82,4	0,82
Ethanol	78	0,88
Methanol	64,9	0,95
Wasser, doppelquarz dest.	100	-

Tabelle 6: Tabelle der verwendeten Extraktionsmittel

In einem 100 ml Einhalsrundkolben werden 80ml des jeweiligen Lösungsmittels und ein Siedestein vorgelegt. 200 mg Probematerial werden in einer Extraktionshülse (Fa. Schleicher&Schüll, 80x22 mm) mit einer Analysenwaage (Fa. Satorius) eingewogen, in einen 30 ml Soxhletextraktor gegeben und ein Dimrothkühler aufgesetzt. Die Proben werden auf einer elektrischen Heizbank (Fa. Gerhardt) für 24 h unter Rückfluß extrahiert. Der Extrakt wird am Vakuumrotationsverdampfer bis auf ein Volumen von etwa 5ml aufkonzentriert und anschließend im Stickstoffgasstrom (Stickstoff 4.6) bis zur Trockene eingengt.

Im Fall des Extraktionsmittels Wasser wird der Extrakt gefriergetrocknet und der Rückstand in möglichst wenig Wasser wieder gelöst. Die wässrige Lösung wird 4 mal mit je 50 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und wie oben beschrieben bis zur Trockene eingengt. Die extrahierten, lösemittelfreie Rückstände werden in Schraubdeckelreagenzgläsern (Fa. Schott) mit einer Analysenwaage (Fa. Satorius) ausgewogen und der extrahierbare organische

Anteil bestimmt (EOM). Die Lagerung der Proben erfolgt im Kühlschrank unter Lichtabschluß. Die Auswaage des Extraktionsrückstandes ist mit einem großen Fehler behaftet, da erstens die Masse des festen Rückstandes sehr klein gegenüber dem Wägegefäß ist und zweitens das Lösungsmittel bei sinnvoller Temperatur und Druck nicht vollständig entfernt werden kann.

Der dunkelbraune bis schwarze Rückstand hat meist eine feste bis zähe Konsistenz und läßt sich in einigen Fällen in Aceton nicht vollständig rüchlösen. Für den Ames-Test werden die Extrakte in Dimethylsulfoxid rüchgelöst bzw. gegebenenfalls im Ultraschallbad resuspendiert.

Für die Mutagenitätsuntersuchungen im Ames-Test werden die Extrakte in DMSO resuspendiert und in einem Doppelansatz in drei linearen Verdünnungsstufen getestet. Die Verdünnungsstufen werden über die eingewogene Staubmenge hergestellt und die Ergebnisse auf Revertanten je Milligramm Staubeinwaage berechnet.

4.2.2 Glühverlust

Zur Bestimmung des gesamten organischen Anteils kann der Glühverlust des Luftstaubes bei 550 °C verwendet werden. Hierzu wird der Probestaub in einen Platintiegel eingewogen und in einem temperaturprogrammierbaren Hochtemperaturofen über 24 h geglüht. Die Probe wird bei ca. 150 °C Ofentemperatur aus dem Ofen entnommen und in einem Exikkator über Blaugel auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die Tabelle zeigt das Temperaturprogramm des Glühvorganges im Hochtemperaturofen.

ZEIT [MINUTEN]	TEMPERATUR [°C]
0	150
60	150
360	300
420	550
450	550

Tabelle 7: Temperaturprogramm zur Bestimmung des Glühverlustes

Die Masse des Glührückstandes wird mittels einer Analysenwaage (Firma Satorius) bestimmt. Der Quotient aus Einwaage und Gewichtsabnahme beschreibt den Anteil an flüchtigen anorganischen Salzen und organischen Verbindungen.

Der Glühverlust wurde zweimal für NIST SRM1649 mit einer Einwaage von 210,79 mg und 416,92 mg mit je 2 Proben bestimmt.

4.2.3 Flüssig/Flüssig Extraktion

Für die Auftrennung der Luftstaubextrakte wurde in einem ersten Ansatz eine Flüssig/Flüssig-Extraktionsmethode eingesetzt. Die Trennung des komplexen Stoffgemisches erfolgte hierbei über die Säure/Basen-Eigenschaften der Inhaltsstoffe.

Der Luftstaubextrakt wird mit 10 ml Dichlormethan in einem 25 ml Schraubdeckelreagenzglas gelöst und im ersten Schritt mit 3mal mit frisch dargestellter 0,05m NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt (NaHCO₃ p.a. Fa. Merck). Die vereinigten wässrigen Extrakte werden mit 1m Salzsäure auf pH 2 gebracht und 3 bis 5 mal mit 10 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Phasentrennung wird durch Kühlung in einem Eisbad und durch Zentrifugieren beschleunigt. Die vereinigten organischen Phasen werden über wasserfreiem Na₂SO₄ (Fa. Promochem) getrocknet. Dieser Fraktion können die stark sauren Verbindungen zugeordnet werden.

Die organische Phase aus dem ersten Schritt wird 3 mal mit 10 ml 1m Natronlauge extrahiert. Die vereinigten basischen Phasen werden mit 1m Salzsäure auf pH 2 gebracht und 3 mal mit 10ml Dichlormethan (Fa. Merck) ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und beinhalten die schwach sauren Verbindungen.

Analog der ersten beiden Schritte werden mit je 10 ml 1m Salzsäure (Fa. Merck p.a.) bzw. anschließend mit jeweils 10 ml 1m Natronlauge (NaOH p.a. Fa. Merck) die basischen Inhaltsstoffe extrahiert. Die verbleibende organische Phase enthält die neutralen Substanzen.

Die einzelnen Fraktionen werden nach dem Trocknen über wasserfreiem Na₂SO₄ mit einer Eppendorf-Pipette abgehoben und der feste Rückstand 3mal mit je 1 ml Dichlormethan gewaschen. Die Fraktionen werden im Stickstoffgasstrom bei Raumtemperatur vom Lösungsmittel befreit und unter Kühlung und Lichtabschluß in 10 ml Schraubdeckelreagenzgläsern gelagert.

Die folgende Abbildung 11 zeigt das Ablaufschema des Trennungsganges.

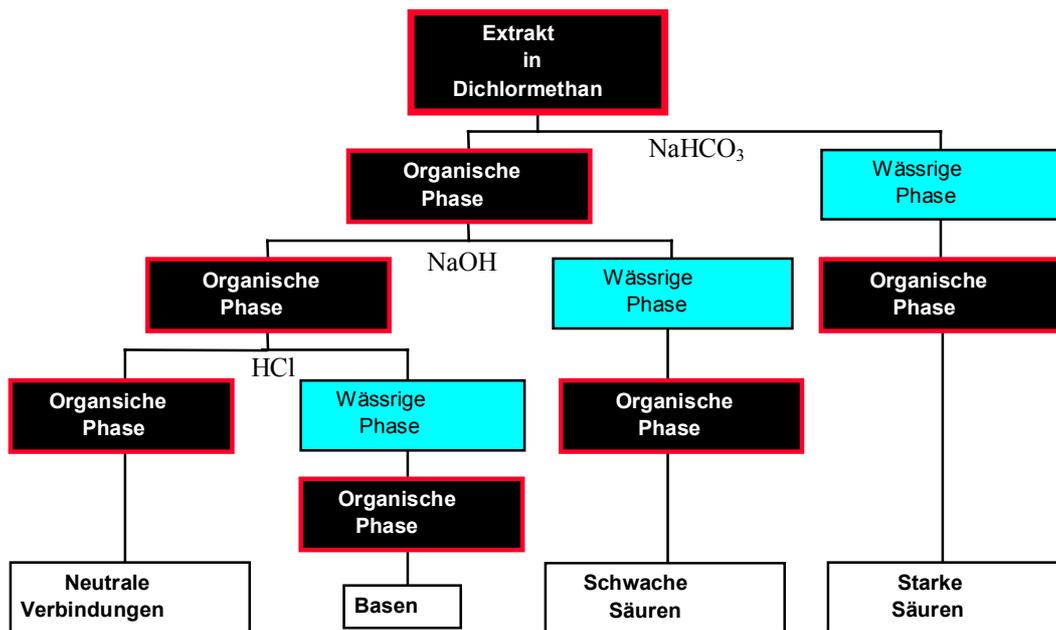


Abbildung 11: Trennschema für Flüssig/Flüssig-Extraktion

Die resultierenden Fraktionen lassen sich somit in 4 Gruppen einteilen. Diese 4 Fraktionen enthalten Verbindungen, die stark saure, schwach saure, neutrale bzw. basische Eigenschaften aufweisen.

4.2.4 HPLC-Trennungen

Der Schwerpunkt der Untersuchungen zur Identifizierung der Verbindungen in Luftstaubextrakten lag in der Entwicklung einer reproduzierbaren und universell einsetzbaren HPLC-Methode zur Fraktionierung dieses Probematerials. Ein wichtiger Gesichtspunkt für die Eignung einer Methode ist die direkte Verwendbarkeit der Fraktionen für anschließende biologische und chemische Experimente, um Artefakte möglichst weitgehend zu vermeiden.

Die verwendete HPLC-Anlage (Fa. Beckmann) setzt sich aus den folgenden Modulen zusammen.

Pumpenmodul 126	Doppelpumpensystem mit Hochdruckgradientenmischung Maximale Flußrate 10 ml/min
Detektor DAD 168	Photodiodenarraydetektor mit 2 unabhängigen Datenkanälen Wellenlängenbereich 170-420 nm Messung einer Wellenlänge und/oder eines Wellenlängenbereiches
A/D-Wandler 406	Analog/Digitalwandler zum Anschluß analoger Detektoren Eingangsspannungsbereich 1-10 V
Fluoreszenzdetektor	Analoger Fluoreszenzdetektor mit einer Extinktions- und einer Emmissionswellenlänge (Modell RF535; Fa. Shimadzu)
Aufgabesystem	Manuelle Injektion über Reodyne-6-Wege-Ventil mit 20 µl Probeschleife
Datensystem	IBM-kompatibler Personalcomputer unter MSDOS 6.22 Systemsoftware „System Gold“ Version 5.0 (Fa. Beckmann) Digitale I/O-Schnittstellenkarte „System Gold“ mit 2 unabhängigen Datenkanälen
Fraktionssammler	automatischer Fraktionssammler wahlweise Zeit oder Volumen programmierbar (Fa. LKB) Probegefäße 10 ml Reagenzgläser Kapazität 6 *20 Gefäße

Die einzelnen Komponenten sind über Edelstahlkapillaren (Durchmesser 1/16 Zoll) verbunden.

Die Trennversuche erfolgten an verschiedenen Trennmaterialien in einem semi-präparativen Maßstab (Tabelle 8). Die verwendeten Lösungsmittel wurde von der Fa. Merck bezogen und entsprachen der gradient grade Qualität.

Trennmaterial	Elutionsmittel
C ₁₈ -modifizierte Kieselgelsäule 5 µm Material 250x10 mm	Wasser (doppelt „quarz“destilliert) Acetonitril Methanol Tetrahydrofuran Ethanol 5 mmol KOH/ KH ₂ PO ₄ Puffer pH 7,38 0,01 mmol H ₃ PO ₄ /KH ₂ PO ₄ Puffer pH 4,0 10 mmol H ₃ PO ₄ Puffer pH 2,38
CN-modifizierte Kieselgelsäule 5 µm Material 250x10 mm Fa. Beckmann	n-Hexan 1,4-Dioxan Methanol Tetrahydrofuran Ethanol 2-Propanol
NO ₂ -modifizierte Kieselgelsäule 5 µm Material 250x10 mm Fa. Restek	n-Hexan 1,4-Dioxan Methanol Tetrahydrofuran Ethanol
OH-modifizierte Kieselgelsäule 5 µm Material 250x10mm Fa. Restek	n-Hexan 1,4-Dioxan Methanol Tetrahydrofuran Ethanol
Phenomex GPC Säule 250x7,8 mm Fa. Restek	Tetrahydrofuran

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Trennmaterialien und Elutionsmittel

Die organischen Elutionsmittel wurden in einem Ultraschallbad für mindestens 60min entgast. Die Trennsäule wurde vor Beginn der Messung über 20 min konditioniert und war während der Analyse auf Raumtemperatur temperiert. Die Rückstellung des Ausgangsgradienten nach einer Trennung wurde innerhalb von 15 Minuten durchgeführt und das System über einen Zeitraum von 10 Minuten equilibriert.

Die Pufferlösungen wurden nach folgenden Vorschriften hergestellt und der pH-Wert mit einem pH-Meter überprüft.⁷⁴.

5mmol KOH/ KH₂PO₄ Puffer pH 7,38:

0,68 g KH₂PO₄ (Fa. Merck) und 40 ml 0,1m KOH-Lösung (Fa. Merck) werden mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

0,01mmol H₃PO₄/KH₂PO₄ Puffer pH 4,0:

1,36 g KH₂PO₄ (Fa. Merck) und 30 µl 85% H₃PO₄ (Fa. Merck) Lösung werden mit Wasser auf 1 l aufgefüllt

10mmol H₃PO₄ Puffer pH 2,38

0,98 g H₃PO₄ (Fa. Merck) werden mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Die Luftstaubextrakte wurden in einem ausgewogenen Schraubdeckelreagenzglas (Fa. Schott) im Stickstoffgasstrom bis zur Trockene einengt und die Masse des Rückstands mittels einer Analysenwaage bestimmt. Das Probematerial wurde in Methanol/Dichlormethan 1:1 für die Umkehrphasenchromatographie an C₁₈-modifiziertem Kieselgel gelöst. Im Fall der Normalphasenchromatographie an CN-modifiziertem Kieselgel, NO₂-modifiziertem Kieselgel bzw. OH-modifiziertem Kieselgel wurde Tetrahydrofuran als Lösungsmittel für das Probe verwendet. Die Probeaufgabe erfolgte manuell mit Hilfe einer 25 µl HPLC-Spritze (Fa. Hamilton) über ein 6-Wegeventil (Reodyne, Fa. Besta). Die Synchronisation des Datenaufzeichnungsbegins und des Injektionszeitpunktes erfolgte über einen Signalschalter am Aufgabeventil. Der automatische Fraktionssammler war mit einem autonomen Zeitgeber ausgestattet und wurde manuell zum Zeitpunkt der Injektion gestartet.

4.2.5 Gaschromatographische Untersuchungen

Für die Identifizierung der genotoxischen Verbindungen standen gaschromatographische Untersuchungen im Vordergrund. Die aus den Vortrennungen erhaltenen Fraktionen wurden bis zur Trockene im Stickstoffgasstrom eingengt und in Aceton oder Toluol rückgelöst. Die Proben wurden underivatisiert und methyliert untersucht. Als Methylierungsreagenz wurde frisch dargestellte 0,1m etherische Diazomethanlösung verwendet. Die Proben wurden in 200 µl Mikrovials einpipettiert und in 1,5 ml Vials mit Aluminiumcaps verschlossen untersucht.

Für die Analyse der aufgearbeiteten Proben wurde ein Gaschromatograph HP 5890 Series II (Fa. Hewlett Packard) mit einem automatischen Probenaufgabesystem HP 7673 (Fa. Hewlett Packard) verwendet. Als Detektionseinheit kam ein massenselektiver Detektor HP 5971A (Fa. Hewlett Packard) zum Einsatz. Als Probenaufgabetechnik wurde ein Split/Splitlos-Injektor (Fa. Hewlett Packard) verwendet. Die Trennung erfolgte auf einer Kapillarsäule (PTE-5; Fa. Supelco).

Säulenparameter:	
Phase	PTE-5 (5% Diphenyl- 95% Dimethylsiloxan)
Länge	30 m
Innendurchmesser	0,25 mm
Filmdicke	0,25 µm
Trägergas	Helium
Gasfluß	1 cm ³ /min bei 100 °C
Injektionsparameter	
Sample Pumps	4
Viscosity Delay	1 s
Solvent A Washes (n-Hexan)	4
Solvent B Washes (Aceton)	4
Splitverhältnis	1/25
Injektionsvolumen	1 µl

Tabelle 9: Allgemeine Geräteparameter des Hewlett-Packard Gaschromatographen

Die aufgearbeiteten Proben konnten über eine Gaschromatograph/Atomemissionsdetektor-Kopplung (GC/AED) an der Landesanstalt für Umwelt (LfU) Karlsruhe analysiert werden. Der Gaschromatograph war ein HP 5890 Series II (Fa. Hewlett Packard) mit einem automatischen Probenaufgabesystem HP 7673 (Fa. Hewlett Packard). Als Detektionseinheit kam ein Atomemissionsdetektor (Fa. Hewlett Packard) zum Einsatz. Als Probenaufgabetechnik wurde ein Split/Splitlos-Injektor (Fa. Hewlett Packard) verwendet.

Die Trennung erfolgte auf einer Kapillarsäule (HP 5-MS; Fa. Hewlett Packard).

SÄULENPARAMETER:	
Phase	HP5-MS (5% Diphenyl- 95% Dimethylsiloxan)
Länge	60 m
Innendurchmesser	0,25 mm
Filmdicke	0,25 µm
Trägergas	Stickstoff
Gasfluß	1,5 cm ³ /min bei 100°C
Injektionsparameter	
Sample Pumps	10
Viscosity Delay	1 s
Solvent A Washes (n-Hexan)	4
Solvent B Washes (Aceton)	4
Splitverhältnis	1/20
Injektionsvolumen	1 µl

Tabelle 10: Allgemeine Geräteparameter der GC/AED-Kopplung

Parallel wurde die Analyse der Luftstaubproben mit einem Gaschromatograph Varian GC 3400 (Fa. Varian) und einem automatischen Probenaufgabesystem AS 7100 (Fa. Varian) durchgeführt. Die Trennung erfolgte analog auf einer 30 m Kapillarsäule (PTE-5; Fa. Supelco). Als Detektionseinheit kam ein IonTrap-Massenspektrometer Saturn III (Fa. Varian) zum Einsatz. Zur Probenaufgabe wurde ein temperaturprogrammierbarer Split/Splitlos-Injektor (Fa. Varian) verwendet.

Die Analyse der Luftstaubproben erfolgte ebenfalls an einem Gaschromatograph GC4000 mit Elektroneneinfang- (ECD) und Flammenionisationsdetektor und einem automatischen Probenaufgabesystem (Fa. Fisons). Die Trennung erfolgte analog auf einer 30 m Kapillarsäule (PTE-5; Fa. Supelco). Durch eine Hintereinanderschaltung der Detektoren (Tandembetrieb) konnte innerhalb eines Laufes ein ECD- und ein FID-Chromatogramm erhalten werden. Die Software Chromcard Version 1.8 (Fa. Fisons) wurde für die Datenauswertung eingesetzt. Zur Probenaufgabe wurde ein on-column Injektor (Fa. Fisons) verwendet.

4.2.6 Synthese von d₉-1-Nitropyren

Die Darstellung von d₉-1-Nitropyren als interner Standard für die Quantifizierung der nitro-PAK wurde in Anlehnung an eine Vorschrift von A.M. van den Baken durchgeführt^{75, 76, 77}.

Zur Synthese von d₉-1-Nitropyren werden 0,4 g Natriumnitrit NaNO₂ (Fa. Merck) und 0,4 g Ammoniumperoxodisulfat (NH₄)₂S₂O₈ (Fa. Merck) in eine gerührte Lösung von 0,1 g d₁₀-Pyren (Fa. Promochem) in 60 ml Acetonitril (Fa. Merck, p.a.) eingebracht. Die Lösung wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei die Farbe der Reaktionslösung von farblos nach dunkelrot wechselt. Die Lösung wird filtriert und das Filtrat am Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockene einengt. Der dunkelrote, kristalline Rückstand wird in Hexan/Dichlormethan (Fa. Merck, p.a. Ware) aufgenommen und über Silicagel (Aldrich, Mesh) chromatographiert. Die Hauptfraktion nach 10 ml n-Hexan/Dichlormethan wird am Vakuumrotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Die verbleibenden, gelben Kristalle werden unter Lichtausschluss im Kühlschrank gelagert.

Zur Darstellung der Stammstandardlösung zur Quantifizierung der nitro-PAK wurden 50 mg d₉-1-Nitropyren in 5 ml Toluol p.a. (Fa. Baker) gelöst.

4.2.7 Derivatisierungen mit etherischer Diazomethanlösung

Die acetonischen Luftstaubextrakte wurden im Stickstoffgasstrom bis zur Trockene einengt und der Rückstand in 500 µl Aceton rückgelöst. Mit einer Eppendorfpipette wurden 500 µl 0,1 m etherische Diazomethanlösung zugegeben und in einem 10 ml Schraubdeckelreagenzglas (Fa. Schott) bei nicht vollständig geschlossenem Deckel über Nacht bei Raumtemperatur stehen lassen. Die Lösung wurde erneut im Stickstoffgasstrom bis fast zur Trockene einengt, der Rückstand in 100 µl Aceton rückgelöst und in einem mit einem Septum verschlossenen 1,5 ml Vial mit 200 µl Mikrovialeinsatz für die gaschromatographische Analyse bereitgestellt.

4.2.8 Quantifizierung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen

Die Quantifizierung der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe aus den Luftstaubextrakten mittels einer gaschromatographischen Analyse wird durch eine Probenaufarbeitung zur Entfernung der störenden Probenmatrix vereinfacht. Dies kann über eine Festphasenextraktion an Silicagel als Säulenmaterial erreicht werden.

Die Silicagel-Einmalkartuschen (Säulenvolumen 6 ml; Füllgewicht 1 g; Fa. Baker) werden mit 10 ml n-Hexan p.a. (Fa. Merck) konditioniert. Es wird darauf geachtet, daß das Säulenmaterial stets mit Flüssigkeit bedeckt ist.

Aus dem Acetonextrakt der Luftproben wird ein Luftvolumenäquivalent von 200 m³ direkt auf die Säule gegeben und anschließend 25 µl (200 ng je Komponente) interner Standard bestehend aus d₁₀-Acenaphthen, d₁₀-Phenanthren, d₁₀-Fluoranthen, d₁₂-Benzo[a]anthracen, d₁₂-Perylen (Standard-Mix je 2000 µg/ml in Aceton, Sonderanfertigung Firma Supelco und d₁₀-Fluoranthen 10 mg/ml in Cyclohexan Fa. Promochem) für die PAK-Analyse zugesetzt. Die Probelösung wird auf einer Extraktionsbank (Fa. Baker 12 Anschlüsse) im Wasserstrahlvakuum auf das Säulenmaterial gezogen.

Die folgende Abbildung (Abbildung 12) zeigt die einzelnen Arbeitsschritte.

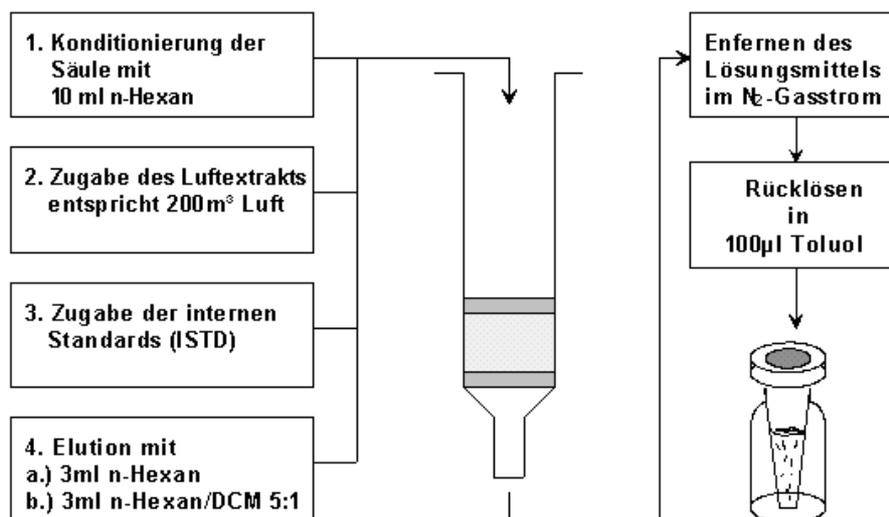


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur PAK-Quantifizierung

Die Elution erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird mit 3 ml n-Hexan p.a. (Fa. Merck) eluiert, anschließend mit n-Hexan/Dichlormethan-Gemisch p.a. (Fa. Merck) im Verhältnis 5:1. Die Elution wird ohne das Anlegen eines Vakuums durchgeführt, da sich so bessere Wiederfindungsraten für die leichter flüchtigen Verbindungen ergeben. Das Eluat wird im

schwachen Stickstoffgasstrom fast bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 100 µl Toluol p.a. (Fa. Baker) wiederaufgenommen und in einem 1,5 ml Vial mit 200 µl Mikrovialeinsatz (Fa. Hewlett Packard) mit einem Septum verschlossen und für die gaschromatographische Analyse bereitgestellt. Die gaschromatographische Trennung wird mittels einer unpolaren Kapillarsäule durchgeführt. Die Probeaufgabe erfolgt automatisch mit einem Autosampler. Als Detektor wird ein massenselektiver Detektor im SIM-Modus verwendet. Die Spezifikation der einzelnen Geräte und der Trennsäule sowie die Betriebsparameter sind dem Kapitel 4.2.5 zu entnehmen.

Die Temperaturparameter der gaschromatographische Analyse sind in der nachstehenden Tabelle (Tabelle 11) zusammengefasst dargestellt.

Parameter	Wert
Injektortemperatur	290 °C
Detektortemperatur	180 °C
Transferlinietemperatur	290 °C
Ofentemperaturprogramm	100 °C für 2 Minuten 10 °C/min für 19 Minuten 290 °C für 9 Minuten Dauer: 30 Minuten
Splitzeit	30 s
Solventdelay	4 Minuten
Detektorprogramm	EMV Offset Zeit [min] Delta EMV [V] 4,0 106 20,5 294 24,0 400

Tabelle 11: Temperaturparameter der gaschromatographischen Analysenmethode

Zur Quantifizierung einer unbekannt Probe unter Verwendung eines internen Standards werden die Flächen unterhalb der Peaks im Chromatogramm integriert und der Quotient der erhaltenen Zahlenwerte gebildet. Dieser Quotient wird mit einer gespeicherten Eichkurve verglichen und die Konzentration der Zielverbindung ermittelt.

Die Konzentrationen der einzelnen Zielverbindungen werden über die Auswertungssoftware (HP ChemStation Software Release B00.00, Fa. Hewlett Packard) errechnet und die erhaltenen Zahlenwerte in einem Datenverarbeitungsprogramm gespeichert. Die einzelnen Peaks werden über eine Referenzspektrenbibliothek (HP NIST 56k und HP NIST 75k) identifiziert und die Retentionszeiten ermittelt.

Zur Quantifizierung der Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe wird ein internes Standardgemisch mit je 200 ng pro deuteriertem PAK in 25 µl Aceton als interner Standard verwendet.

Zur Eichung stand eine Standardmischung der 16 quantifizierten PAK (1000 µg/ml in Aceton; Fa. Supelco) als Standardlösung zur Verfügung. Der geeichte Konzentrationsbereich erstreckt sich von 10 ng bis 1000 ng in 100 µl Toluol.

4.2.9 Quantifizierung von nitro polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen

Zur quantitativen Bestimmung der nitrierten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe werden die Luftstaubextrakte über eine Festphasenextraktion an Silicagel aufgereinigt.

Die Silicagel-Einmalkartuschen (Säulenvolumen 6 ml; Füllgewicht 1 g; Firma Baker) werden mit 10 ml n-Hexan p.a. (Fa. Merck) konditioniert. Es wird darauf geachtet, daß das Säulenmaterial stets mit Flüssigkeit bedeckt ist.

Aus dem acetonischen Luftstaubextrakt wird ein Luftvolumenäquivalent bzw. ein EOM-Äquivalent direkt auf die Säule gegeben und anschließend 25 µl interne Standardlösung bestehend aus d₉-1-Nitropyren in Toluol für die nitro-PAK Analyse zugegeben. Die Probelösung wird auf einer Extraktionsbank (Fa. Baker 12 Anschlüsse) im Wasserstrahlvakuum auf das Säulenmaterial gezogen.

Die folgende Abbildung (Abbildung 13) zeigt die einzelnen Arbeitsschritte.

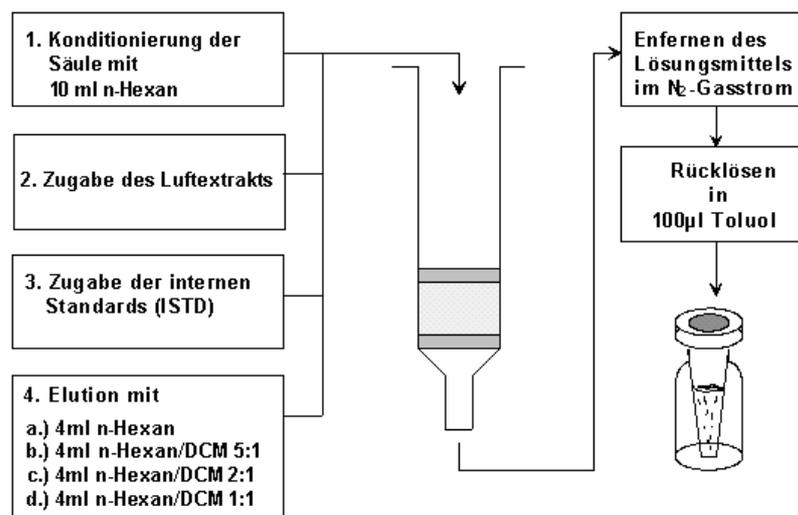


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur nitro-PAK Quantifizierung

Die Elution erfolgt in 3 Schritten. Zunächst wird mit 4 ml n-Hexan p.a. (Fa. Merck) eluiert, anschließend mit n-Hexan/Dichlormethan-Gemisch p.a. (Fa. Merck) im Verhältnis 5:1, nachfolgend die Elution mit n-Hexan/Dichlormethan im Verhältnis 2:1 und abschließend wird mit n-Hexan/Dichlormethan im Verhältnis 1:1 eluiert. Die Elution wird ohne das Anlegen eines Vakuums durchgeführt, da sich so bessere Wiederfindungsraten für die leichter flüchtigen Verbindungen ergeben. Die Eluate mit n-Hexan/Dichlormethan im Verhältnis 2:1 und mit n-Hexan/Dichlormethan im Verhältnis 1:1 werden getrennt aufgearbeitet und analysiert, um Schwankungen bei der Probevorbereitung zu überprüfen.

Das Eluat wird im schwachen Stickstoffgasstrom fast bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 100 µl Toluol p.a. (Fa. Baker) wiederaufgenommen und in einem 1,5 ml Vial mit 200 µl Mikrovialeinsatz mit einem Septum verschlossen und für die gaschromatographische Analyse bereitgestellt.

Die gaschromatographische Trennung wird mittels einer unpolaren Kapillarsäule (PTE-5 Fa. Supelco) durchgeführt. Die Probenaufgabe erfolgt automatisch mit einem Autosampler. Als Detektor wird ein Iontrap-Massendetektor (Fa. Varian) verwendet. Für die Analyse der nitro-PAK wurde eine Silicat beschichtete, oberflächendeaktivierte Ionenfalle (Silcatrap; Fa. Varian) verwendet. Die Injektion erfolgte on column über eine 0,53 mm desaktivierte, unbelegte Vorsäule, welche bis in den Glasliner vorgeschoben war. Die Spezifikation der einzelnen Geräte und der Trennsäule sowie die Betriebsparameter sind ebenfalls dem Kapitel 4.2.5 zu entnehmen.

Die Temperaturparameter der gaschromatographische Analyse sind in der nachstehenden Tabelle (Tabelle 12) zusammengefasst dargestellt.

Parameter	Wert			
Injektor				
Injektortemperatur	Start [°C]	Ende [°C]	Rate [°C/min]	Zeit [min]
	90	90	0,0	2,00
	90	230	20,0	7,00
	230	290	10,0	6,00
	290	290	0,0	5,00
Splitzeit	120 s			
Injektionszeit	0,1 s			
Solventdelay	10 Minuten			
Detektor				
Detektortemperatur	240 °C			
Transferlinetemperatur	290 °C			
EMV	2700			
A/M Amplitude	3,9 V			
Betriebsart	MS/MS			
Ionisierung	EI			
Segmente	6			
Background-Masse	99 amu			
Gaschromatograph				
Ofentemperaturprogramm	Start [°C]	Ende [°C]	Rate [°C/min]	Zeit [min]
	90	90	0,0	2,00
	90	230	20,0	7,00
	230	290	10,0	6,00
	290	290	0,0	10,00
Equilibrierungszeit	1 min			

Tabelle 12: Methodenparameter zur nitro-PAK Quantifizierung

Zur Eichung standen 6 Einzelstandardlösungen (Fa. Amchro) mit je 10 µg/ml in Toluol zur Verfügung. Der geeichte Konzentrationsbereich erstreckt sich von 10 ng bis 1000 ng in 100 µl Toluol.

Zur Überprüfung der Aufarbeitungsmethode und der Quantifizierung werden Wiederfindungsexperimente mit Einzelstandards bekannter Konzentration durchgeführt. Die Standardproben werden wie unbekannte Proben über die gesamte Methode aufgearbeitet und quantifiziert. Ein Vergleich des Ergebnisses der Quantifizierung mit der eingesetzten Konzentration der Standardprobe gibt ein Maß für den Fehler der Methode an. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden je 3 nitro-PAK Standardgemische mit den bekannten Konzentrationen 20 ng, 100 ng und 500 ng allen Schritten der Probearbeitung unterworfen und quantifiziert. Das Verhältnis zwischen den quantifizierten und den eingesetzten Konzentrationen entspricht der Wiederfindung der Analysenmethode.

Die Eichung und die Quantifizierung wurden mit Hilfe der gerätespezifischen Software „Saturn Version 5.2“ (Fa. Varian) durchgeführt.

Die Qualität der Messungen wurde durch die Analyse eines zertifizierten nitro-PAK Standards NIST SRM1587 (Fa. Promochem) Labor intern abgesichert. Der Vergleich mit Messungen des Prager Instituts bestätigt ebenfalls die erhaltenen Ergebnisse (vgl. Kapitel 5.6.2).

4.3 Biologische Untersuchungen

4.3.1 Ames-Test der Luftstaubextrakte

Die Ames-Tests der Luftstaubextrakte wurden im biologischen Labor (Biotest-Labor) am Hygiene-Institut durchgeführt.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Testmethode zur Durchführung des Ames-Testes basiert auf dem im Forschungsprojekt entwickelten und angewendeten Verfahren. Eine ausführliche Beschreibung aller für die Testprozedur notwendigen Materialien und Geräte wurde als Standardarbeitsanleitung im Rahmen des Projektes „Angewandte Ökologie“ publiziert⁸.

Die Testbakterien werden in Nutrient Broth als Nährmedium im Schüttler bei 37 °C in 10 Stunden aus eingefrorenen Stammkulturen angezüchtet. 2 ml Top-Agar werden in Einmalkulturröhrchen gefüllt und 50 µl der Testsubstanz, 500 µl Phosphatpuffer oder 500 µl S9-Mix bei metabolischer Aktivierung und 100 µl der Testbakterienkultur zugegeben. Diese Mischung wird in eine Petrischale mit Minimalagar auf Histidin-freier Grundlage gegossen und gleichmäßig verteilt. Dem Top-Agar wird vor Testbeginn eine 10% Biotin/Histidin-Lösung für die Entwicklung des Hintergrundrasens beigemischt und wird während des Versuchsverlaufes in einem temperierten Wasserbad aufbewahrt.

Für die Teststämme TA98 und TA100 wurden alle Rezepturen nach der in der Literatur angegebenen Arbeitsvorschrift hergestellt. Eine Abweichung bei den neuen Teststämmen TA700x betrifft die Glucosekonzentration in den Agarplatten, die von 2% auf 0,4% zur Optimierung des Zellwachstums gesenkt wurde.

Nach Inkubation bei 37 °C für 72 Stunden wird die Revertanzahl sowie der Hintergrundrasen der Platten bestimmt. Hierfür wird der Rasen der Testplatten mit dem der Negativkontrollen verglichen. Der Hintergrundrasen dient der Unterscheidung zwischen negativen Testergebnissen und Bakterientoxizität. Falls die Probe bakterientoxisch wirkt, ist der Rasen schwach ausgeprägt oder nicht zu erkennen.

Als Positivkontrollen wurden für jeden Teststamm spezifische Mutagene eingesetzt. Die Spontanrevertanzahl oder Negativkontrolle wurde für jeden Teststamm mit dem jeweiligen Lösungsmittel der Proben (DMSO oder H₂O) ermittelt.

Die Durchführung des Tests erfolgt mit den Salmonellenstämmen TA98 und TA100 jeweils mit und ohne metabolische Aktivierung durch Zugabe des S9-Mix (Firma Cytotox Cell Research, Darmstadt).

Je fünf Verdünnungen werden pro Probe getestet mit einer Konzentration von je:

- 20,2 m³ Luft pro Platte
- 15,6 m³ "
- 10,1 m³ "
- 5,1 m³ "
- 1,0 m³ "

Glasfaserfilterextrakte und Polyurethanschaumfilterextrakte werden getrennt im Ames-Test untersucht. Jede Versuchsreihe wird im Doppelansatz mit Positiv-, Lösungsmittel- und Negativkontrolle durchgeführt.

Die zur Positivkontrolle verwendeten Substanzen sind in Tabelle 13 angegeben.

S9-MIX	STAMM TA 98	STAMM TA 100
(-)	2-Nitrofluoren in DMSO 1-Nitropyren in DMSO	Natriumazid in aqua bidest
(+)	2-Aminoanthracen in DMSO	2-Aminoanthracen in DMSO

Tabelle 13: Verwendete Positivkontrollen im Ames-Test

Von den ermittelten Revertanzahlen werden die Ergebnisse der Negativkontrolle subtrahiert. Die Revertanzahlen der Extrakte werden gegen die getesteten Luftvolumen pro Platte graphisch aufgetragen und auf Dosis-Wirkungsbeziehungen überprüft.

4.3.2 Ames-Test der fraktionierten Luftstaubextrakte

Die Eluate der HPLC-Fraktionierungen wurden einzeln im Ames-Test untersucht. Im Fall der Umkehrphasenchromatographie wurden die wässrigen Fraktionen direkt in den Test eingebracht. Die Probevolumen von 2 bis 4 ml erforderten einen doppelt konzentrierten Softagar.

Die nicht-wässrigen Fraktionen der Normalphasenchromatographie wurden im Stickstoffgasstrom bis zur Trockene eingengt und in 220 µl DMSO rückgelöst. Es wurden 100 µl Probelösung je Testplatte im Doppelansatz eingesetzt.

4.3.3 ³²P-Postlabeling der Luftstaubextrakte

Die ³²P-Postlabeling-Untersuchungen der Luftstaubextrakte mit Hilfe der Mitarbeiter des DKFZ innerhalb der Abteilung Umwelttoxikologie durchgeführt.

Die zu untersuchende DNA wird mit dem Probematerial inkubiert und enzymatisch zu Desoxyribonukleosid-3'-Phosphaten über Micrococcal Nuclease/Spleen Phosphodiesterase 1:1 verdaut. Nach der Standardmethode werden mit einem Überschuß ATP (kalt) und ca. 100µCi [γ -³²P]-ATP alle Nukleosid-3'-Phosphate am 5'-OH der Desoxyribose markiert. Die Markierungsreaktion wird bei pH 9,5 durchgeführt, wodurch die 3'-Phosphatase-Aktivität der T4 Polynukleotidkinase unterdrückt wird.

Nach einer multidimensionalen chromatographischen Auftrennung der radioaktiven Produkte auf einer Dünnschichtplatte (Polyethylenimin-Cellulose) mit verschiedenen Laufmitteln und anschließender Autoradiographie erhält man als Ergebnis adduktierte Nukleosid-3',5'-bisphosphate als schwarze Adduktflecken.

Zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Addukte werden 4 Läufe mit unterschiedlichen Laufmittelzusammensetzungen durchgeführt.

1. Lauf: 1,1 LiCl, pH 6
2. Lauf: 2,5m Ammoniumformiat pH 3,5
3. Lauf: 3m Lithiumformiat / 8m Urea pH 3,5
4. Lauf: 0,8m LiCl / 0,5m Tris-HCl / 8m Urea pH 8

Die Bestimmung der Radioaktivitätsmenge in den Adduktflecken im Vergleich zu der Gesamt-Radioaktivitätsmenge in normalen Bisphosphaten plus Addukten ergibt den sogenannten RAL-Wert (relative adduct labeling), der die Adduktmenge pro normale Nukleotide angibt.

Die ursprüngliche Methode wurde besonders im Hinblick auf die Empfindlichkeit durch Anreicherungsverfahren verbessert. Zur Anreicherung können lipophile Addukte aus dem DNA-Hydrolysat mit n-Butanol unter Zusatz eines Phasentransfer-Reagenz extrahiert, oder aber mit dem Enzym Nuklease P1 weiter verdaut werden. Das Enzym spaltet die 3'-Phosphatgruppe der normalen Nukleotide ab, nicht aber wenn besonders sperrige Reste an die Nukleobasen gebunden sind und die so modifizierten Nukleotide gegenüber dem Enzym Nuklease P1 resistent werden lassen. Die Aufarbeitung der adduktierten DNA ist im Anhang in Kapitel 7.6 schematisch dargestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Extraktionsversuche

Die im folgenden beschriebenen Experimente hatten zum Ziel, das optimale Lösungsmittel zur Soxhletextraktion von Luftstäuben zu ermitteln. Hierbei wurden zwei Merkmale betrachtet; erstens der extrahierbare Massenanteil und zweitens das genotoxische Potential in Abhängigkeit von der Polarität des Extraktionsmittels. Aus den Ergebnissen liessen sich erste Erkenntnisse über den Charakter der mutagen wirksamen Inhaltsstoffe ableiten.

5.1.1 Extrahierbarer organischer Massenanteil (EOM)

Die Versuche zur Ermittlung des optimalen Extraktionsmittels wurden mit einem kommerziell erhältlichen Referenzmaterial (NIST SRM1649) durchgeführt. Die Kriterien waren die maximale Extraktionsausbeute an organischem Material (EOM) und die höchste Mutagenität im Ames-Test. Die Lösungsmittel wurden nach aufsteigender Polarität ausgewählt, wobei die Inertheit des Lösungsmittels, ein möglichst niedriger Siedepunkt und eine gleichmäßige Steigerung der Polarität die Auswahl bestimmten.

Der extrahierbare Massenanteil für die einzelnen Extraktionsmittel wurde durch Auswiegen des festen Extraktionsrückstandes ermittelt. Die nachstehende Tabelle fasst die ermittelten EOM-Massen zusammen.

Extraktionsmedium	Siedepunkt [°C]	Polarität	Extrahierter Anteil [%]	Einwaage [mg]
n-Pentan	36,1	0	9	85,68
tert-Butylmethylether	55,2	0,2	16	84,18
Dichlormethan	40,0	0,42	25	83,79
Aceton	56,2	0,56	25	83,87
2-Propanol	82,4	0,82	17	85,67
Wasser	100,0	∞	8	82,66

Tabelle 14: Extrahierbarer organischer Anteil des Referenzstaubes NIST SRM1649

Diese Werte sind jedoch mit einem hohen methodischen Fehler (Wägefehler) behaftet und können somit nur als Anhaltspunkte dienen. Zudem läßt sich das Lösungsmittel aus dem

Rückstand nur unvollständig entfernen, wobei keine Aussage über den Restanteil des Lösungsmittels an der ausgewogenen EOM-Masse getroffen werden kann.

Der Anteil an extrahierbaren organischen Verbindungen schwankte bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Extraktionen für Aceton zwischen 12 und 25 % je nach dem Gewicht der Einwaage und dem Extraktionsvolumen des Soxhletextraktors.

Der absolute Massenanteil an organischen und flüchtigen anorganischen Verbindungen läßt über den Glühverlust des Luftstaubes bestimmen und lag für das Referenzmaterial NIST SRM1649 bei etwa $38 \% \pm 2$.

Die Differenz zwischen Glühverlust von 36 % und extrahierbarem Anteil bei circa 20 % läßt sich über die allgemeine Zusammensetzung atmosphärischer Luftstäube erklären. Flüchtige anorganische Salze wie Sulfide, Carbonate oder Cadmiumsalze werden bei 550 °C teilweise freigesetzt. Elementarer Kohlenstoff, Rußpartikel und Gummiabrieb tragen ebenfalls einen Anteil verglühbare Masse in Luftstäuben, die nicht mit Lösungsmitteln extrahierbar ist. In der Literatur werden die Luftstaubpartikel größer 0,5 µm in ihrer Zusammensetzung folgendermaßen charakterisiert.

- Anorganische Salze und Mineralien
- Elementarer Kohlenstoff, Ruß
- Organische Verbindungen

Über diese Zusammensetzung läßt sich der Unterschied zwischen dem mit Aceton extrahierbarem Anteil und dem theoretischen organischen Anteil, dem Glühverlust erklären.

5.1.2 Extrahierbare Genotoxizität

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die mutagene Aktivität der Luftstaubextrakte im Ames-Test für die im vorangegangenen Kapitel genannten Extraktionsmittel bestimmt.

Die Abbildung 14 stellt die Ergebnisse des ersten Extraktionsversuches (siehe Tabelle 14) in Hinblick auf die genotoxische Wirkung im Ames-Test für den Stamm TA98 mit metabolischer Aktivierung in graphischer Form dar. Die y-Achse entspricht der Mutagenität in Revertanten je Platte, die z-Achse gibt einzelnen Verdünnungsstufen wider und entlang der Rubrikenachse sind die untersuchten Lösungsmittel aufgeführt.

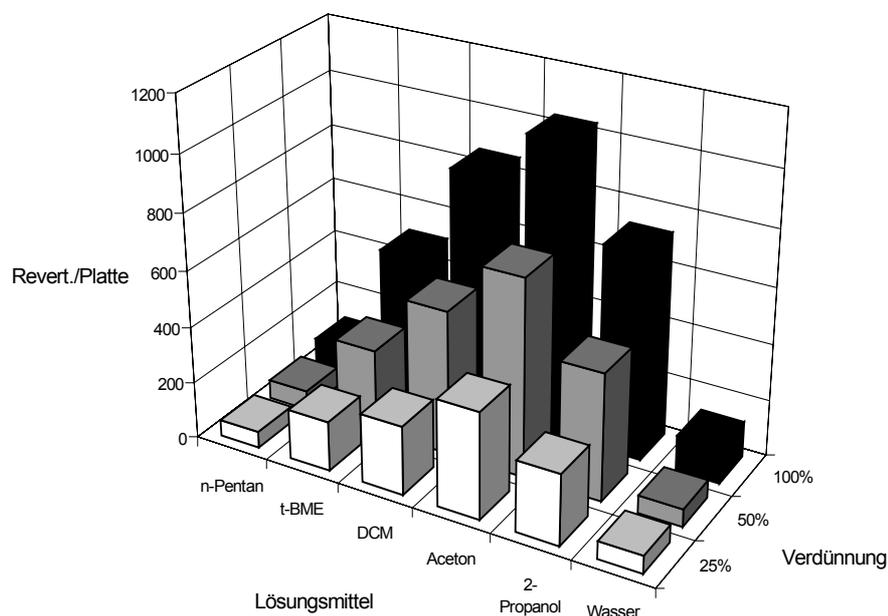


Abbildung 14: Mutagene Aktivität von Luftstaubextrakten bei verschiedenen Extraktionsmitteln im Stamm TA98 mit metabolischer Aktivierung

Es zeigt sich, daß die mutagene Aktivität des Extraktes wie die Extraktionsausbeute von der Polarität des verwendeten Lösungsmittel abhängig ist. Bei der Verwendung von Aceton bzw. Dichlormethan wurden die höchsten mutagenen Aktivitäten für den organischen Extrakt im Ames-Test erhalten. Alle Extrakte zeigen eine sehr gute lineare Dosiswirkungsbeziehung mit einem Korrelationskoeffizienten $r^2 > 0,98$. Bei einer Extraktionsdauer von 24 h ergibt der Luftstaubextrakt von Aceton das größte genotoxische Potential im Ames-Test.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden insgesamt 10 verschiedene Lösungsmittel untersucht. Die Mutagenität im Ames-Test wurde im Stamm TA98 mit und ohne metabolische Aktivierung ermittelt. Von den getesteten Lösungsmitteln zeigt der Extrakt des

Tetrahydrofurans cytotoxische Wirkung im Ames-Test und wurde bei der Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt.

In der Tabelle 15 sind die Lösungsmittelpolaritäten und die Induktionsraten der Luftstaubextrakte im Stamm TA98 der zweiten Versuchsreihe zusammenfasst dargestellt.

LÖSUNGSMITTEL	POLARITÄT ϵ°	MUTAGENITÄT INDUKTIONSRATE
n-Pentan	0,0001	$1,1 \pm 0,1$
Cyclohexan	0,01	$3,6 \pm 0,3$
t-Butylmethylether	0,2	$5,3 \pm 0,4$
Toluol	0,28	$7,8 \pm 0,6$
Dichlormethan	0,42	$9,0 \pm 0,8$
Aceton	0,56	$12,0 \pm 0,9$
Methanol	0,95	$10,2 \pm 0,8$
2-Propanol	0,82	$7,5 \pm 0,6$
Wasser	∞	$1,3 \pm 0,2$

Tabelle 15: Ergebnisse der Extraktionsversuche mit unterschiedlichen Lösungsmitteln

Das folgende Balkendiagramm (Abbildung 15) stellt die Werte der Induktionsraten im Ames-Test für den Stamm TA98 aus Tabelle 15 dar.

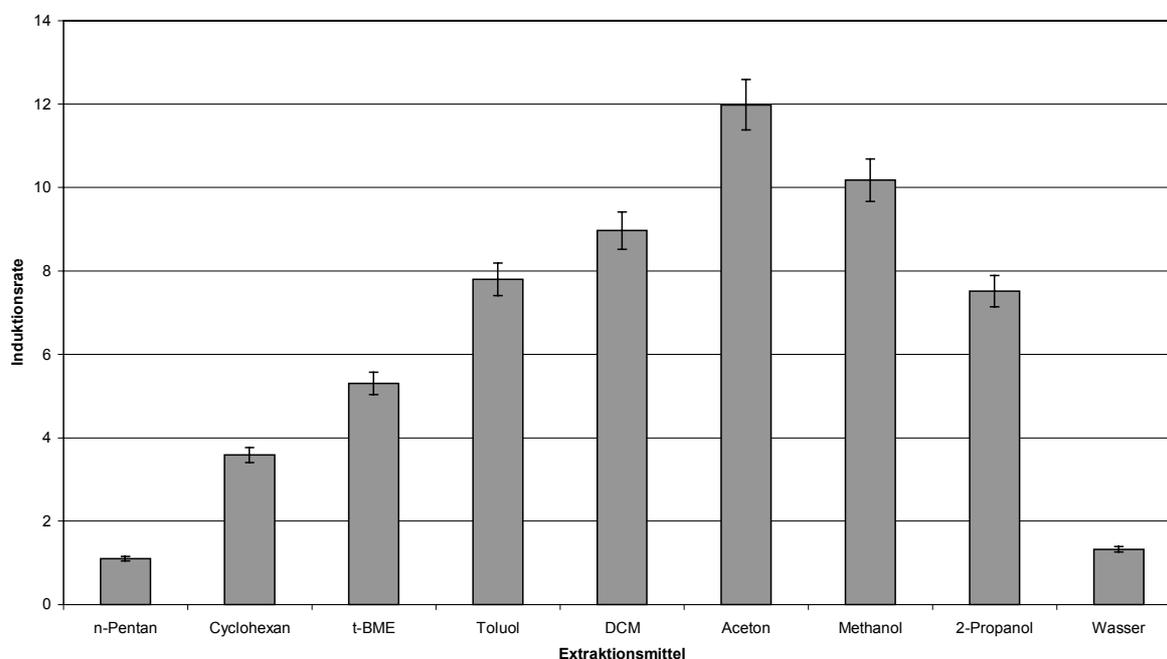


Abbildung 15: Induktionsraten der Luftstaubextrakte von SRM1649 im Stamm TA98 mit metabolischer Aktivierung

Die Lösungsmittel wie n-Hexan und Cyclohexan sowie Wasser zeigen wie in der ersten Versuchsreihe die geringste Induktionsraten bzw. mutagene Aktivität. Wiederum ergibt das Lösungsmittel Aceton (Induktionsrate 12,0), gefolgt von Methanol (Induktionsrate 10,2) und Dichlormethan (Induktionsrate 9,0) die höchste mutagene Aktivität im Ames-Test.

Die Darstellung der Induktionsraten in Abbildung 15 deuten einen Zusammenhang zwischen Polarität des Extraktionsmittels und der im Ames-Test detektierbaren Mutagenität an. In Abbildung 16 sind auf der x-Achse die Polarität des Extraktionsmittels und auf der y-Achse die Induktionsrate im Ames-Test für den Stamm TA98 mit metabolischer Aktivierung aufgetragen.

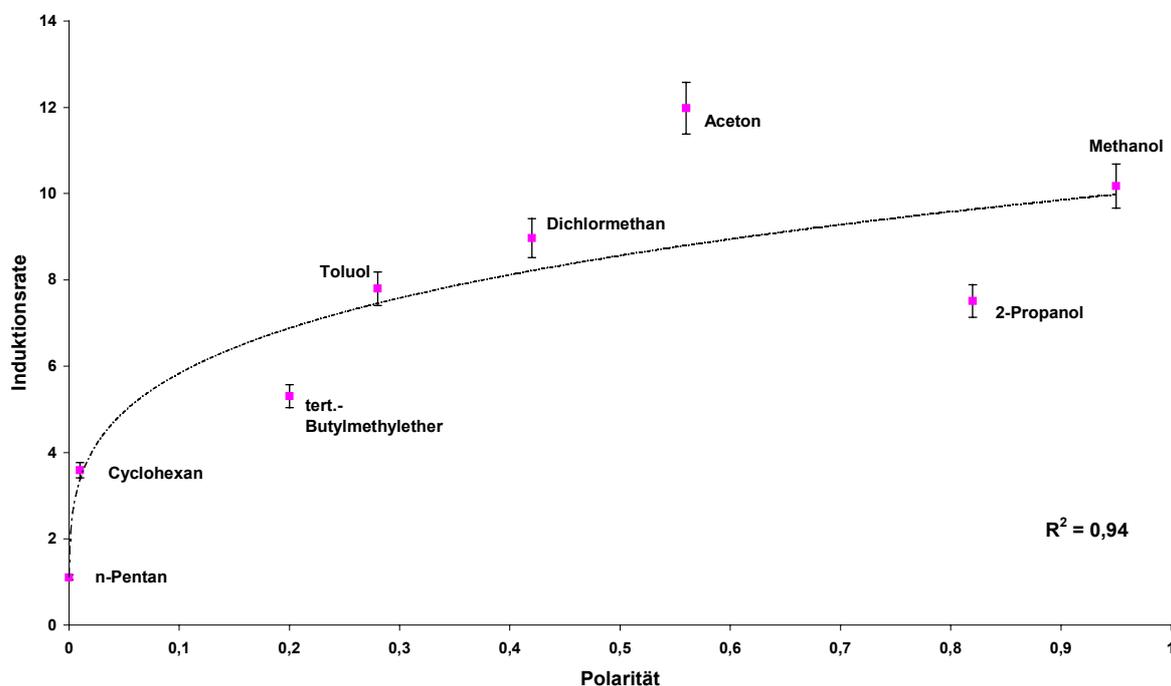


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen Lösungsmittelpolarität und Induktionsrate im Ames-Test

Die gestrichelte Linie stellt eine potentielle Trendlinie mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,94$ dar. Die dargestellten Werte in Abbildung 16 beinhalten nur die organischen Lösungsmittel, da kein definierter Polaritätswert für Wasser vorliegt.

Unter der Annahme, daß es sich bei den Zielverbindungen um moderat polare Substanzen handelt, lassen sich die bisherigen Ergebnisse plausibel erklären.

Die Lösekraft der unpolaren Lösungsmittel reicht nicht aus, um ausreichende Mengen der aktiven Substanzen von der Oberfläche der Staubpartikel zu lösen. Im Gegensatz hierzu ist das Wasser nicht in der Lage die hydrophobe Schicht auf der Partikeloberfläche zu durchdringen und die organischen Substanzen zu lösen. Die mittelpolaren Lösemittel wie

Aceton oder Dichlormethan zeigen die höchste Extraktionsausbeute, da sie ein ausreichendes Lösungsvermögen für die aktiven Substanzen besitzen und in der Lage sind die hydrophobe Oberflächenschicht zu lösen.

Die Ergebnisse der Extraktionsversuche schliessen somit völlig unpolare wie z.B. aliphatische Kohlenwasserstoffe sowie stark polare organische Verbindung als die genotoxisch aktiven Verbindungen aus.

5.1.3 Sequentielle Extraktion mit Lösungsmitteln aufsteigender Polarität

Die Resultate der vorangegangenen Kapitel können durch eine modifizierte Versuchsanordnung bekräftigt werden. Der Standardstaub NIST SRM1649 wird für 12 h mit n-Hexan, 12 h mit Aceton und abschließend für 12 h mit Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden separat aufgearbeitet und im Ames-Test auf ihr mutagenes Potential getestet. Man erhält über dieses Experiment einen Einblick in die Polarität der mutagen wirksamen Luftinhaltsstoffe und deren Anteil der Gesamtmutagenität.

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der Experimente bei sequentieller Extraktion für je 12 Stunden im Stamm TA98 mit und ohne metabolische Aktivierung (S9-Mix) dargestellt.

LÖSEMITTEL	STAMM TA98 OHNE S9-MIX	STAMM TA98 MIT S9-MIX
n-Hexan	1,8 ± 0,1	2,1 ± 0,2
Aceton	11,0 ± 0,9	9,0 ± 1
Methanol	2,8 ± 0,2	1,6 ± 0,1

Tabelle 16: Induktionsraten bei sequentieller Extraktion für je 12 Stunden

Die folgende Abbildung zeigt das Versuchsergebnis als Balkendiagramm. Auf der y-Achse des Diagrammes ist die Induktionsrate des Ames-Testuntersuchung aufgetragen.

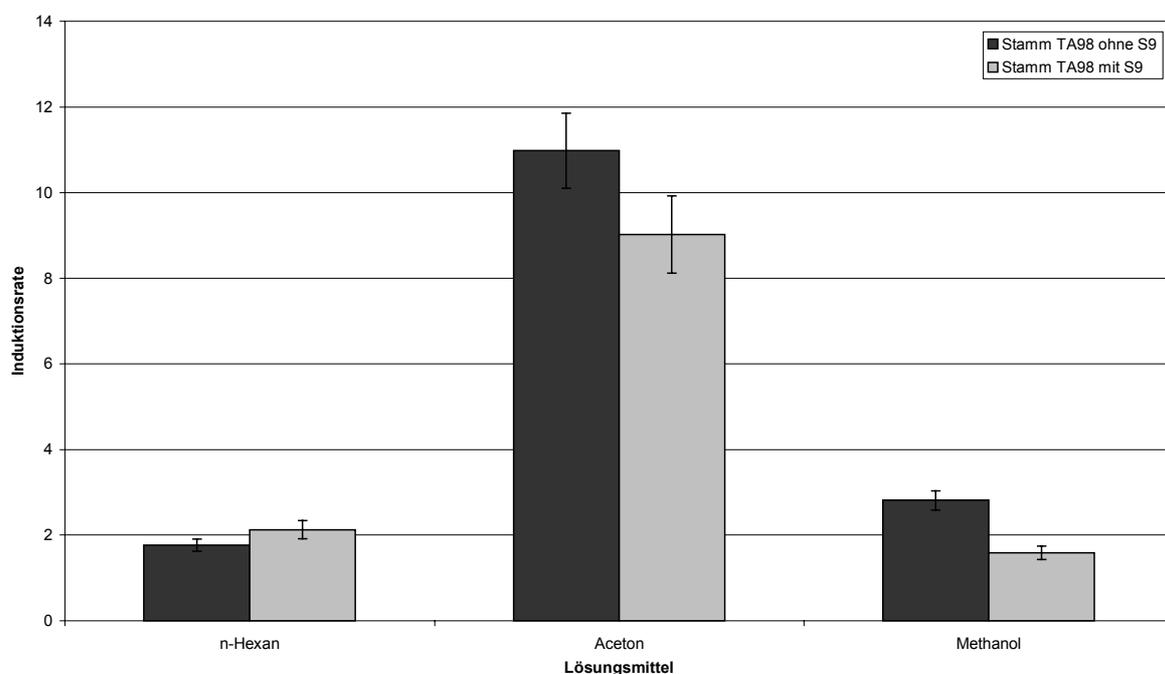


Abbildung 17: Induktionsraten bei aufeinanderfolgender Extraktion mit Lösungsmitteln aufsteigender Polarität.

Die Induktionsraten für die Untersuchung im Stamm TA98 ohne metabolischer Aktivierung sind als dunkle Balken, die Ergebnisse für den Stamm TA98 mit metabolischer Aktivierung sind als helle Balken dargestellt. Für n-Hexan als Extraktionsmittel ist im Gegensatz zu Aceton oder Methanol die Mutagenität mit metabolischer Aktivierung größer als ohne S9-Mix Zugabe. Bei einem direkten Vergleich der drei Lösungsmittel weist Aceton eine 4-5 fach höhere Mutagenität in beiden Testvarianten auf. Die Werte für n-Hexan und Methanol bewegen sich im Vergleich auf etwa gleichem Niveau.

Die höhere Mutagenität für n-Hexan bei der Durchführung des Ames-Tests mit S9-Mix kann mit dem Anteil an polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) im Extrakt in Zusammenhang gebracht werden. Die PAK stellen eine unpolare Verbindungsklasse dar, die im Ames-Test nur mit metabolischer Aktivierung Revertanten induziert. Durch das unpolare n-Hexan werden demnach zuerst die unpolaren Verbindungen aus dem Luftstaubmaterial extrahiert, die ein geringes bzw. ein indirektes mutagenes Potential aufweisen.

Der Extrakt des Acetons enthält den Hauptteil der Mutagenität. Durch die Zugabe von S9-Mix sinkt das genotoxische Potential ab, d.h. der Anteil an direkt mutagen wirksamen Verbindungen ist höher als im Extrakt des n-Hexans. Die Zugabe eines metabolisierenden Enzymsystems desaktiviert bzw. reduziert die Genotoxizität des Luftstaubextraktes. Ein entsprechendes Ergebnis ist auch für den Methanolextrakt zu beobachten, wobei die Reduzierung in diesem Falle deutlich ausgeprägt ist.

Zusammenfassend lassen sich aus den Resultaten der Extraktionsversuche die folgenden Schlußfolgerungen über die Eignung der getesteten Lösungsmittel sowie den Charakter der mutagen wirksamen, partikulären Luftschadstoffe ziehen.

- Lösungsmittel mittlerer Polarität ergeben die beste Extraktionsausbeute an EOM und Mutagenität aus Luftstäuben.
- Aceton ist auf Grund seiner toxikologischen Eigenschaften und seinem Lösevermögen das Lösungsmittel der Wahl zur Soxhletextraktion von Luftstäuben.
- Unterschiedlich polare Lösungsmittel extrahieren spezifische Stoffgruppen mit unterschiedlichen genotoxischen Potentialen.
- Unpolare und stark polare Verbindungen können nicht die Träger der Mutagenität in Luftstaubextrakten sein.
- Die genotoxischen Verbindungen in Luftstaubextrakten benötigen keine metabolische Aktivierung und sind somit direkt wirksame Mutagene.

5.2 Flüssig/Flüssig-Extraktion

Über die Extraktionsversuche konnte ein erster Hinweis auf die Polarität der genotoxischen Verbindungen in organischen Luftstaubextrakten gewonnen werden. Das betrachtete Probematerial war in diesen Versuchen ausschliesslich das Standardmaterial NIST SRM1649. Eine weiterreichende Charakterisierung der mutagenen Luftstaubextrakte unter Anwendung der „Bioassay dirigierten Fraktionierung“ wurde über eine Flüssig/Flüssig-Extraktionsmethode mit Luftstaubproben unterschiedlicher Herkunft durchgeführt.

Die verwendete Trennmethode basiert auf den Säure/Base-Eigenschaften der Inhaltsstoffe in organischen Luftstaubextrakten. Die Flüssig/Flüssig-Extraktion verfolgte zwei parallele Ansätze. Zum Einen sollte eine Trennung der Luftstaubextrakte durchgeführt werden, die eine Aussage über die chemischen Säure-/Base-Eigenschaften der genotoxischen Verbindungen geben kann.. Zum Anderen sollte diese Methode als Vortrennstufe für weitere semipräparative HPLC-Trennungen erprobt werden.

Als Probematerial standen die folgenden Luftstäube in ausreichender Quantität zur Verfügung.

- Standardstaub NIST SRM1649
- Standardstaub NIST SRM1648
- Abgaspartikel aus Kokereiabgasen, Kosice CSR
- Luftstaub aus Mannheim Mitte August
- Luftstaub aus Mannheim Mitte Oktober

Die Ergebnisse sind in zwei thematische Bereiche aufgeteilt. Im ersten Teil werden die Ergebnisse der biologischen Experimente präsentiert. Im zweiten Teil werden die Resultate der chemisch-analytischen Untersuchungen mit gaschromatographischen Gerätekopplungen vorgestellt (s. Kapitel 0).

5.2.1 Untersuchung der Genotoxizität im Ames-Test

Über die in Kapitel 4.2.3 zuvor beschriebene Trennmethode können vier Fraktionen erhalten werden. Diese vier Fraktionen enthalten Verbindungen mit je stark sauren, schwach sauren, neutralen und basischen Eigenschaften. Die unbehandelten Extrakte sowie die Fraktionen wurden im Ames-Test auf ihre mutagene Wirksamkeit untersucht. Zwischen den Extrakten aus Luftstaubproben unterschiedlicher Herkunft wurden das Ausmaß der mutagenen Aktivität und die Verteilungsmuster über die 4 Fraktionen verglichen.

Die folgenden Tabellen (Tabelle 17-Tabelle 20) stellen die Ergebnisse der Ames-Testuntersuchungen für den Stamm TA98 mit und ohne metabolische Aktivierung zusammengefasst dar. Die einzelnen Spalten enthalten die Induktionsraten der drei Verdünnungsstufen für die Versuchsdurchführung mit metabolischer Aktivierung (mit + gekennzeichnet, weisse Spalte) und ohne metabolische Aktivierung (mit - gekennzeichnet, graue Spalte). Die Induktionsraten errechnen sich aus dem Quotient zwischen dem Mittelwert der Revertanten pro Platte je Verdünnungsstufe und dem Mittelwert der Revertanten pro Platte der Negativkontrollen. Die Versuchsreihe wurde für alle Luftstaubextrakte im Dreifachansatz je Variante mit und ohne S9-Mix durchgeführt. Die Induktionsraten der Vollextrakte sind mit den Induktionsraten der jeweiligen Fraktionen durch die unterschiedlichen Probemengen nicht direkt vergleichbar.

	INDUKTIONSRATEN					
	25 %		50 %		100 %	
Probe / Fraktion	+	-	+	-	+	-
Vollextrakt	1,74	1,15	2,27	1,85	2,70	2,08
Starke Säuren	1,11	0,92	1,19	1,01	1,20	1,01
Schwache Säuren	1,03	0,92	1,05	0,99	1,26	1,00
Basen	1,04	1,03	0,92	0,94	0,94	0,90
Neutralfraktion	1,90	1,87	2,97	2,8	4,41	4,27

Tabelle 17: Kokereiabgaspartikelextrakt Kosice, CSR, im Stamm TA98 mit (+) und ohne (-) metabolische Aktivierung

Die Ergebnisse der Fraktionierung der Luftstaubprobe aus Kosice zeigen, daß annähernd das gesamte genotoxische Potential in der neutralen Fraktion zu finden ist. Diese Beobachtung ist unabhängig von der S9-Mixzugabe.

Bei den atmosphärischen Luftstäuben ergibt sich eine andere Verteilung der mutagene Aktivität.

	INDUKTIONSRATEN					
	25 %		50 %		100 %	
Probe / Fraktion	+	-	+	-	+	-
Vollextrakt	7,14	6,25	9,76	9,64	19,30	12,26
Starke Säuren	3,43	5,26	6,57	8,95	13,27	13,04
Schwache Säuren	1,09	1,20	1,33	1,47	1,49	1,80
Basen	1,03	0,93	1,21	1,04	1,08	0,93
Neutralfraktion	2,41	2,26	3,98	3,11	9,82	4,94

Tabelle 18: Standardstaubextrakt NIST SRM1649 im Stamm TA98 mit (+) und ohne (-) metabolische Aktivierung

Die Fraktion der „starken Säuren“ des Standardstaubextraktes NIST SRM1649 zeigt die höchste mutagene Aktivität (Tabelle 18). Der Betrag ist weitgehend unabhängig von der Art der Versuchsdurchführung. Die Induktionsrate der „neutralen“ Fraktion verdoppelt sich bei Zugabe von S9-Mix im Vergleich zur Variante ohne S9-Mix. Die beiden restliche Fraktionen „schwache Säuren und Basen“ spielen in Bezug auf die Induktionsraten eine untergeordnete Rolle.

	INDUKTIONSRATEN					
	25 %		50 %		100 %	
Probe / Fraktion	+	-	+	-	+	-
Vollextrakt	2,51	3,26	3,56	3,56	4,51	5,21
Starke Säuren	1,72	3,52	2,24	4,36	4,59	6,24
Schwache Säuren	1,13	1,44	1,31	2,50	1,82	3,15
Basen	1,09	1,17	1,07	1,11	1,03	1,21
Neutralfraktion	3,42	3,67	4,18	4,56	5,31	7,00

Tabelle 19: Luftstaubextrakt Mannheim Mitte August im Stamm TA98 mit (+) und ohne (-) metabolische Aktivierung

Die Fraktionen des Luftstaubextraktes aus Mannheim Mitte (Augustprobe) ergeben ein neues Verteilungsmuster der Induktionsraten. Die Neutralfraktion weist die höchste Induktionsraten auf, gefolgt von der Fraktion der „starken Säuren“. Die Beträge sind in beiden Fällen bei der

Versuchsdurchführung mit S9-Mix erniedrigt. Dies deutet auf einen hohen Anteil direkt wirksamer Mutagene in beiden Fraktionen hin.. Die Induktionsrate der „schwach sauren“ Fraktion zeigt ebenfalls ein genotoxisches Potential an. Die „basische“ Fraktion spielt im Vergleich zu den anderen Fraktionen keine Rolle.

	INDUKTIONSRATEN					
	25 %		50 %		100 %	
Probe / Fraktion	+	-	+	-	+	-
Vollextrakt	10,16	9,02	13,71	13,29	14,89	20,52
Starke Säuren	5,82	7,93	10,31	10,14	16,42	18,70
Schwache Säuren	1,74	1,80	2,14	3,10	4,21	5,25
Basen	1,27	1,07	1,46	1,15	1,75	1,20
Neutralfraktion	4,96	4,00	10,86	6,88	16,73	8,95

Tabelle 20: Luftstaubextrakt Mannheim Mitte Oktober im Stamm TA98 mit (+) und ohne (-) metabolische Aktivierung

In Tabelle 20 sind die Ergebnisse der Untersuchung des Luftstaubextraktes aus Mannheim Mitte (Oktoberprobe) dargestellt. Die Fraktion der „starken Säuren“ zeigt die höchste mutagene Aktivität (Tabelle 18). Der Betrag der Induktionsraten ist abhängig von der Art der Versuchsdurchführung. Die Induktionsrate der „neutralen“ Fraktion verdoppelt sich bei Zugabe von S9-Mix im Vergleich zur Variante ohne S9-Mix. Die „stark saure“ und die „schwach sauren“ Fraktion ergeben in der Variante mit metabolischer Aktivierung ca. 20% geringere Induktionsraten. Die Induktionsrate der „schwach sauren“ Fraktion zeigt ebenfalls ein genotoxisches Potential an, die Fraktion der basischen Verbindungen weist eine schwache Aktivität auf.

Die Probematerialien aus Mannheim (Oktober) und das NIST-Standardmaterial zeigen für die mutagene Aktivität grundsätzlich das gleiche Verteilungsmuster zwischen den einzelnen Fraktionen, wobei die Fraktion der stark sauren Verbindungen das höchste genotoxische Potential aufweist. In der Fraktion der neutralen Verbindungen ist im Vergleich zur „sauren“ Fraktion in etwa ein Drittel bis die Hälfte der mutagenen Aktivität vorhanden. Schwache Säuren und basische Verbindungen zeigen schwache bzw. keine genotoxische Wirksamkeit.

Interessant ein Vergleich der beiden Luftstaubproben aus Mannheim. Die Proben vom August und Oktober zeigen einige Unterschiede. Die Gesamtmutagenität des Vollextraktes sowie die Induktionsraten der einzelnen Fraktionen sind bei der Probe vom August um einen Faktor 3-4

geringer als bei der Probe vom Oktober. Dies weist auf eine jahreszeitliche Abhängigkeit der Mutagenität hin, welche im Rahmen des Gesamtprojektes über zeitliche Mutagenitätsprofile (Gesamtzeitraum 3 Jahre) bestätigt werden konnte. Ein weiterer Unterschied ergibt sich bei dem Vergleich der Induktionsraten aus den unterschiedlichen Versuchsdurchführungen. Die „Neutralfraktion“ wie auch der Vollextrakt der Probe vom August zeigen eine geringere Induktionsrate bei der Zusatz von S9-Mix. Im Gegensatz hierzu weist die Probe vom Oktober eine Verdopplung der Induktionsrate bei der Variante mit metabolischer Aktivierung für die „Neutralfraktion“ auf. Die Induktionsrate des Vollextraktes der Probe vom Oktober ist bei Zugabe von S9-Mix erniedrigt.

Diese Unterschiede zwischen den Proben vom August und Oktober können mit den unterschiedlichen atmosphärischen Bedingungen in diesen beiden Monaten in Zusammenhang gebracht werden.

Die Tabelle 21 zeigt eine Zusammenstellung der durchschnittlichen Meßdaten der UMEG-Messtation für August und Oktober.

PARAMETER	AUGUST	OKTOBER
SO ₂ [μgm^{-3}]	5,61	11,85
NO ₂ [μgm^{-3}]	42,73	37,07
NO [μgm^{-3}]	14,55	50,72
CO [mgm^{-3}]	0,30	0,86
Staub [μgm^{-3}]	33,61	37,64
Ozon [μgm^{-3}]	58,42	10,03
Windrichtung [°]	212,94	181,60
Windgeschwindigkeit [ms^{-1}]	1,63	1,14
Globalstrahlung [Wm^{-2}]	162,41	58,04
Temperatur [°C]	21,61	14,78
Taupunkt [°C]	12,78	10,54
Niederschlag [mm]	0,07	0,02

Tabelle 21: Übersicht der UMEG-Meßdaten Station Mannheim Mitte für 1995

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß sich die atmosphärischen Bedingungen in Mannheim im August und Oktober deutlich unterscheiden. Die „August“-Messdaten spiegeln eine Atmosphäre mit oxidativen Eigenschaften wider, wobei die Globalstrahlung und die Durchschnittstemperatur schnelle, photochemische Transformationsreaktionen begünstigen. Die Oktoberdaten deuten auf langsamere oxidative Transformationsprozesse hin. Diese

verschiedenen atmosphärischen Reaktionsbedingungen können zu unterschiedlichen Transformationsprodukten mit anderen genotoxischen Eigenschaften im Ames-Test führen. Diese Beobachtung konnte durch chemisch analytischen Untersuchungen bekräftigt werden.

Die Probe aus Kosice (CSR) zeigt im Vergleich zu den Extrakten aus den Stäuben aus Baden-Württemberg (Mannheim Mitte August, Mannheim Mitte Oktober) wie auch dem NIST-Standardmaterial ein völlig anderes Verteilungsmuster für die mutagene Aktivität. Hier befindet sich das genotoxische Potential des Extraktes in der Fraktion der neutralen Verbindungen. Die unterschiedliche Verteilung der mutagenen Aktivität über die 4 Fraktionen bei der Probe aus Kosice und den anderen Luftstaubproben kann plausibel erklärt werden.

Bei den Luftstäuben aus Mannheim bzw. dem Standardmaterial NIST SRM1649 handelt es sich um Luftstäube, die in Gebieten gesammelt wurden, die primär eine Belastung durch den Straßenverkehr aufweisen. Zudem unterliegen sie in der Atmosphäre chemischen Transformationsprozessen. Das Probematerial aus Kosice bzw. NIST Vehicle Exhaust stammt hingegen von einer direkten Industrie- bzw. Dieselmotoremission und damit aus einer definierten Quelle. Die emittierten Partikel sind keinen atmosphärischen Transformationsreaktionen unterworfen, da sie direkt an der „Quelle“ gewonnen wurden. Die Hauptbestandteile an emittierten Schadstoffen stellen die Verbindungsklasse der PAK bzw. nitro-PAK dar. Diese Stoffgruppen werden in der „Neutralfraktion“ extrahiert und können für das beobachtete genotoxische Potential verantwortlich zeichnen. Über GC/MS-Analysen der einzelnen Fraktionen konnte dieser Befund bestätigt werden. Die Stoffklasse der PAK stellt einen Gewichtsanteil von etwa 80% an der Gesamtmasse der „Neutralfraktion“. Ebenfalls liessen sich einzelnen NitroPAK Verbindungen aus der Neutralfunktion quantifizieren. Das emittierte Schadstoffspektrum ist somit typisch für einen bestimmten Emittenten und kann sehr gut von anderen Emissionsquellen abgegrenzt werden.

5.2.2 Untersuchung der Genotoxizität mit TA700x-Teststämmen

Neben den „klassischen Ames-Teststämmen“ TA98 und TA100 standen die Basenpaar spezifischen Teststämme TA700X für den Ames-Test zur Verfügung. Diese Teststämme zeigen jeweils spezifisch eine bestimmte Basenaustauschmutation an. Mit den durchgeführten Experimenten sollte die Verwendbarkeit dieser Teststämme für komplexe Schadstoffgemische wie z.B. Luftstaubextrakte bzw. deren Fraktionen überprüft werden. Weiterhin sollte der Fragestellung nachgegangen werden, inwieweit die Ergebnisse der einzelnen TA700x und ihrer spezifischen Mutationsmuster Auskunft über den Charakter des genotoxischen Probematerials geben.

Das folgende Balkendiagramm (Abbildung 18) zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen in graphischer Form. Die neutrale und stark saure Fraktion sowie der Vollextrakt des Luftstaubextraktes NIST SRM1649 wurden in diesen Teststämmen untersucht. Auf der y-Achse ist die Induktionsrate aufgetragen und entlang der x-Achse die einzelnen Stämme TA700X sowie die Ergebnisse der unterschiedlichen Probematerialien in verschiedenen Grauschattierungen.

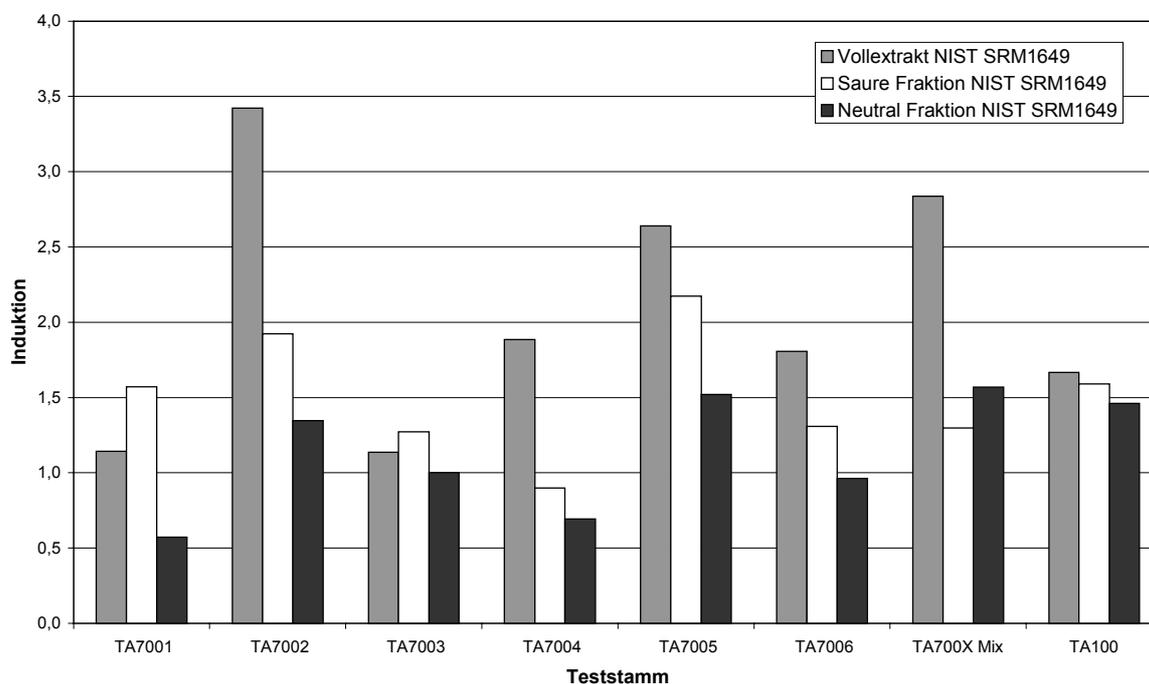


Abbildung 18: Vergleich der Mutagenität von Vollextrakt und flüssig/flüssig Fraktionen in Basenpaaraustausch spezifischen Teststämmen ohne S9-Mix

Ein direkter Vergleich der absoluten Induktionsrate zwischen den Fraktionen und dem Vollextrakt ist auf Grund der unterschiedlichen, nicht ineinander umrechenbaren Probemengen nicht möglich. Die relative Betrachtung läßt aber einige Aspekte erkennen. Die

saure Fraktion zeigt die höchste Induktionsrate im Stamm TA7005 und im Vergleich im Stamm TA7001. Die Stämme TA7002 und TA7005 ergeben über alle untersuchten Proben die höchsten Induktionsraten. Dieses Muster zeigt sich auch bei der Untersuchung von Realproben aus Mannheim. Zwei Luftstaubextrakte aus Mannheim Mitte vom Oktober 1995 und November 1996 sowie der Standardstaub NIST SRM1649 wurden mit den Stämmen im Ames-Test ohne metabolische Aktivierung untersucht.

Das folgende Balkendiagramm (Abbildung 19) zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen in graphischer Form. Auf der y-Achse ist die Induktionsrate aufgetragen und entlang der x-Achse die einzelnen Stämme TA700X sowie die Ergebnisse der unterschiedlichen Probematerialien in verschiedenen Grauwerten.

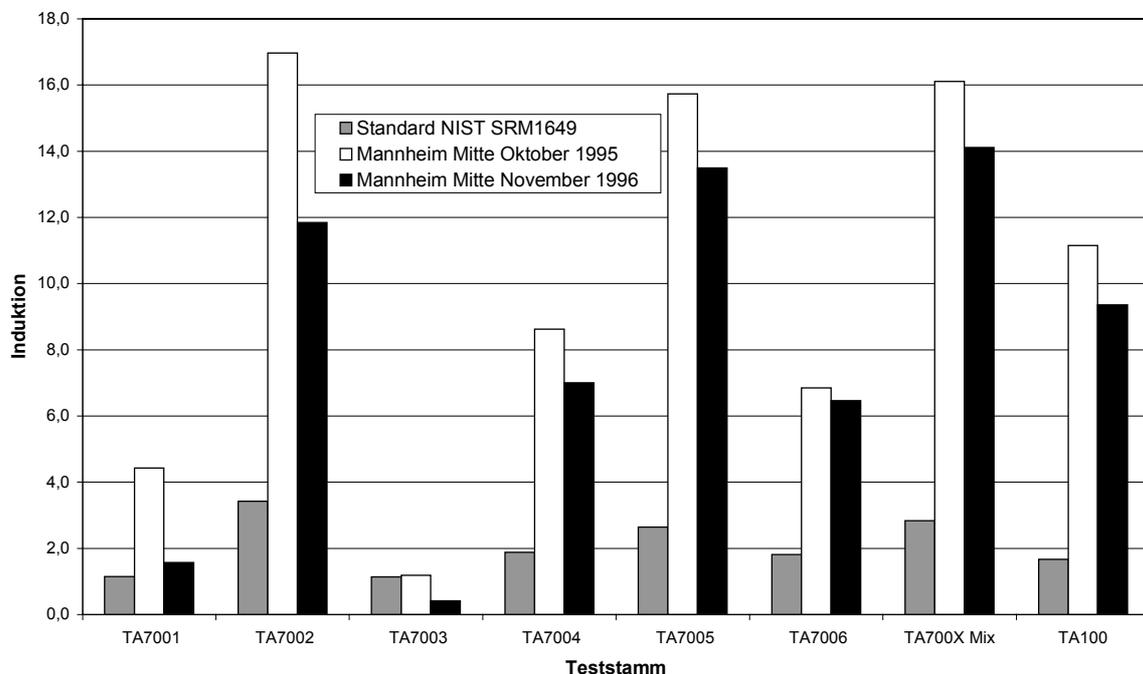


Abbildung 19: Vergleich der Mutagenität von verschiedenen Luftstaubextrakten in Basenpaaraustausch spezifischen Teststämmen ohne S9-Mix

Das Balkendiagramm zeigt, daß die Verteilungsmuster der unterschiedlichen Proben zwischen Basenpaar spezifischen Teststämmen sehr ähnlich sind. Die Stämme TA7002 und TA7005 ergeben die höchsten Induktionsraten. Die Langzeitproben zeigen ein deutlich höheres mutagenes Potential als das Standardmaterial.

Zusammenfassend können über den direkten Vergleich der genotoxischen Potentiale in den unterschiedlichen biologischen Testsystemen zwischen den verschiedenen Luftstaubextrakten und ihrer Fraktionen die folgenden Schlußfolgerungen abgeleitet werden.

- Die atmosphärische Luftstaubextrakte weisen die höchsten Mutagenitätswerte in den Fraktionen der sauren Verbindungen auf.
- Unpolare Verbindungen wie z.B. PAK oder nitro-PAK können nicht die Träger der Mutagenität in atmosphärischen Luftstaubextrakten sein.
- Die Höhe und das Verteilungsmuster der Mutagenität der einzelnen Fraktionen ist Jahreszeit abhängig. In den Winterproben ist die Mutagenität im Ames-Test höher als in den Sommermonaten. Dieses Ergebnis wird durch die Auswertung der Routinedaten der biologischen Untersuchungen bestätigt.
- Das in Washington DC gewonnene Standardmaterial NIST SRM1649 weist eine vergleichbare Mutagenitätsverteilung auf wie die in Mannheim entnommenen Staubproben. Die Hauptemittenten oder die atmosphärischen Transformationsprozesse sind demnach sehr ähnlich.
- Die direkten Industrieemissionen zeigen ein von den atmosphärischen Luftstaubextrakten unterschiedliches Verteilungsmuster. Die Mutagenität ist nicht an die Jahreszeit gekoppelt, sondern hängt wesentlich von der Art und den Bedingungen der Abgasproduktion ab.
- Die genotoxischen Verbindungen in Luftstaubextrakten der sauren Fraktion benötigen keine metabolische Aktivierung und sind somit direkt wirksame Mutagene. Die Verbindungen der neutralen Fraktion weisen durch eine metabolische Aktivierung eine höhere Mutagenität auf und sind somit größtenteils indirekt wirksame Mutagene.
- Basische Verbindungen spielen bei allen untersuchten Luftstaubextrakten keine Rolle im Hinblick auf die mutagene Wirksamkeit der Probe.
- Die Verteilungsmuster der Verbindungen von atmosphärischen Luftstaubextrakten sind bei der Verwendung der Basenaustausch-spezifischen Teststämme im Ames-Test identisch.
- Die mutagen wirksamen Verbindungen in Luftstaubextrakten sind bei einer Basenaustauschmutation weitgehend spezifisch, d.h. es werden bevorzugt A*T nach G*C und C*G nach A*T Mutationen induziert.

5.3 HPLC-Methodenentwicklung

5.3.1 Reversed-Phase Trennungen

Die Hauptaufgabe im Rahmen HPLC-Experimente lag in der Entwicklung einer reproduzierbaren und universell einsetzbaren HPLC-Methode zur Fraktionierung von organischen Luftstaubextrakten. Das entscheidende Kriterium für die Eignung der Methode war die direkte Verwendbarkeit der Fraktionen für anschließende biologische und chemische Experimente, um Veränderungen am ursprünglichen Probematerial zu minimieren.

Die ersten Trennversuche erfolgten an einer semi-präparativen C_{18} -modifizierten Kieselgelsäule (Fa. Beckmann, 250 mm, 10 mm, 5 μ m Material) mit einem Acetonitril/Wassergradienten. Die semi-präparative Dimensionierung der Trennsäule ist durch den hohen Materialbedarf der anschließenden biologischen und chemisch-analytischen Untersuchungen bedingt. Die folgende Abbildung zeigt ein entsprechendes HPLC-Chromatogramm des Standardmaterials NIST SRM1649. Zur Trennung wurden hierzu 8 mg Extrakt in 20 μ l THF gelöst und manuell injiziert.

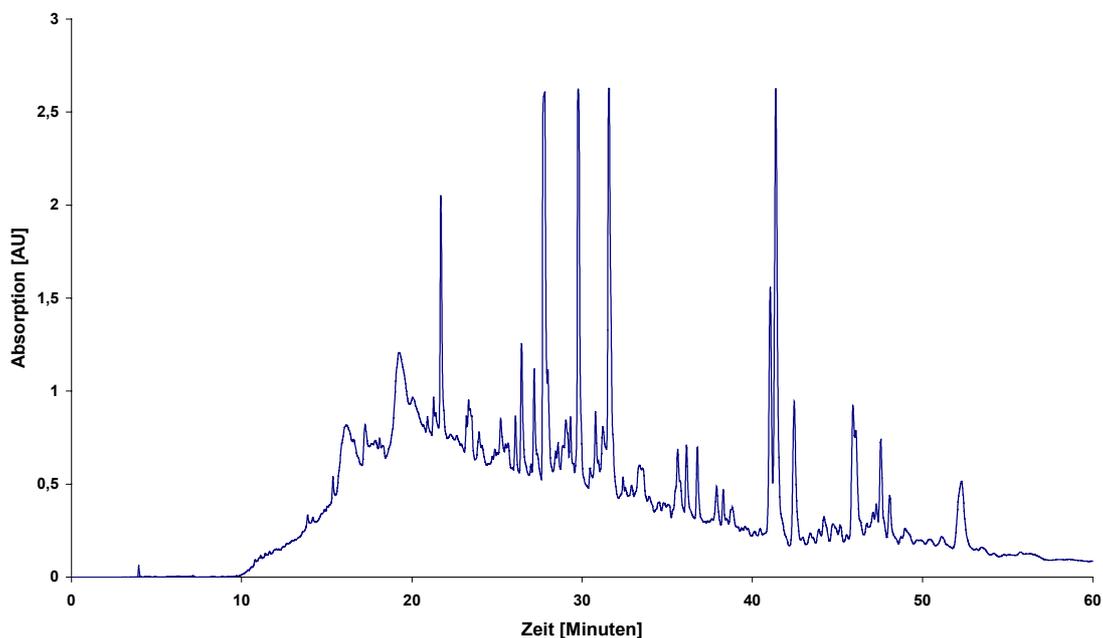


Abbildung 20: Reversed-phase HPLC-Chromatogramm eines SRM1649-Luftstaubextraktes mit einem Acetonitril/Wasser Gradienten

Wie in dem Chromatogramm ersichtlich, können durch die HPLC-Trennung einzelne Peaks herauspräpariert werden. Im mittleren Teil des Chromatogrammes liegt ein nicht getrenntes Vielstoffgemisch. Die Trennleistung dieser Methode war unbefriedigend und wurde durch den Austausch von Wasser gegen 5mmol KOH/KH₂PO₄ Puffer (pH 7,38) verbessert. Das

Eluat wurde mit einem automatischen Fraktionsprobensammler in einem Zeittakt von 1 bzw. 2 Minuten in einzelne Fraktionen separiert.

Die erhaltenen Fraktionen lassen sich auf Grund ihres Wassergehaltes nur mit hohem zeitlichen Aufwand schonend mittels Vakuumgefrierd Trocknung aufkonzentrieren. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde versucht das wässrige Eluat direkt in den Ames-Test zu überführen. Der Ames-Test wurde so modifiziert, daß ein Probevolumen von 2ml Eluat auf einer Ames-Test Platte möglich war. Dies wurde durch die Verwendung eines höher konzentrierten Softgars (2:1) erreicht. Als limitierender Faktor zeigte sich jedoch, daß das ebenfalls im Eluat enthaltene Acetonitril ab einer Konzentration von 60 Vol.-% bakterientoxisch wirkt.

Um diesen Nachteil zu umgehen, wurde das unpolare Elutionsmittel Acetonitril gegen Methanol ausgetauscht. Das Probematerial wurde ebenfalls in Methanol gelöst und über die Umkehrphasensäule präparativ fraktioniert. Das folgende Chromatogramm zeigt das Ergebnis der Trennung eines NIST SRM1649 Luftstaubextraktes mittels eines Wasser/Methanol-Gradienten über eine semi-präparative C₁₈-modifizierte Kieselgelsäule.

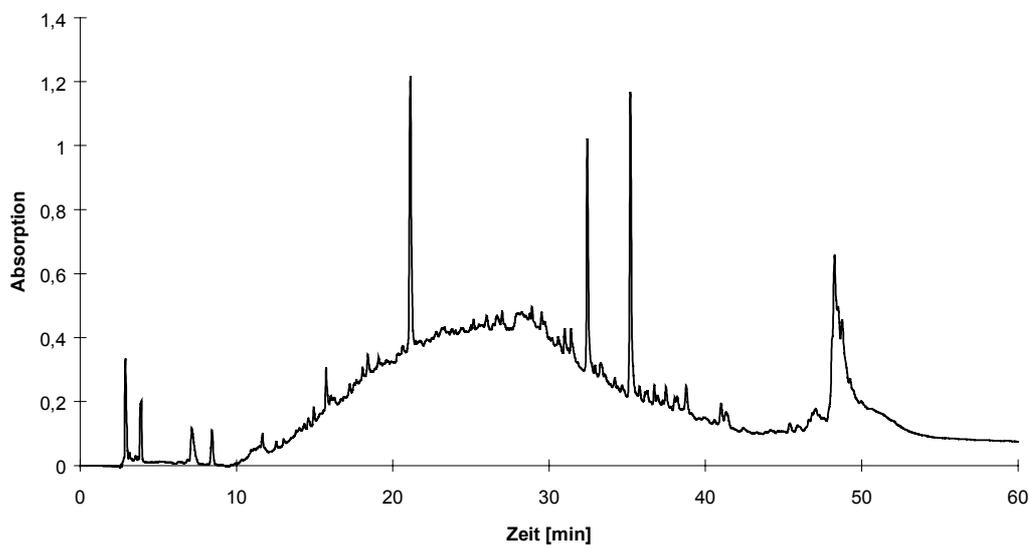


Abbildung 21: Reversed-phase HPLC-Chromatogramm eines SRM1649-Luftstaubextraktes mit einem Methanol/Wasser Gradienten

Die Trennung der Luftstaubextrakte mittels eines Wasser/Methanol-Gradienten führt zu einer besseren Auftrennung und zu einer einfacheren Aufkonzentrierung der Fraktionen. Der Nachteil dieses Gradientengemisches liegt jedoch in der starken Bakterientoxizität des Methanols, wodurch keine Mutagenitätsuntersuchung der Fraktionen im Ames-Test möglich

war. Durch den Wechsel von Methanol gegen Tetrahydrofuran als starkes Laufmittel konnte dieser bakterientoxische Effekt verringert, aber nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Der entscheidende Nachteil dieser Umkehrphasen HPLC-Trennmethode ist die zwangsläufige Verwendung eines wässrigen Eluenten. Die ausreichend mit Wasser mischbaren Lösungsmittel besitzen entweder eine zu schwache unpolare Elutionskraft oder eine hohe Bakterientoxizität, die einen direkten Einsatz der eluierten Fraktionen im Ames-Test unmöglich machen. Eine direkte Untersuchung der Fraktionen mit gaschromatographischen Gerätekopplungen zur weiteren Identifizierung der Inhaltsstoffe konnte mit diesen wässrigen Eluaten ebenfalls nicht erfolgen.

Als Resümee der HPLC-Trennungen von Luftstaubextrakten über Umkehrphasensäulenmaterial kann man folgende Ergebnisse festhalten.

- Unter Verwendung eines Tetrahydrofuran/Wasser Gradienten konnte die beste Auftrennung an einer C₁₈-modifizierten Kieselgelsäule der Luftstaubextrakte erhalten werden
- Eine direkte Verwendung der eluierten Fraktionen ist durch zu geringe Probemenge oder durch cytotoxische Effekt der Elutionsmittel ausgeschlossen.
- Die Untersuchung mit gaschromatographischen Gerätekopplungen zur weiteren Identifizierung der Inhaltsstoffe ist auf Grund der wässrigen Lösung ohne aufwendigen Lösungsmittelaustausch nicht praktikabel.

5.3.2 Nichtwässrige Größenausschlußchromatographie

Die „reversed phase“ Chromatographie an C₁₈ modifiziertem Kieselgel hat diverse Nachteile, die sich über nicht wässrige Trennsysteme umgehen lassen. Die nicht wässrige Größenausschlusschromatographie (SEC) mit Tetrahydrofuran als Elutionsmittel bietet im Vergleich einige Vorteile. Die Aufkonzentration bzw. der schonende Lösungsmittelaustausch zu dem zellmembrangängigen Lösungsmittel DMSO des Eluats bereiten keine Schwierigkeit. Das Probematerial „Luftstaubextrakt“ löst sich im Elutionsmittel vollständig, so daß keine Löslichkeitseffekte auf der Säule die Chromatographie stören. Die Trennung der Probe erfolgt über die Molekülgröße bzw. die Molekülmasse. Die kleine Verbindungen mit geringer Molmasse erfahren eine größere Retention als schwere Moleküle, so daß eine Separation über die Molekülgröße erreicht wird.

Die nachstehende Abbildung (Abbildung 22) zeigt das GPC-Chromatogramm eines NIST SRM 1649 Luftstaubextraktes (20mg Staubeinwaage). Als Elutionsmittel wurde Tetrahydrofuran mit einem konstanten Fluss von 0,8ml/min verwendet. Die Detektion erfolgte auf zwei verschiedenen Wellenlängen über zwei unabhängige Detektionskanäle – Kanal A mit 280nm und Kanal B mit 420nm.

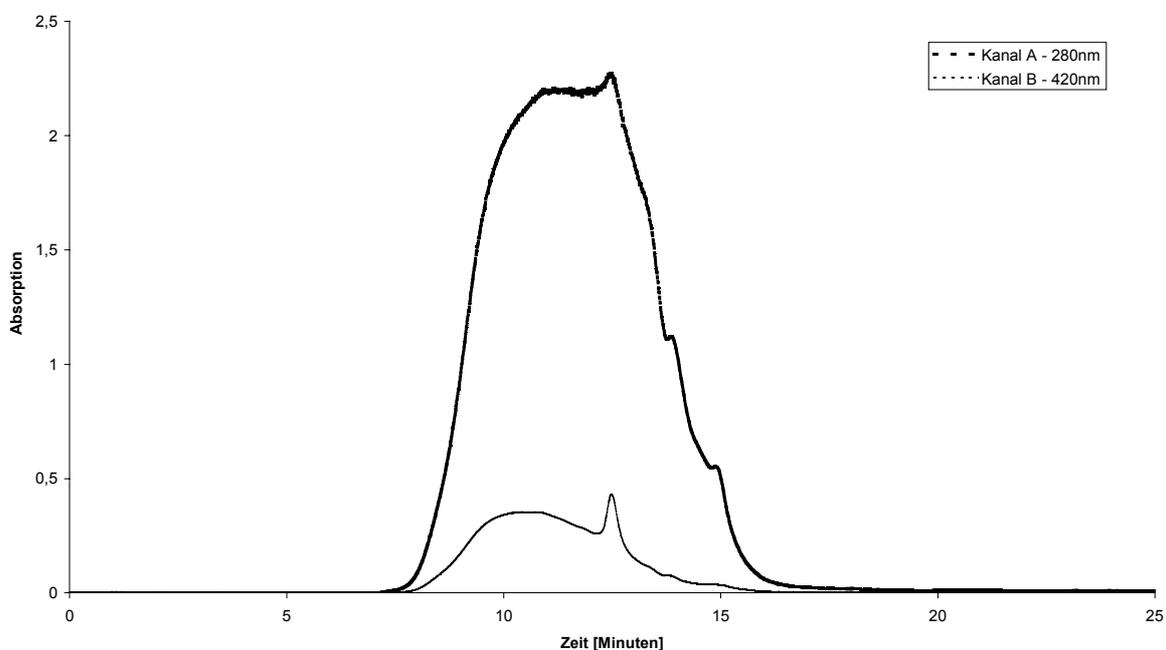


Abbildung 22: HPLC-Chromatogramm einer GPC-Trennung von NIST SRM1649 Extrakt

Das Eluat wurde mittels eines automatischen Probesammlers in 25 Fraktionen je einer Minute Dauer aufgefangen, in DMSO überführt und die Fraktionen auf ihr genotoxisches Potential im

Ames-Test untersucht. In mehreren Experimenten zeigten die Testplatten kein Bakterienwachstum. Dies ist vermutlich auf den cytotoxischen Effekt des Lösungsmittels Tetrahydrofuran bzw. des Säulenmaterials zurück zu führen. Die korrekte Durchführung der Ames-Testuntersuchung ist über ordnungsgemäße Positiv- und Negativkontrollen sichergestellt. Die cytotoxische Wirkung des Lösungsmittels wurde im Ames-Test am Stamm TA98 ohne S9-Mix Aktivierung überprüft. Ab einer Menge von ca. 80µl pro Platte Tetrahydrofuran zeigen sich erste cytotoxische Effekte; bei 100µl pro Platte ist kein Wachstum zu beobachten.

5.3.3 Normalphasenchromatographie

Die Erfahrungen aus den Trennexperimenten mit C₁₈ modifiziertem Kieselgel und der Gelpermeationschromatographie führten zu den entscheidenden Kriterien zur Entwicklung einer Ames-Test kompatiblen HPLC-Methode für Luftstaubextrakte. Die Anwendung der „bioassay directed fractionation“ Strategie für das Untersuchungsmaterial „Luftstaubextrakt“ erfordert ein nicht wässriges Lösungsmittel, welches leicht zu entfernen und gegen andere Lösungsmittel auszutauschen ist. Essentiell ist die Biokompatibilität der Elutionsmittel bzw. aller methodisch bedingten Lösungsmittel. Diese Grundbedingung wird durch den Einsatz der Normalphasenchromatographie, die mit rein organischen Elutionsmitteln arbeitet, prinzipiell erfüllt. Die Normalphasenchromatographie an unmodifiziertem Kieselgel hat jedoch entscheidende Nachteile. Der Wassergehalt der Lösungsmittel beeinflusst die Aktivität des Trennmaterials und erschwert die Reproduzierbarkeit der chromatographischen Trennung. Weiterhin zeigen die komplex zusammengesetzten Luftstaubextrakte irreversible Absorptionseffekte an dem Kieselgelmaterial. Um diese Nachteile zu minimieren wurden im Rahmen dieser Arbeit modifizierte Kieselgele zur Trennung der Luftstaubextrakte verwendet. Hierzu wurden drei unterschiedlich modifizierte Kieselgele (NO₂-, OH- sowie CN-modifiziertes Silicagel) mit einem n-Hexan/1,4-Dioxan Gradienten auf ihre Eignung zur Trennung von organischen Luftstaubextrakten bei einer UV/VIS-Detektionswellenlänge von 295 nm untersucht. Die Trennergebnisse dieser 3 unterschiedlichen Trennphasen wurden im Hinblick auf Trennleistung, Dauer der Trennung und Reproduzierbarkeit verglichen.

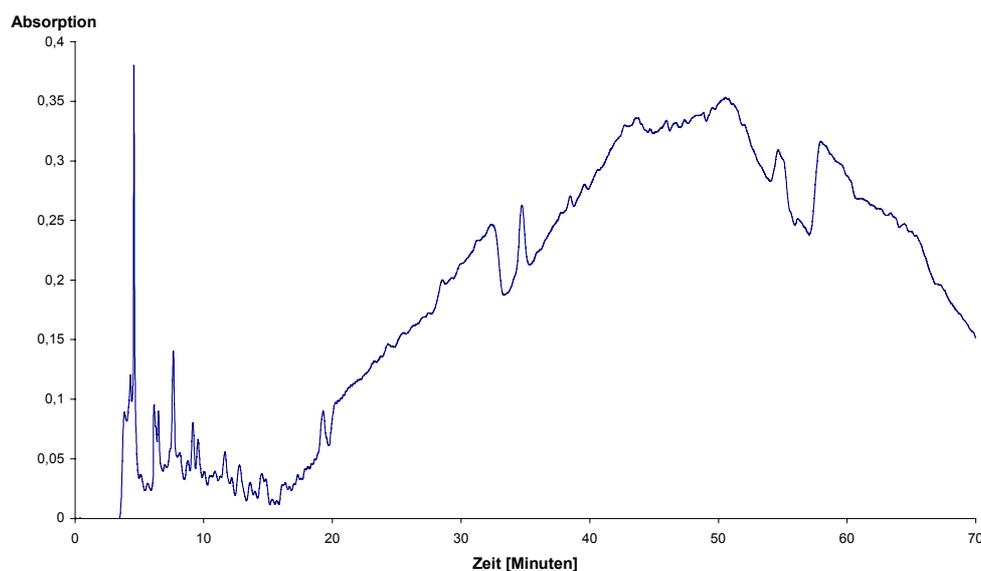


Abbildung 23: Chromatogramm eines NIST SRM1649 Extraktes über eine NO₂-modifizierte Kieselgelsäule (UV-Detektion bei 295nm)

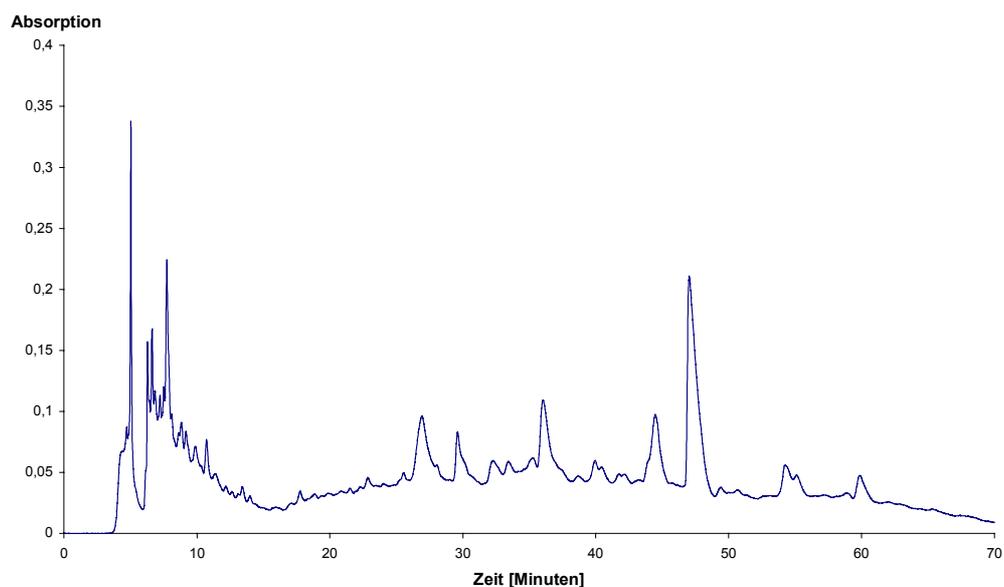


Abbildung 24: Chromatogramm eines NIST SRM1649 Extraktes über eine OH-modifizierte Kieselsäule (UV-Detektion bei 295nm)

Ein Vergleich der Chromatogramme (Abbildung 23 und Abbildung 24) ergibt zwei wesentliche Merkmale. Im Retentionszeitbereich von 5 bis 15 Minuten erscheint eine dichte, intensiv absorbierende Peakgruppe. Daran anschließend eluieren Verbindungen in einem unaufgelösten Bereich zwischen 20 bis 60 Minuten. Die Trennleistung der OH-modifizierten Phase ist höher als die des NO_2 -modifizierten Trennmaterials.

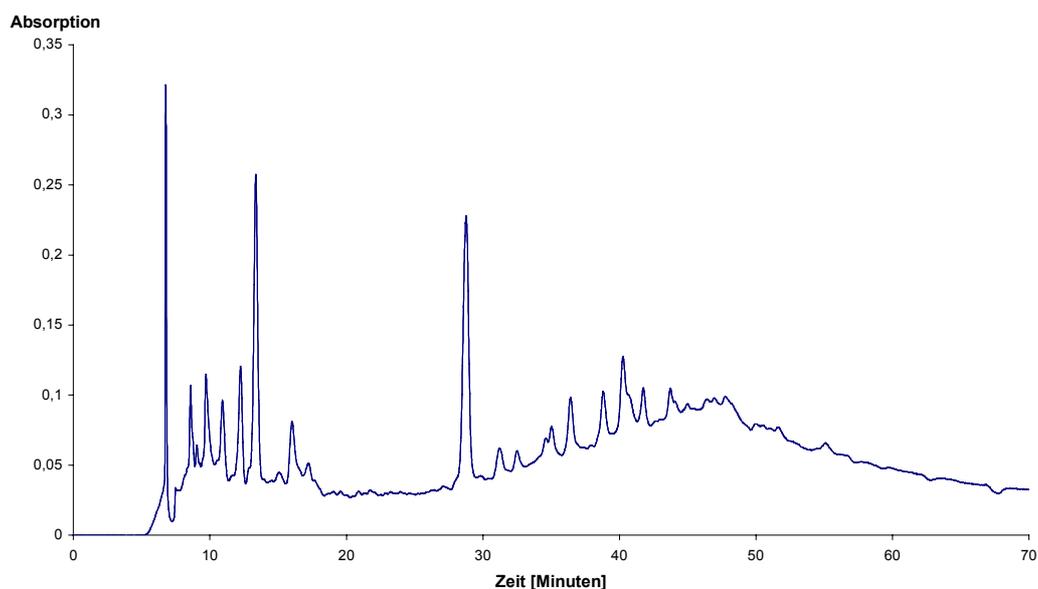


Abbildung 25: Chromatogramm eines NIST SRM1649 Extraktes über eine CN-modifizierte Kieselsäule

Die Abbildung 25 zeigt das Chromatogramm einer Trennung von NIST SRM1649 über eine CN-modifizierte Silicalgeltrennsäule. Im Retentionszeitbereich von 20 bis 60 Minuten weist

die CN-modifizierte Phase eine höhere Trennleistung als die beiden zuvor betrachteten NO₂- und OH-modifizierten Trennmaterien. Durch Variation der analytischen Parameter (Art der Eluenten und Gradient) konnte das Trennsystem mit der CN-modifizierten Kieselgelphase optimiert werden, um eine bestmögliche Auftrennung und eine direkte Verwendbarkeit der Fraktionen im Ames-Test zu erreichen.

In einem weiteren Schritt wurde die Eignung und die Stabilität der Trennmethode mit unterschiedlichen Luftstaubextrakten aus der Projektprobenahme überprüft. Die Luftstaubextrakte wurden über die CN-modifizierte Kieselgelphase mit einem n-Hexan/1,4-Dioxan Gradienten getrennt. Die Chromatogramme wurden über Fluoreszenzdetektion bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Detektionswellenlänge von 420 nm erhalten. Die Abbildungen (Abbildung 26-Abbildung 29) zeigen die Chromatogramme, welche aus den HPLC-Trennungen von Luftstaubextrakten zu unterschiedlichen Jahreszeiten aus Mannheim erhalten wurden.

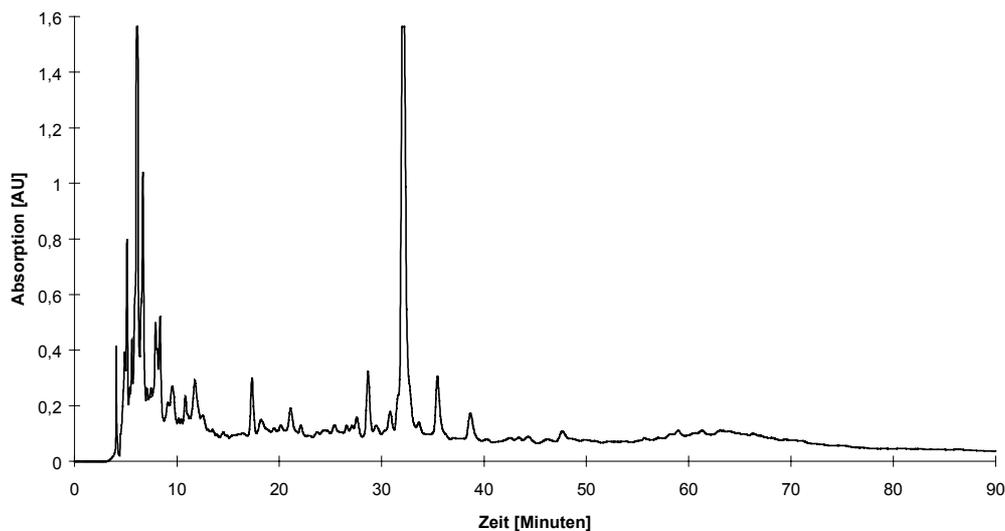


Abbildung 26: Luftstaubextrakt Mannheim Mitte Februar 1996

Aus dem Vergleich des Chromatogramms (Abbildung 25) des Standardmaterials (NIST SRM 1649) mit den vier Chromatogrammen (Abbildung 26-Abbildung 29) kann man erkennen, daß sich die Luftstaubextrakte aus der Projektprobenahme mit der angewandten Trennmethode trennen lassen. Die Trennmethode ist somit geeignet acetone Luftstaubextrakte unterschiedlicher Art zu separieren. Weiterhin sind für die Luftstaubextrakte der unterschiedlichen Jahreszeiten aus Mannheim sowie dem Extrakt des Standardmaterials gemeinsame Merkmale feststellbar.

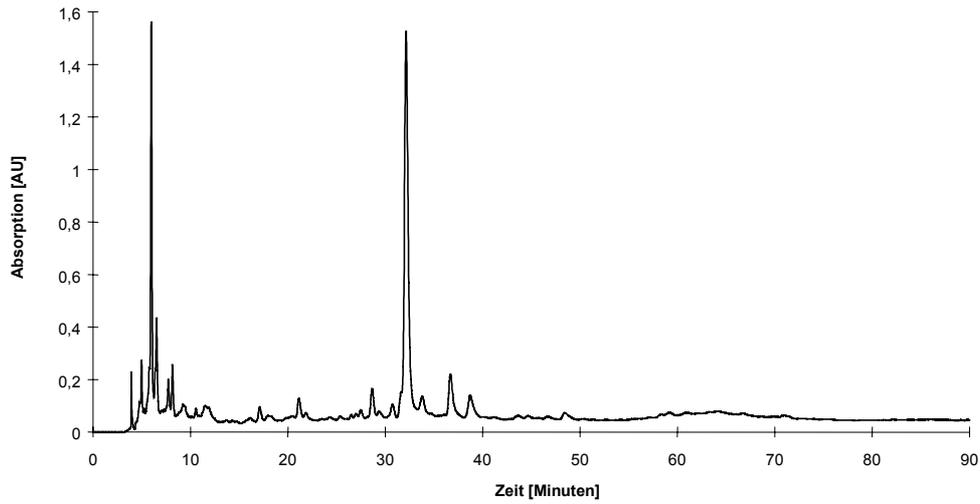


Abbildung 27: Luftstaubextrakt Mannheim Mitte April 1996

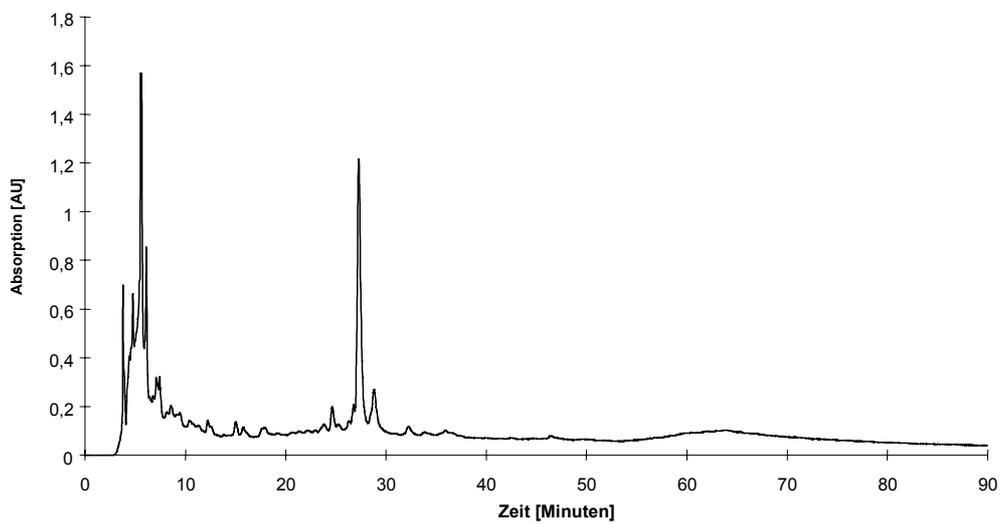


Abbildung 28: Luftstaubextrakt Mannheim Mitte Juli 1996

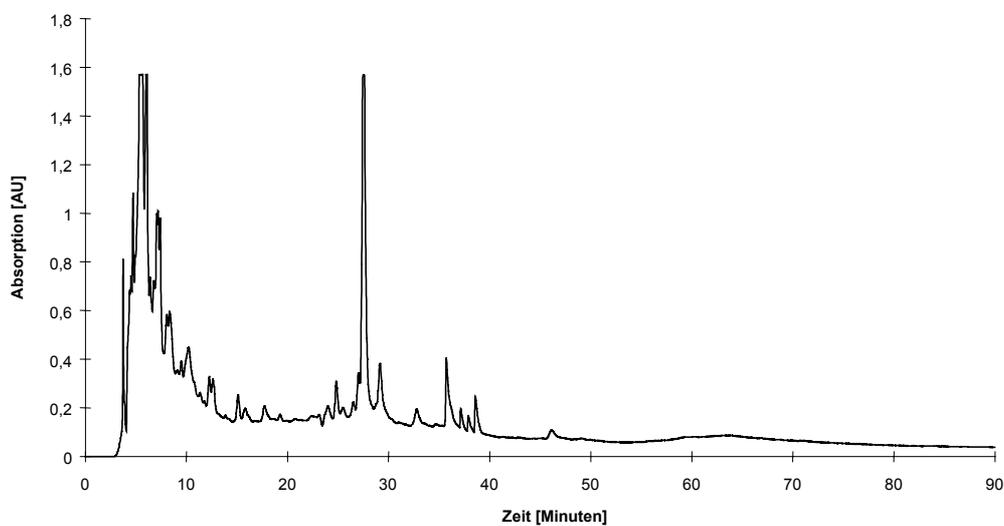


Abbildung 29: Luftstaubextrakt Mannheim Mitte November 1996

Ein Vergleich der Chromatogramme untereinander zeigt, daß das Peakmuster bei allen vier Luftstaubproben ähnlich ist. Im Fluoreszenzchromatogramm sind zu Beginn intensive Peaks darstellbar, die unpolare Verbindungen zugeordnet werden können, während gegen Ende des Chromatogrammes zunehmend polare Stoffe eluiert werden. Auch an dieser Stelle ist ein deutliches Fluoreszenzsignal vorhanden. Die Chromatogramme, die aus SRM1649 Extrakten erhalten wurden, zeigen grundsätzlich die gleichen Muster und sind reproduzierbar. Die Chromatogramme anderer Luftstaubextrakte wie z.B. Mannheim Mitte, Freiburg Mitte, SRM 1648 zeigen ebenfalls alle ähnliche Peakmuster.

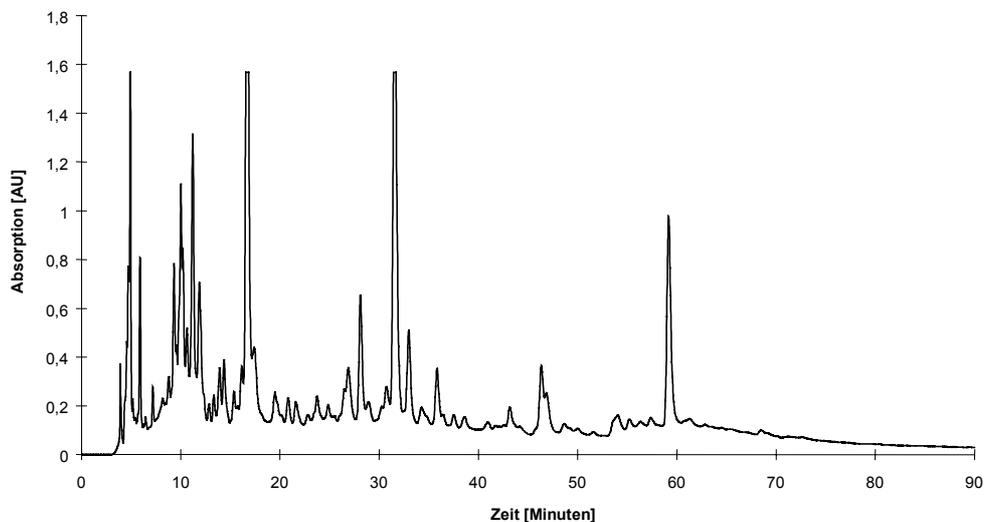


Abbildung 30: Staubextrakt SRM Vehicle Exhaust Particulate Matter

Das Chromatogramm des Extraktes der Dieselmotoremissionen unterscheidet sich deutlich von diesem Muster. Während bei den Proben aus den städtischen Aerosolextrakten zwei Häufungen von Peaks mit einem dominanten Peak vor, bzw. kurz nach 30 min, ist das Chromatogramm des „Vehicle Exhaust“ durch deutlich mehr Peaks geprägt. Es fällt aber auf, daß in diesem Chromatogramm bestimmte Elemente der in den Extrakten aus den baden-württembergischen Stäuben enthaltenen Strukturelemente wiederzufinden sind.

Allgemein kann festgehalten werden, daß die atmosphärischen Luftstaubextrakte aus Mannheim, Freiburg, Washington (NIST SRM1649) und St. Louis (NIST SRM1648) in weiten Teilen übereinstimmende Chromatogramme ergeben. Die untersuchten Luftstaubextrakte aus den verschiedenen Städten und den verschiedenen Jahreszeiten zeigen - vergleichbar mit der flüssig/flüssig-Trennung - ähnliche Peakmuster.

5.4 Mutagenitätsprofile der fraktionierten Luftstaubextrakte

5.4.1 Optimierung der HPLC-Mutagramme

Auf der Basis der zuvor beschriebenen Ergebnisse der HPLC-Trennungen über Normalphasenchromatographie konnten die verschiedenen Luftstaubextrakte fraktioniert und die Fraktionen im Ames-Test auf ihr genotoxisches Potential untersucht werden.

Die folgende Abbildung (Abbildung 31) zeigt das Chromatogramm einer Trennung von 300mg NIST SRM1649 Standardmaterial über CN-modifiziertem Kieselgel mit einem n-Hexan/Ethanol-Gradienten bei UV-Detektion. Das Eluat wurde in Fraktionen mit je 2 Minuten Dauer gesammelt und die einzelnen Fraktionen im Ames-Test in einem Dreifachansatz auf ihr genotoxisches Potential im Stamm TA98 mit und ohne metabolische Aktivierung untersucht.

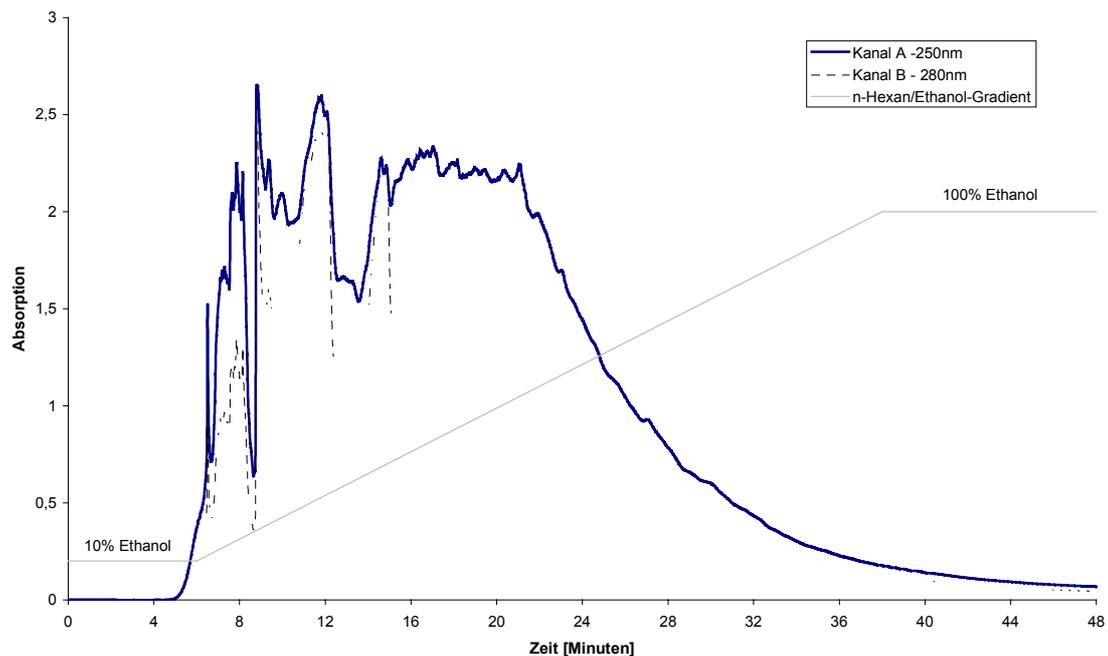


Abbildung 31: Chromatogramm einer Trennung von NIST SRM1649 mit einem n-Hexan/Ethanol-Gradienten bei 250 nm und 280 nm Detektionswellenlänge

Das Chromatogramm zeigt keine hohe Auflösung der Inhaltsstoffe, jedoch ist auch hier ein Einschnitt bei 9 Minuten zu beobachten. Das Chromatogramm zeigt ebenfalls, daß die Trennsäule mit Probematerial überladen wurde und der Detektor bei 2,5 Absorptionseinheiten an seine obere Detektionsgrenze stößt. Im Gegensatz zu dem unspektakulären Chromatogramm zeigt das Mutagramm der Fraktionierung ein vollständiges zeitliches

Mutagenitätsprofil über die Elutionszeit. Die folgenden beiden Abbildungen zeigen die Mutagramme von NIST SRM1649 und einer Blindtrennung mit Lösemittel im Stamm TA98 ohne (Abbildung 32) und mit (Abbildung 33) metabolischer Aktivierung.

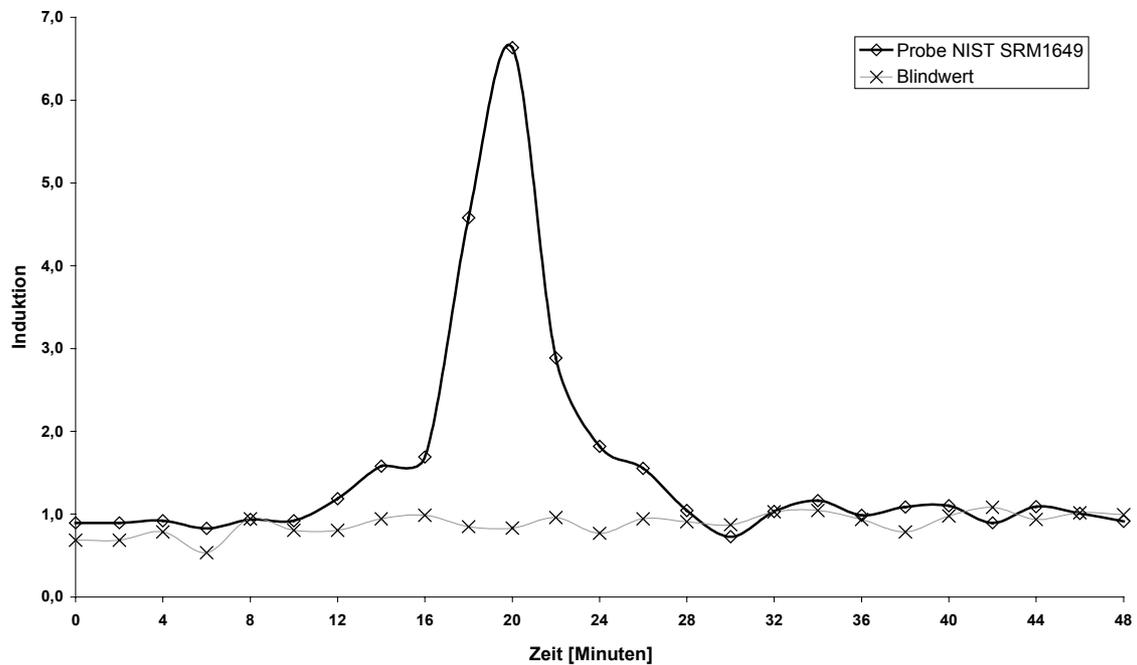


Abbildung 32: Mutagramm von NIST SRM1649 (schwarz) und Blindtrennung (grau) im Stamm TA98 *ohne* S9-Mix

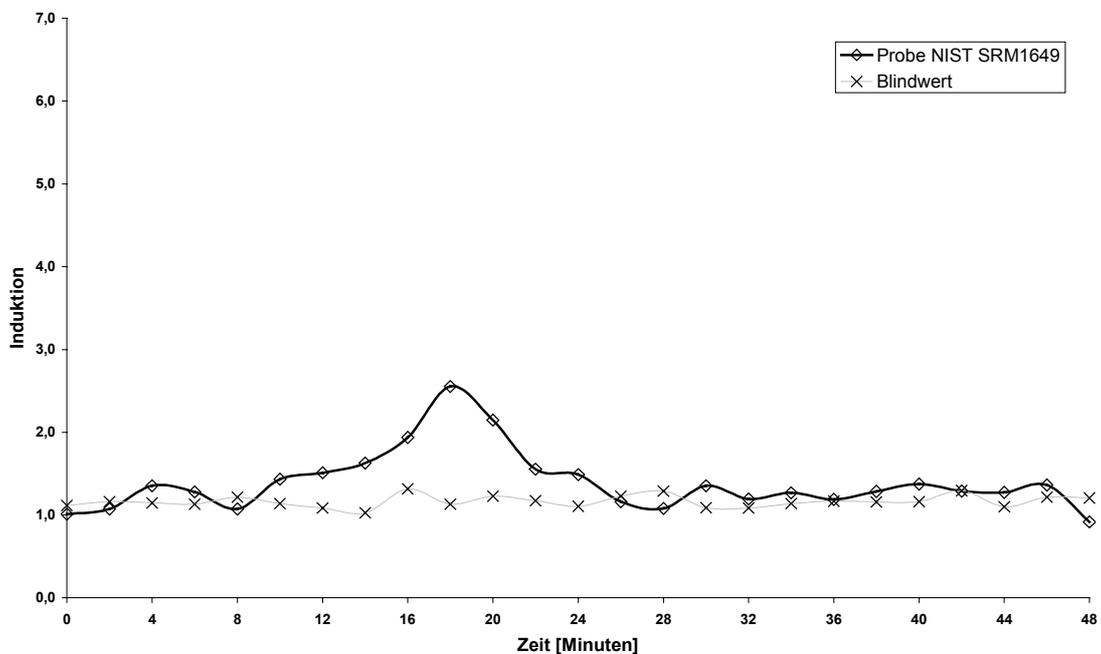


Abbildung 33: Mutagramm von NIST SRM1649 (schwarz) und Blindtrennung (grau) im Stamm TA98 *mit* S9-Mix

Die Mutagramme zeigen ein deutliches Maximum bei 20 Minuten im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung und ein schwach ausgeprägtes Maximum bei Zugabe der metabolischen Aktivierung. Vergleichsweise zeigt das Chromatogramm bei 20 Minuten keine charakteristischen Peaks für beide Detektionswellenlängen. Der Unterschied zwischen den verschiedenen Ames-Testvarianten deutet auf direkt wirksame Mutagene hin, deren genotoxisches Potential durch ein metabolisch wirksames Enzymsystem im Ames-Test weitgehend deaktiviert wird. Bei einer Elutionszeit von etwa 4 Minuten ist ein schwaches Maximum im Mutagramm für die Durchführung mit metabolischer Aktivierung erkennbar. Dieser Peak taucht im Mutagramm bei der Variante ohne S9-Mix nicht auf. Die in diesem Bereich eluierenden PAK sind für diese Beobachtung als Ursache zu betrachten.

Eine weit bessere chromatographische Auftrennung sowie ein differenzierteres Mutagramm erhält man durch den Einsatz eines unpolarenen Lösemittels als starkes Elutionsmittel sowie durch die Verringerung der Probemenge bei der Trennung. Über den Austausch von Ethanol gegen 1,4-Dioxan und eine Gradientenoptimierung konnte das folgende Chromatogramm und das resultierende Mutagramm erhalten werden (Abbildung 34).

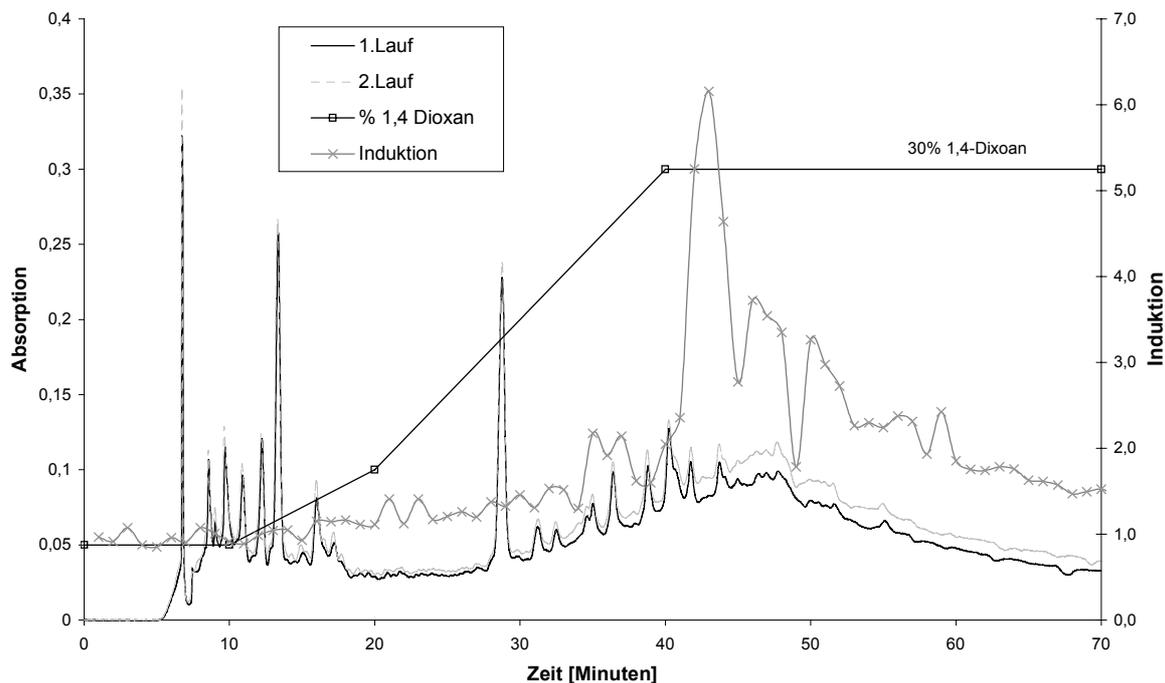


Abbildung 34: Chromatogramm und Mutagramm von NIST SRM1649 aus einer Trennung mit einem *n*-Hexan/Dioxan-Gradienten

Die Abbildung (Abbildung 34) zeigt das Chromatogramm einer Trennung von NIST SRM1649 (2*40 mg Staubeinwaage) Standardstaubextrakt mit einem *n*-Hexan/1,4-Dioxan-Gradienten bei UV-detektion. Das Eluat wurde in Fraktionen mit je 1 Minute Dauer

gesammelt und die einzelnen Fraktionen im Ames-Test in einem Doppelansatz auf ihre Mutagenität im Stamm ohne metabolische Aktivierung getestet.

Es zeigt sich, daß der Großteil der Aktivität in der zweiten Hälfte des Chromatogramms vorhanden ist, wobei zwei deutlich ausgeprägte Peaks im Mutagramm bei 35 Minuten mit entsprechenden Peaks im Chromatogramm korreliert werden können. Das Maximum im Mutagramm liegt nun durch den optimierten Gradienten bei 44 Minuten. Die Elutionszeit für das Maximum im Mutagramm gibt erste Rückschlüsse auf die Polarität der mutagenen Verbindungen.

Der Luftstaubextrakt aus Mannheim Mitte (Oktober 1995) zeigt ein wesentlich stärker strukturiertes Mutagramm, wobei das Maximum der Mutagenität ebenfalls bei etwa 44 Minuten liegt. Zur Trennung wurden 3*40 mg (Staubeinwaage) Probematerial auf der CN-modifizierten Kieselgelsäule mit dem verbesserten n-Hexan/1,4-Dioxan Gradienten verwendet. Durch die Überlagerung des Chromatogramms und des Mutagramms können einige HPLC-Peaks direkt korrespondierenden Mutagenitätspeaks zugeordnet werden.

Die nachstehende Abbildung (Abbildung 35) zeigt das Chromatogramm des 1. Trennlaufes bei UV-Detektion (275 nm) und das Mutagramm mit einer Auflösung von 1 Minute.

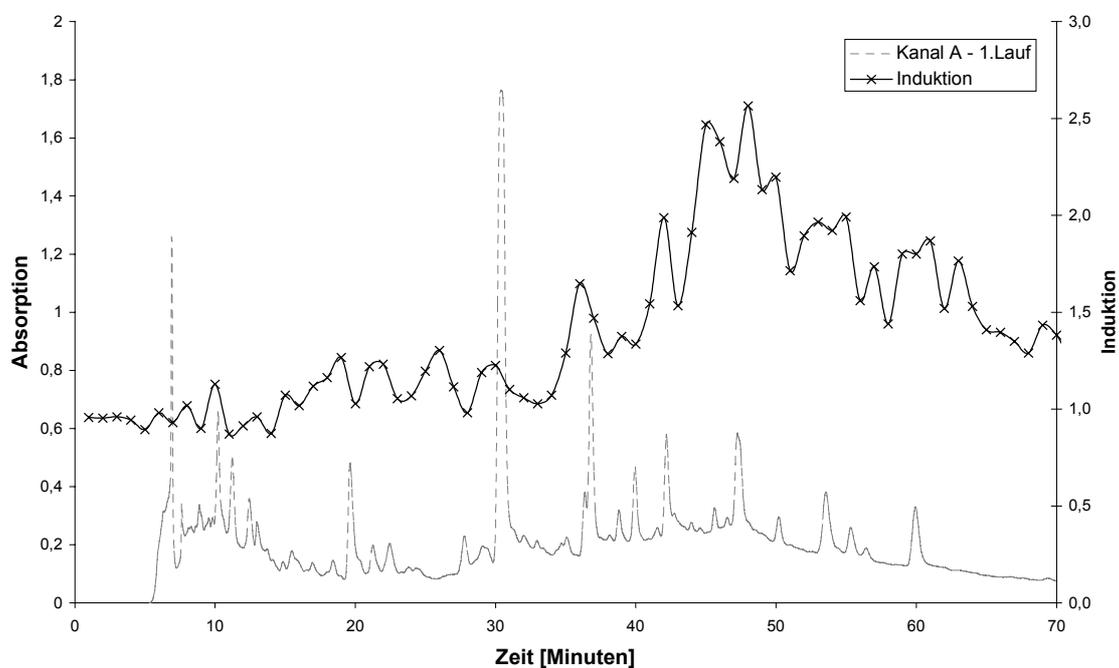


Abbildung 35: Chromatogramm und Mutagramm einer Fraktionierung eines Staubeextraktes aus Mannheim Mitte Oktober 1995 mit 120mg Staubeinwaage

Ein wichtiger Faktor für die Bewertung der Fraktionierungsergebnisse ist inwieweit die Trennmethode, die Probearbeitung und der biologische Testablauf reproduzierbar sind. Eine weitere Einflussgrösse ist die Menge des fraktionierten Probematerials und der resultierenden Mutagenität im biologischen Testsystem, d.h. der Zusammenhang zwischen aufgegebener Probemenge und detektierbarem genotoxischen Potential im Ames-Test.

Die folgende Abbildung (Abbildung 36) zeigt die überlagerten Mutagramme von zwei unabhängigen Trennungen von 2*40 mg und 2*80 mg (Staubeinwaage) NIST SRM1649 Standardstaubextrakt mit einem n-Hexan/1,4-Dioxan-Gradienten. Das Eluat wurde in Fraktionen mit je 1 Minute Dauer gesammelt und die einzelnen Fraktionen im Ames-Test in einem Doppelansatz auf ihre Mutagenität im Stamm ohne metabolische Aktivierung getestet.

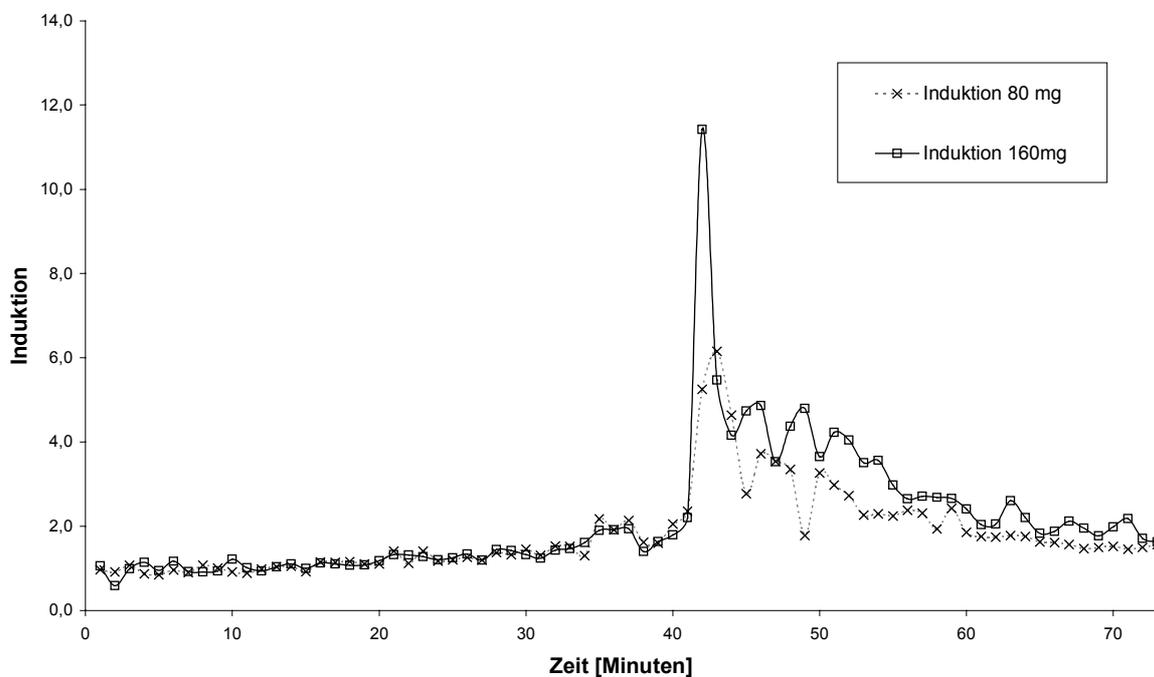


Abbildung 36: Mutagramm zweier unabhängiger Fraktionierungen von NIST SRM1649 mit 80mg und 160mg Staubeinwaage

Das Hauptmaximum sowie die Nebenmaxima eluieren zu gleichen Zeitpunkten für die beiden Probemengen. Die Maxima sind somit zeitlich reproduzierbar. Das Verhältnis der Maxima beträgt 1,85 für die Induktionsraten und für die Gesamtmutagenität 1,58. Unter Berücksichtigung der Schwankungen innerhalb des biologischen Testsystems sind beide Verhältnisse zufriedenstellend. Der Unterschied zwischen den beiden Verhältnissen sowie das bessere Verhältnis am Maximum ergibt sich durch die Fehlerfortpflanzung über alle Werte des biologische Tests.

Die Möglichkeit, daß das Laufmittel nicht genügend Elutionskraft besitzt, um die aufgebene Probe vollständig von der Trennsäule zu eluieren, wurde mit einem Methanol Gradienten überprüft. Das Laufmittelgemisch bestand für diese Trennung aus n-Hexan mit 20% 1,4-Dioxan und Methanol. Die folgende Abbildung (Abbildung 37) zeigt das erhaltene Mutagramm für die Trennung eines Extraktes aus Freiburg Februar 1996 unter Verwendung der Fluoreszenzdetektion bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Detektionswellenlänge von 420 nm. Auf einem zweiten Detektionskanal wurde die Absorption im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 275 nm aufgezeichnet. Die Fließgeschwindigkeit des Eluenten betrug 4 ml/min.

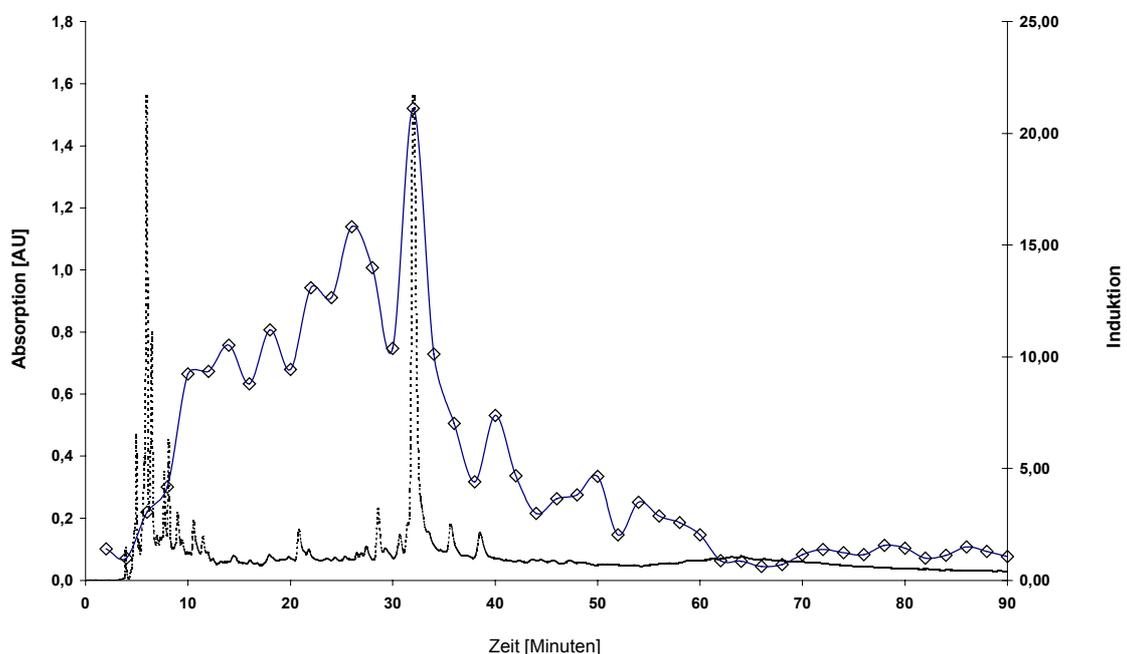


Abbildung 37: Mutagramm eines Luftstaubextraktes aus Freiburg Februar 1996 unter Verwendung eines Methanolgradienten

Die Verwendung des aus n-Hexan mit 20% 1,4-Dioxan und aus Methanol zusammengesetzten Gradienten brachte keine Veränderung in der Höhe oder dem Muster der Peaks im Chromatogramm.

Die Wiederfindung der Mutagenität wurde über das Standardmaterial NIST SRM1648 bestimmt. Die Anzahl der Revertanten pro μg EOM des Extraktes wurde über die Dosis-Wirkungsbeziehung von 6,75 mg des Vollextraktes im Ames-Test für den Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung ermittelt. Über die Summe der Revertanten aus den HPLC-Fractionen und die getrennte EOM Menge von 13 mg wurde die Anzahl der Revertanten pro μg EOM innerhalb der HPLC-Methode berechnet.

Die folgende Tabelle 22 zeigt Ergebnisse und die Wiederfindungsraten.

EXPERIMENT	MUTAGENITÄT [REVERTANTEN/μG EOM] VOLLEXTRAKT	MUTAGENITÄT [REVERTANTEN/μG EOM] HPLC-TRENNUNG	WIEDERFINDUNG [%]
1	0,92	0,71	77
2	0,91	0,80	87
3	0,92	0,76	82

Tabelle 22: Wiederfindung der Mutagenität für das Standardmaterial NIST SRM1648

In einem weiteren Optimierungsschritt wurde der n-Hexan/1,4-Dioxan Gradient modifiziert um eine frühere Elution des mutagenen Hauptpeaks und eine höhere Auflösung zu erreichen. Hierzu wurde der Gradient in 2 Stufen mit unterschiedlichen Änderungsraten für das Elutionsmittel 1,4-Dioxan programmiert.

Die folgende Abbildung (Abbildung 38) zeigt das Chromatogramm, den optimierten Gradienten und das resultierende Mutagramm eines NIST SRM1649 Luftstaubextraktes unter Verwendung der Fluoreszenzdetektion bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Detektionswellenlänge von 420nm. Auf einem zweiten Detektionskanal wurde die Absorption im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 275 nm aufgezeichnet. Die Fließgeschwindigkeit des Eluenten betrug 4 ml/min.

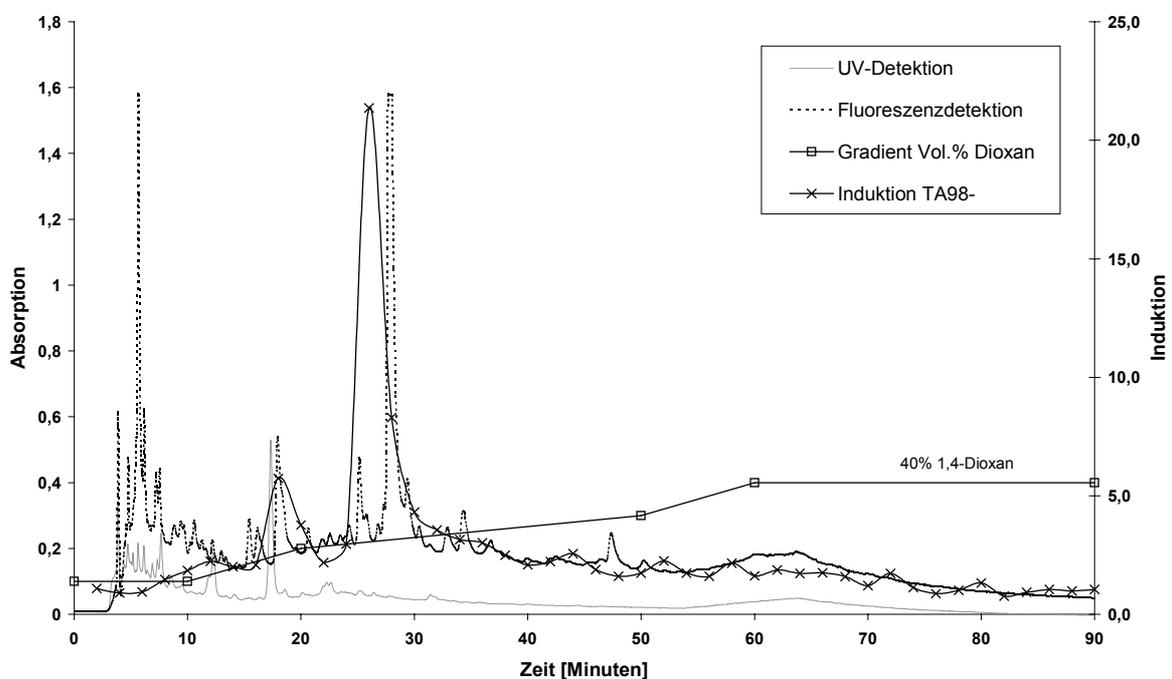


Abbildung 38: Chromatogramm und Mutagramm von NIST SRM1649 aus einer Trennung mit einem optimierten n-Hexan/1,4-Dioxan-Gradienten

Man erkennt ein kleines Maximum bei 19 Minuten und den Hauptpeak bei 27 Minuten. Zu beiden Mutagenitätspeaks können HPLC-Peaks der Fluoreszenzdetektion zu geordnet werden. Für das UV-Chromatogramm korreliert ein Peak mit dem Nebenmaximum bei 19 Minuten. Die Peakgruppe innerhalb der ersten 10 Minuten kann den Substanzklassen der PAK und der nitro-PAK zu gewiesen werden. Alle weiteren Mutagramme wurden auf der CN-modifizierten Kieselgelsäule mit diesem n-Hexan/1,4-Dioxan Gradienten generiert.

5.4.2 Mutagramme von unterschiedlichen Luftstaubextrakten

Die Referenzmaterialien NIST SRM1649 (urban dust organics) und NIST SRM1648 (urban industrial dust) dienten als Probematerial zur Erarbeitung der Arbeitstechniken und Methodik im Rahmen dieser Arbeit. Die beiden Luftstäube stammen aus zwei verschiedenen amerikanischen Großstädten. Das Referenzmaterial NIST SRM1648 stammt aus St. Louis mit eher industrieller Belastung, NIST SRM1649 aus Washington D.C und spiegelt die Belastung eines urbanen Ballungsgebietes mit Verkehrsemissionen wider.

Die folgende Abbildung (Abbildung 40) zeigt eine Gegenüberstellung der Mutagramme der beiden im Ames-Test (Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung) untersuchten fraktionierten Standardreferenzmaterialien mit einer Auflösung von 2 Minuten.

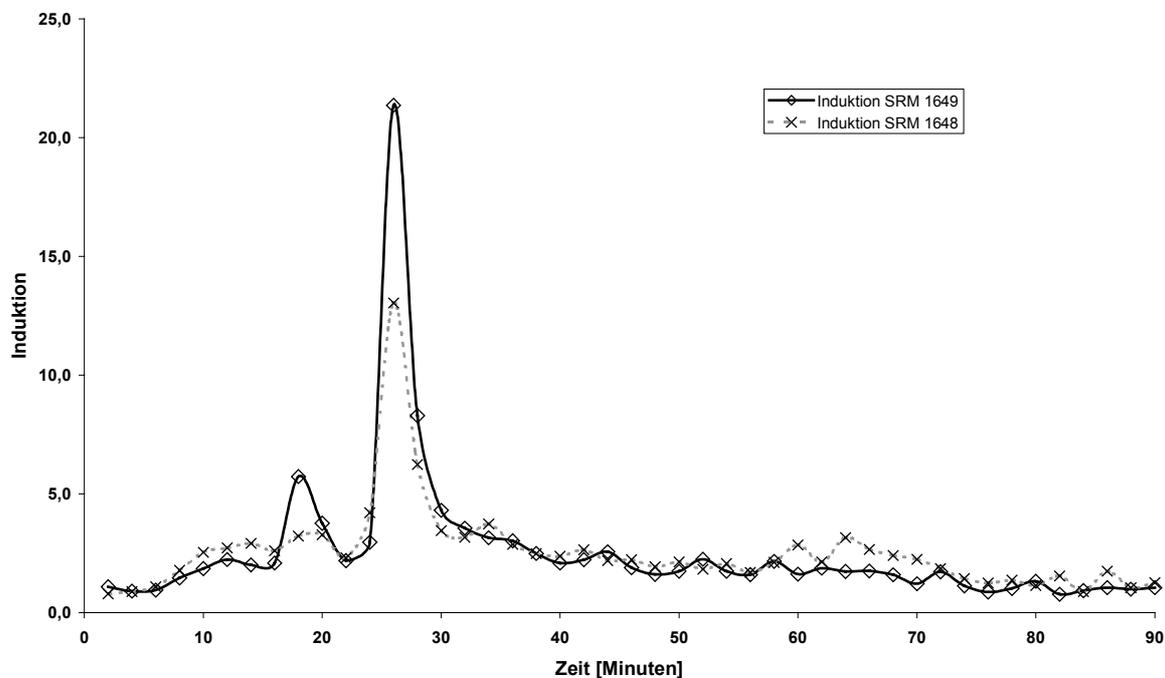


Abbildung 39: Vergleich der Mutagramme von Standardstaubextrakten im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung (NIST SRM 1648, NIST SRM 1649)

Der Vergleich der beiden Mutagramme zeigt, daß das Maximum der mutagenen Aktivität zum gleichen Elutionszeitpunkt erreicht wird. Die Intensität dieses Peaks ist für die gleiche Menge an fraktioniertem Probematerial in den beiden Mutagrammen deutlich unterschiedlich. Das mutagene Potential für NIST SRM1648 ist am Maximum um 40% geringer als die des Standardstaubes NIST SRM1649. Dies könnte auf die unterschiedliche Herkunft der Probematerialien zurückzuführen sein. Dennoch weisen beide Luftstäube das gleiche Maximum der Mutagenität in unterschiedlicher Intensität auf. Diese Beobachtung kann als Hinweis auf Transformationsprozesse der primär emittierten Substanzen gewertet werden, die

unabhängig von der geographischen Lage des Probenahmeortes zu sein scheint. Die stoffliche Zusammensetzung der Primäremissionen scheint die Höhe der Mutagenität, jedoch nicht die durch Transformationsprozesse entstehenden mutagenen Stoffklassen zu beeinflussen.

Die Mutagramme der Langzeitproben aus Mannheim (Abbildung 40) zeigen ein komplizierteres Peakmuster als die NIST Standardmaterialien, wobei die Hauptpeaks der Referenzstäube auch in den Mutagrammen der Proben aus Mannheim wiederzufinden sind.

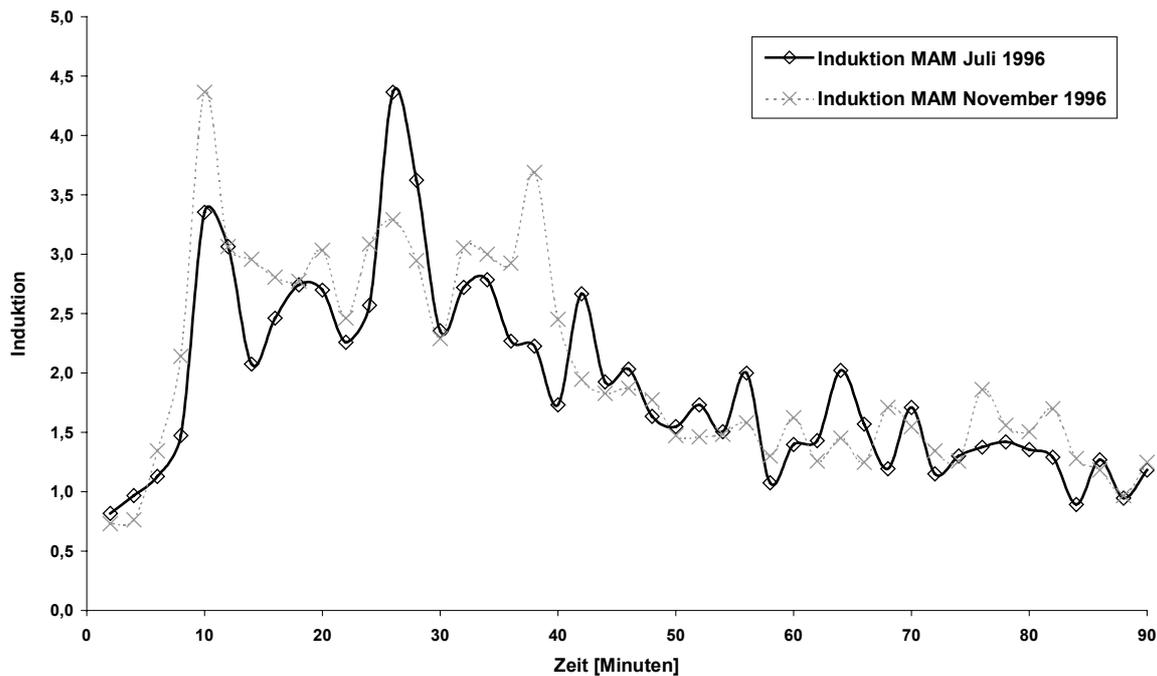


Abbildung 40: Vergleich der Mutagramme von Luftstaubextrakten im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung

Insgesamt ist die Mutagenität bei den „Mannheimer“ Proben über einen größeren Retentionszeitbereich verteilt als dies bei den NIST Standardproben der Fall ist. Das Mutagramm der „November“ Probe zeigt einen Peak bei 10 Minuten sowie einen weiteren Peak bei 38 Minuten. Im Mutagramm der „Juli“ Probe liegt der Hauptpeak bei 26 Minuten sowie ein weiterer Peak bei 10 Minuten. Der Peak im Mutagramm bei 26 Minuten entspricht dem Maximum in den Mutagrammen der NIST Luftstaubextrakte.

Die unterschiedliche Mutagenitätsverteilung der beiden Proben Mannheim Juli und November kann über die durchschnittliche Belastungssituation der beprobten Monate erklärt werden. Bedeutsam sind hierbei die Konzentrationen der Gase Ozon, Kohlenmonoxid und der Stickoxide. Diese Gase sind die wichtigsten Reaktionspartner bei Transformationsprozessen in der Atmosphäre. Die Globalstrahlung, die Temperatur sowie die Niederschlagsmenge beeinflussen als Rahmenparameter ebenfalls die Transformationsreaktionen.

Die Tabelle 23 stellt die Durchschnittswerte der UMEG-Meßdaten für die Monate Juli und November 1996 am Standort Mannheim Mitte dar.

PARAMETER	JULI 1996	NOVEMBER 1996
SO ₂ [μgm^{-3}]	9,8	10,1
NO ₂ [μgm^{-3}]	38,3	43,7
NO [μgm^{-3}]	12,9	26,4
CO [mgm^{-3}]	0,2	0,5
Staub [μgm^{-3}]	21,1	15,5
Ozon [μgm^{-3}]	52,7	18,4
Windrichtung [°]	213,1	195,9
Windgeschwindigkeit [ms^{-1}]	1,8	2,3
Globalstrahlung [Wm^{-2}]	190,0	28,1
Temperatur [°C]	19,4	6,9
Taupunkt [°C]	10,1	1,9
Niederschlag [mm]	0,07	0,04

Tabelle 23: Vergleich der Monatsdurchschnittswerte der UMEG-Daten für Juli und November 1996

Ein Vergleich für einzelne Parameter ergibt eine dreifach höhere Ozonkonzentration für den Monat Juli als im Monat November. Die Globalstrahlung ist vergleichsweise um einen Faktor 6,7 höher. Die Konzentrationen der Gase CO und NO sind im Monat November um einen Faktor 2 höher. Aus den Daten in Tabelle 23 lässt sich ableiten, daß die Atmosphäre im Juli eine höhere Reaktivität und eine größere Oxidationskraft als die Atmosphäre im November aufweist. Unter Voraussetzung dieser Bedingungen lassen sich unterschiedlichen Mutagenitätsprofile für die Juli und November Probe erklären. Die unpolaren Verbindungen im Retentionszeitbereich bis 12 Minuten werden unter sommerlichen Bedingungen zu polaren Verbindungen oxidiert. Der Peak bei 26 Minuten repräsentiert polare Verbindungen, die relativ langsam weiterreagieren und ein hohes mutagenes Potential aufweisen. Substanzen, welche nach einer Retentionszeit von ca. 30 Minuten eluieren werden unter Juli Bedingungen schneller abgebaut als unter Novemberbedingungen. Die polaren bzw. hochoxidierten Verbindungen werden über nasse Deposition (Niederschlag) aus der Atmosphäre entfernt. Dieser Reinigungseffekt ist im Juli über die Niederschlagsmenge abschätzbar und liegt um einen Faktor 2 höher als im November.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Betrachtung der Gesamtmutagenität der beiden Luftstaubextrakte für Juli und November 1996. Hierfür können die Mutagenitätswerte der unbehandelten, respektive ungetrennten Luftextrakte sowie die Gesamtrevertantensumme, der mittels HPLC-Trennung erhaltenen Fraktionen, verglichen werden.

Die nachfolgende Abbildung (Abbildung 41) zeigt eine Gegenüberstellung der Gesamtmutagenität der untersuchten Luftstaubextrakte.

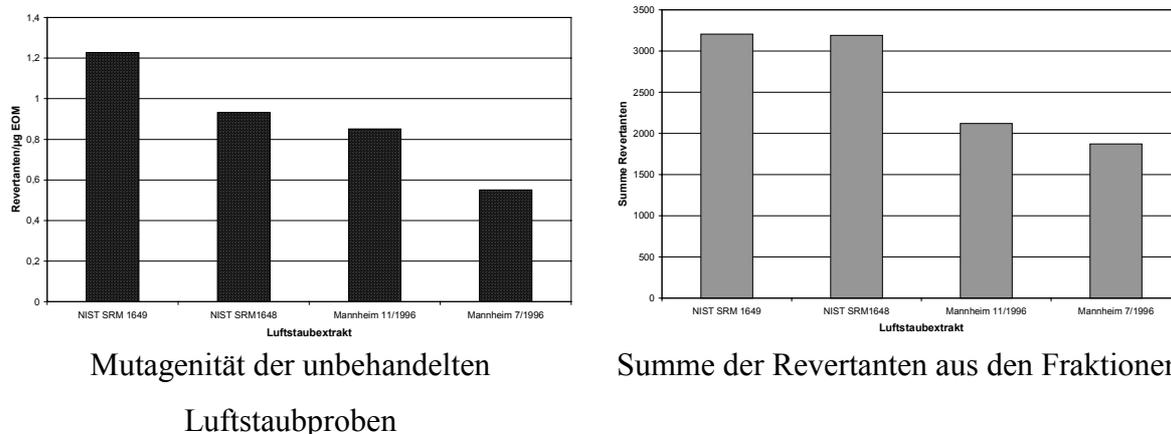


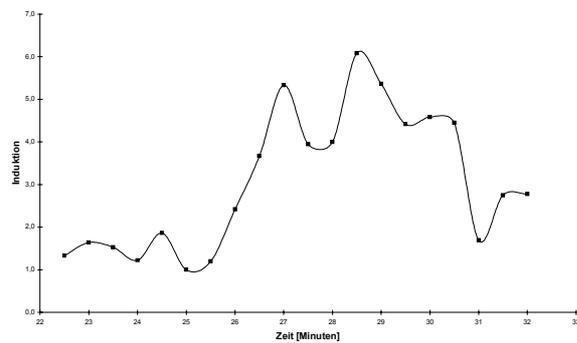
Abbildung 41: Vergleich der Gesamtmutagenität als Einzeltestung und Revertantensumme der Fraktionen

Die Mutagenität der unbehandelten Luftstaubproben (links) wie auch die Gesamtsumme der Revertanten aus den Fraktionen (rechts) zeigen die gleiche Abstufung zwischen den verschiedenen Extrakten. Beide Balkendiagramme zeigen für die „Mannheimer November 1996“ Probe eine höhere Gesamtmutagenität als für den Luftstaubextrakt „Juli 1996“. Die Unterschiede treten bei der Untersuchung der ungetrennten Extrakte, bezogen auf Revertanten/μg EOM, stärker hervor als bei der Betrachtung der Gesamtrevertantenzahl der Fraktionen.

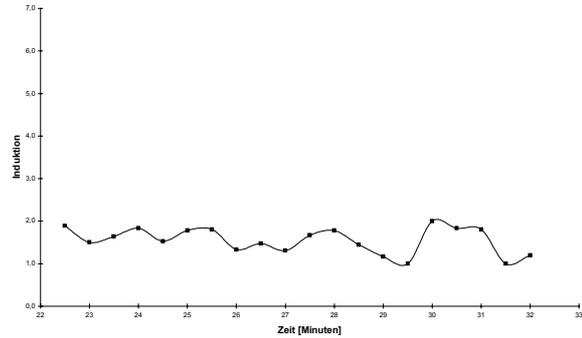
Der zeitliche Abstand der Sammlung der Fraktionen kann, innerhalb bestimmter Grenzen, frei gewählt werden. Die höchstmögliche zeitliche Auflösung der Mutagramme ist durch die kleinste, für den Nachweis im Ames-Test benötigte Probemenge gegeben. Der zunächst gewählte Probenahmetakt von 2 Minuten ist für die praktische Durchführung gut geeignet. Die zeitliche Auflösung kann auf 30 Sekunden gesteigert werden, wenn die Trennung dreimal wiederholt und der Ames-Test im Doppelansatz durchgeführt wird. Man erhält ein zeitlich feiner aufgelöstes Mutagramm.

Die folgende Abbildung (Abbildung 42) zeigt die Mutagramme von 4 verschiedenen Luftstaubextrakten aus der Routinebeprobung. Für die Trennung wurde je Probe eine Menge von 10mg EOM aus dem Extrakt verwendet. Die verwendete Probemenge wurde bei allen getrennten Proben auf die Menge des EOM bezogen, so daß nur die Art der organischen Inhaltsstoffe eine Rolle spielen und nicht deren absolute Menge. Die Mutagramme zeigen alle

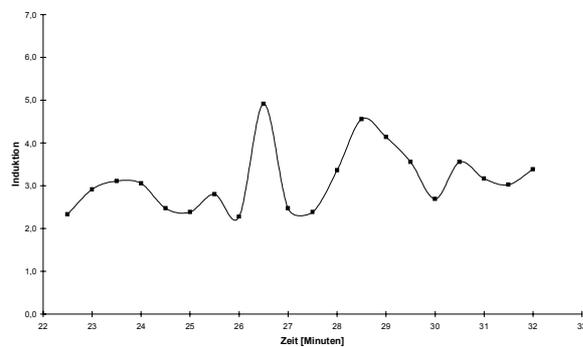
einen Ausschnitt zwischen 22 und 33 Minuten bei gleicher Skalierung der y-Achse und sind somit direkt vergleichbar.



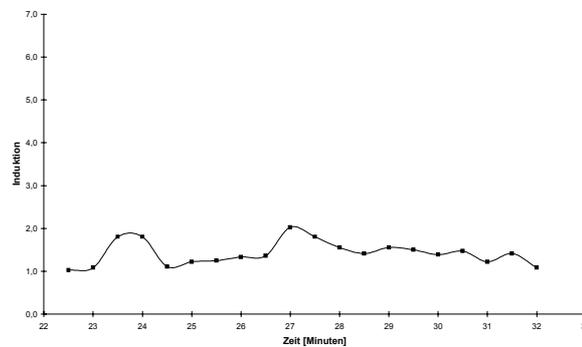
Mannheim Mitte Februar 1996



Mannheim Mitte Mai 1996



Freiburg Mitte Februar 1996



Vehicle Exhaust Particulate Matter

Abbildung 42: Vergleich der Mutagramme von Luftstaubextrakten unterschiedlicher Herkunft aus der Routineprobenahme

Die Mutagramme der Luftstaubextrakte von Mannheim und Freiburg aus dem Februar 1996 zeigen, wie die Standardmaterialien NIST SRM1649 und NIST SRM1648, einen Doppelpack als Maximum, wobei die absolute Höhe der Induktion der Probe aus Mannheim etwas höher liegt als bei der aus Freiburg. Das Mutagramm des Luftstaubextraktes aus Mannheim vom Mai 1996 zeigt wie das Mutagramm des Standardmaterials „Vehicle Exhaust“ kein Maximum, zudem ist das genotoxische Potential dieser Proben deutlich niedriger.

Die Gegenüberstellung der Gesamtmutagenität der Luftstaubextrakte (Abbildung 44) verdeutlicht die Unterschiede für die vier unterschiedlichen Proben. Die Mutagenitätswerte der unbehandelten Luftextrakte sowie die Gesamtrevertantensumme, der mittels HPLC-Trennung erhaltenen Fraktionen, können für diesen Vergleich herangezogen werden. Die Mutagenität der unbehandelten Luftstaubproben (weisse Balken) wie auch die Gesamtsumme der Revertanten aus den Fraktionen (schwarze Balken) zeigen die gleiche Abstufung zwischen den unterschiedlichen Luftstaubextrakten. Die Probe „Mannheim Februar 1996“ und die Probe „Freiburg Februar 1996“ weisen als „Winterproben“ die höchste

Gesamtmutagenität auf. Die Gesamtmutagenität der Probe „Mannheim Mai 1996“ ist um einen Faktor 2,4 geringer als für die beiden „Februar“ Proben.

Die Abbildung 43 zeigt diese Daten in einem Balkendiagramm.

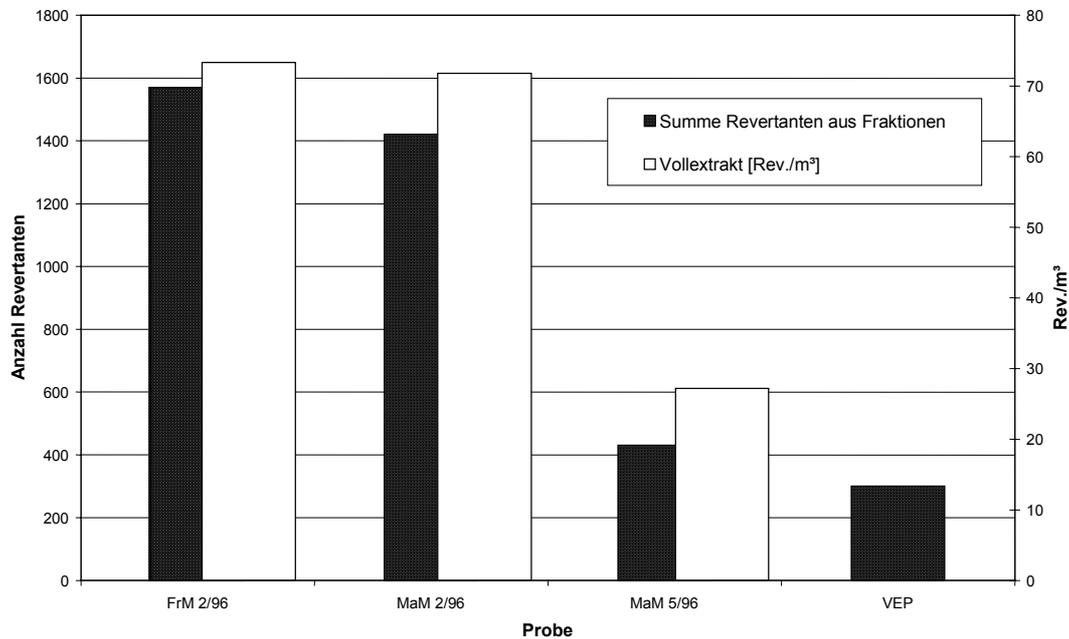


Abbildung 43: Vergleich der Gesamtmutagenität der Vollextraktproben sowie der Revertantensumme der Fraktionen

Für die Probe Vehicle Exhaust Particulate Matter (VEP) ist nur die Summe der Revertanten aus den Fraktionen angegeben, da für diesen Standard keine auf das Luftvolumen bezogenen Werte vorliegen.

5.4.3 Mutagramme von vorbehandelten Extrakten

Die in Kapitel 4.2.3 beschriebene Flüssig/Flüssig-Extraktionsmethode basiert auf den Säure/Base-Eigenschaften der Inhaltsstoffe in organischen Luftstaubextrakten. Die Flüssig/Flüssig-Extraktion liefert vier Fraktionen, die Verbindungen mit stark sauren, schwach sauren, basischen bzw. neutralen Eigenschaften enthalten. Für die Extrakte von atmosphärischen Luftstäuben konnte in Kapitel 5.2.1 gezeigt werden, daß die Fraktion der stark sauren Verbindungen gefolgt von der Fraktion der „neutralen Verbindungen“ die höchste genotoxische Aktivität aufweist. Diese Fraktionen können unter Anwendung der in Kapitel 5.3.3 beschriebenen semipräparativen HPLC-Methode weiter aufgetrennt werden. Hierzu wurden die vier Fraktionen aus dem Extrakt des Standardmaterials NIST SRM1649 nach dem Säure/Base-Trennschema präpariert, mittels der Normalphasenchromatographie fraktioniert und diese HPLC-Fraktionen im Ames-Test im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung untersucht.

Die folgende Abbildung (Abbildung 44) stellt die übereinandergelegten Mutagramme für die Fraktion der „neutralen Verbindungen“ und die der „starken Säuren“ dar.

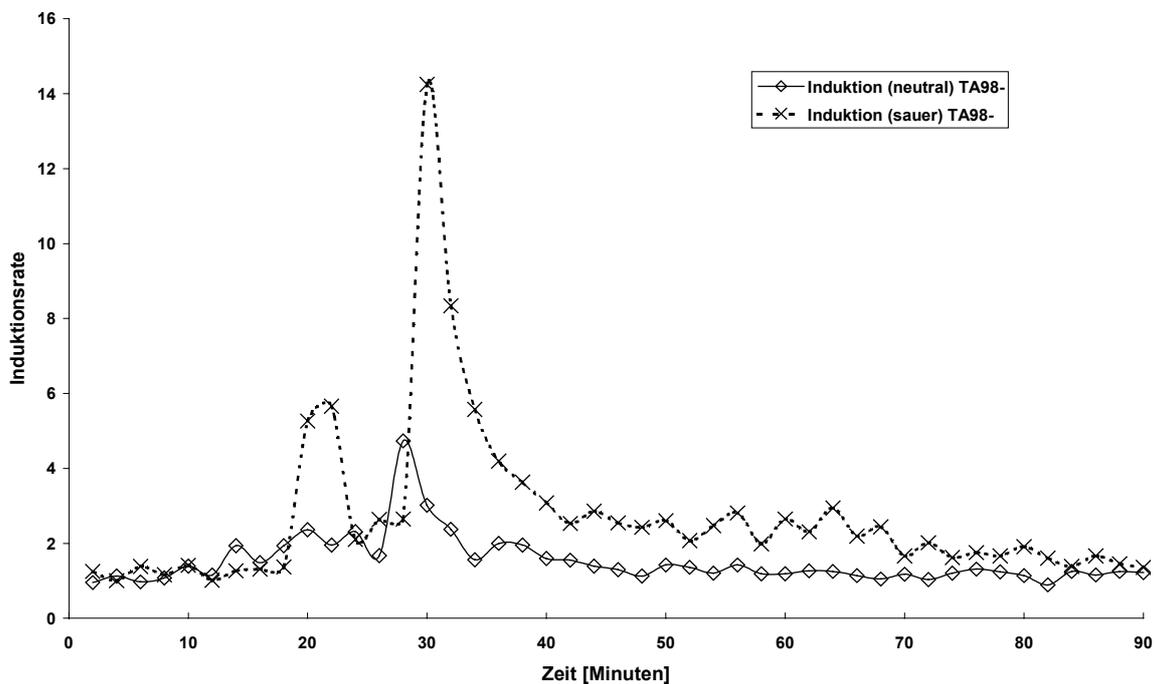


Abbildung 44: Mutagramm für die Fraktion der „neutralen Verbindungen“ und der Fraktion der „starken Säuren“ im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung

Das Mutagramm der „neutralen Verbindungen“ und das Mutagramm der „sauren Verbindungen“ zeigen eine unterschiedliche Verteilung der Mutagenität.

Die Fraktion der „starken Säuren“ zeigt die maximale genotoxische Aktivität zum gleichen Zeitpunkt wie der Vollextrakt des Standardmaterials. Der Verlauf und das Peakmuster der Mutagramme des Standardmaterials NIST SRM1649 aus dem Vollextrakt und der Fraktion der „starken Säuren“ ist nahezu identisch. Die Fraktion der „neutralen Verbindungen“ zeigt ebenfalls ein Maximum in diesem Retentionszeitbereich, welches jedoch um einen Faktor drei geringeren Wert erreicht als das Maximum im Mutagramm der „sauren Verbindungen“.

Eine weitere Fragestellung war, inwieweit die mutagene Aktivität im Ames-Test über Derivatisierung polarer funktioneller Gruppen verändert wird. Hierzu wurde der Extrakt über die HPLC-Methode fraktioniert und anschließend die Fraktionen in zwei Proben geteilt. Die erste Hälfte wurde unbehandelt im Ames-Test im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung untersucht. Die zweite Probenhälfte wurde mit Diazomethan als Derivatisierungsgenz versetzt und die einzelnen methylierten Fraktion ebenfalls im Ames-Test getestet.

Die folgende Abbildung (Abbildung 45) stellt die überlagerten Mutagramme von methyliertem und unmethyliertem NIST SRM1649 Luftstaubextrakt im Bereich zwischen 20-35 Minuten mit einer zeitlichen Auflösung von 0,5 Minuten dar.

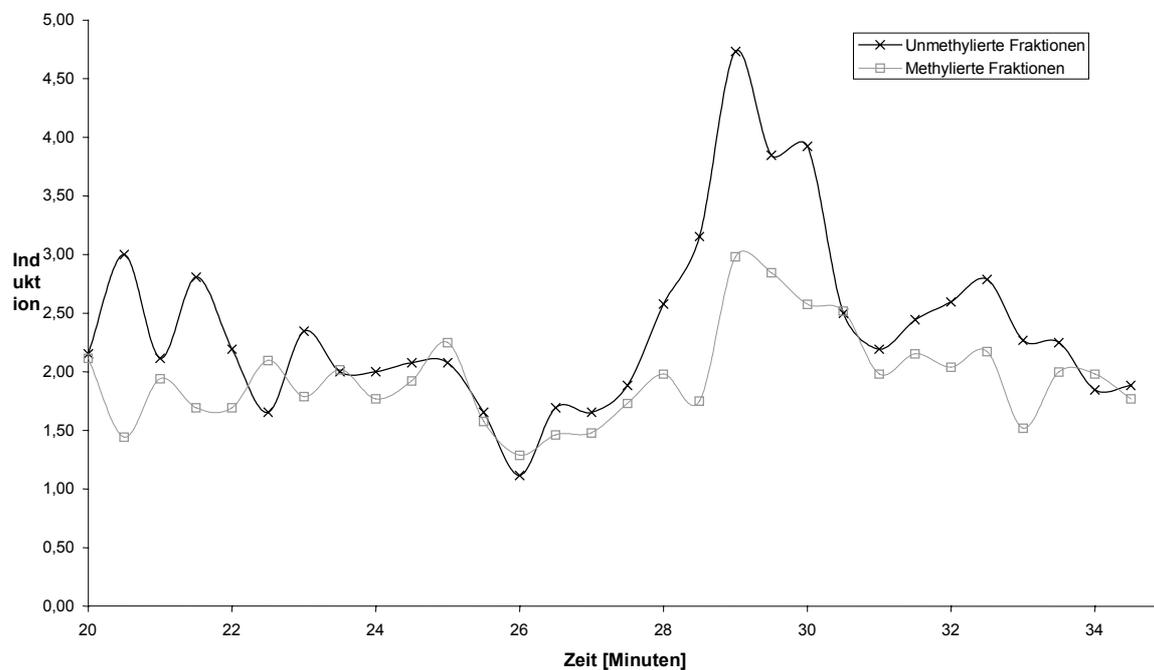


Abbildung 45: Vergleich der Mutagramme von methyliertem und unmethyliertem NIST SRM1649 Luftstaubextrakt im Bereich zwischen 20-35 Minuten

Die Mutagenität wird durch eine Methylierung des Luftstaubextraktes am Maximum und in der Gesamtbilanz um 50% reduziert. Diese Beobachtung konnte durch Experimente mit

anderen Luftstaubextrakten und bei der Methylierung der Fraktionen aus dem Säure/Base Trennungsgang verifiziert werden. Das genotoxische Potential der Fraktion der „starken Säuren“ wird durch Methylierung mit Diazomethan ebenfalls um die Hälfte reduziert.

Die Untersuchungsergebnisse stehen im Einklang mit den bisherigen Resultaten aus den Extraktionsversuchen wie auch aus den Flüssig/Flüssig-Extraktionsexperimenten. Die Hauptträger der mutagenen Aktivität in organischen Luftstaubextrakten sind polare organische Verbindungen mit sauren Eigenschaften. Dies wird durch das Mutagramm der Fraktion „sauren Verbindungen“ bestätigt. Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung saurer Verbindungen für die Mutagenität der Luftstaubextrakte kann aus den Untersuchungen mit underivatisierten Extrakten gewonnen werden. Bei der Methylierung mit Diazomethan bei Raumtemperatur werden überwiegend freie Säuren verestert. Die Methylierung des Untersuchungsmaterials halbiert die im Ames-Test detektierbare genotoxische Aktivität bei der Versuchsdurchführung ohne metabolische Aktivierung (Abbildung 45). Hieraus kann man ebenfalls die Bedeutung der sauren Verbindungen als direkt wirksame Mutagene im Ames-Test ersehen.

5.4.4 Mutagramme aus unterschiedlicher biologischer Testdurchführung

Die Fraktionen des Gesamtextraktes wurden im Ames-Test in verschiedenen Teststämmen mit und ohne metabolische Aktivierung untersucht. Als Probematerial wurde der Luftstaubextrakt von NIST SRM1648 für diese Untersuchungen verwendet. Ziel dieser Experimente war es, über das Verhalten der Peaks innerhalb der Mutagramme neue Informationen zur Identität zu erhalten.

Die folgende Abbildung (Abbildung 46) zeigt eine Gegenüberstellung der Mutagramme von NIST SRM1648 Staubextrakte bei einer Ames-Testdurchführung mit und ohne S9-Mix als metabolische Aktivierung im Stamm TA98.

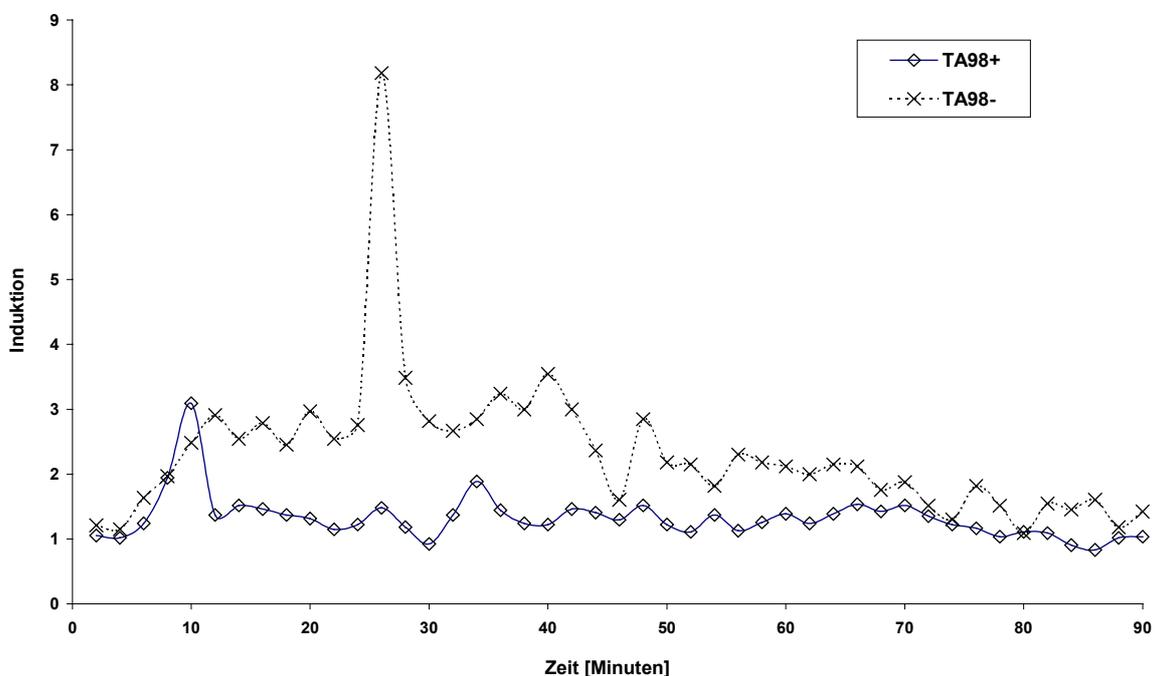


Abbildung 46: Vergleich von zwei Mutagrammen der gleichen Probe (TA98 mit / ohne metabolische Aktivierung)

Bei den Untersuchungen, die unter Zugabe von S9-Mix durchgeführt wurden, verschwindet das Maximum, das bei 26 Minuten auftritt, zusätzlich entsteht jedoch ein kleineres Maximum bei 7 Minuten. Die Entstehung des neuen Maximums ist durch die Aktivierung der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe zu mutagen wirksamen Epoxiden zu erklären. Das Verschwinden des Peaks bei 26 Minuten muß so interpretiert werden, daß es sich hierbei um aktive Verbindungen handelt, die durch das eingesetzte Enzymgemisch metabolisiert werden können. Die mutagen wirksamen Substanzen im Maximum sind somit direkt genotoxisch und werden durch die unspezifischen Monooxygenasen im S9-Mix

desaktiviert. Dieses Ergebnis ist auch vor dem Hintergrund interessant, daß die mutagene Aktivität der Gesamtextrakte - unabhängig von ihrer Herkunft - meist gleich ist.

Eine ähnliche Beobachtung ergibt sich, wenn als Teststamm TA100 verwendet wird. In diesem Fall zeigt sich kein Maximum im Mutagramm. Die mutagenen Verbindungen, die mit dieser HPLC-Methode aufgetrennt werden können, scheinen somit Rasterschubmutationen und nur in geringem Umfang Basenaustauschmutationen hervorzurufen.

Die folgende Abbildung (Abbildung 47) zeigt eine Gegenüberstellung der Mutagramme von NIST SRM1648 Staubextrakte bei einer Ames-Testdurchführung im Stamm TA98 und TA100 ohne metabolische Aktivierung.

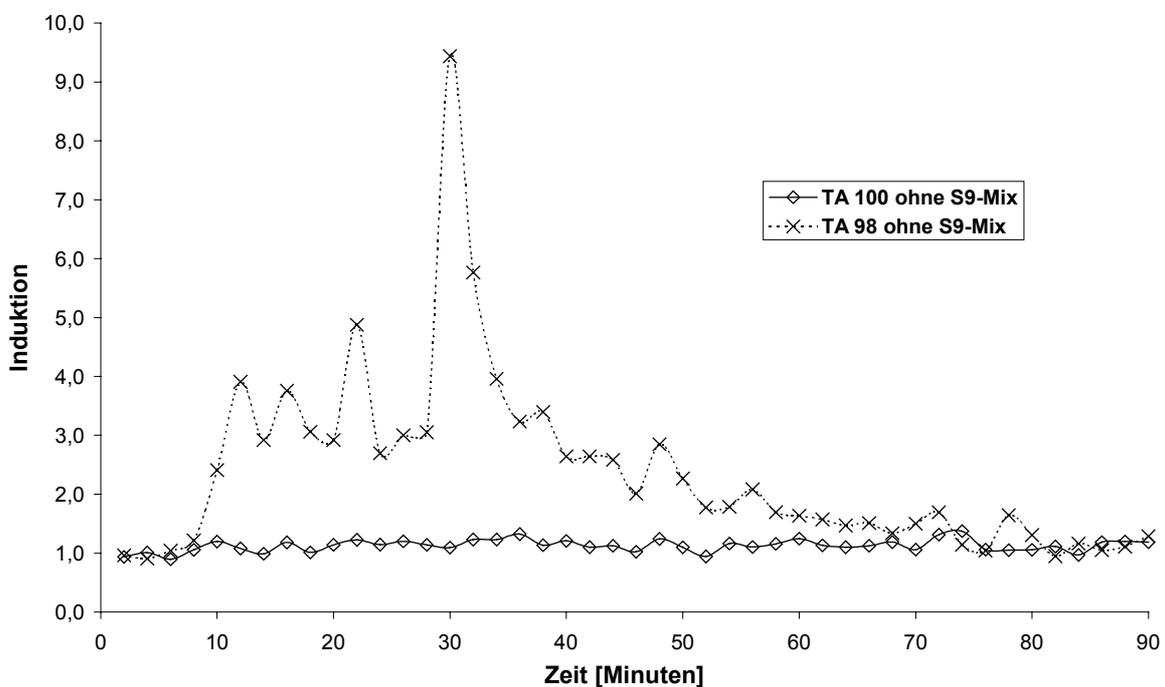


Abbildung 47: Vergleich der Mutagramme von NIST SRM1648 Extrakt im Stamm TA98 und im Stamm TA100

Die unfraktionierten Extrakte zeigen im Stamm TA100 mutagene Aktivität, welche jedoch im Mittel etwas geringer als im Teststamm TA98 ist. Die Frage, warum die fraktionierten Proben im Mutagramm kein nennenswertes genotoxisches Potential aufweisen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gelöst und sollte durch weitergehende Untersuchungen geklärt werden. Möglicherweise erzeugen synergistische Effekte im Vollextrakt die im Stamm TA100 detektierbaren Basenaustauschmutationen.

Über die klassischen Ames-Teststämme TA98 und TA100 können Informationen über die Art der DNA-Schädigung gewonnen werden. Die mutagen wirksamen Substanzen sind vorwiegend Rasterschubmutagene, die durch metabolisch aktive Enzymsysteme ihr

genotoxisches Potential verlieren. Die Basenpaar spezifischen Teststämme TA700X für den Ames-Test zeigen je nach eingesetzter Variante eine bestimmte Basenaustauschmutation an. Die Ergebnisse aus Kapitel 5.2.2 zeigen, daß die Stämme TA7005 und TA7002 am empfindlichsten für die Luftstaubextrakte reagieren. Basierend auf diesen Voruntersuchungen wurde ein Luftstaubextrakt aus Mannheim vom Januar 1996 mit einer zeitlichen Auflösung von 0,5 Minuten fraktioniert und im Stamm TA7002 und Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung getestet.

Die folgende Abbildung (Abbildung 48) stellt die überlagerten Mutagramme im Stamm TA7002 (grau) und Stamm TA98 (schwarz) des Mannheim Januar 1996 Luftstaubextraktes im Bereich zwischen 0 und 35 Minuten mit einer zeitlichen Auflösung von 0,5 Minuten dar.

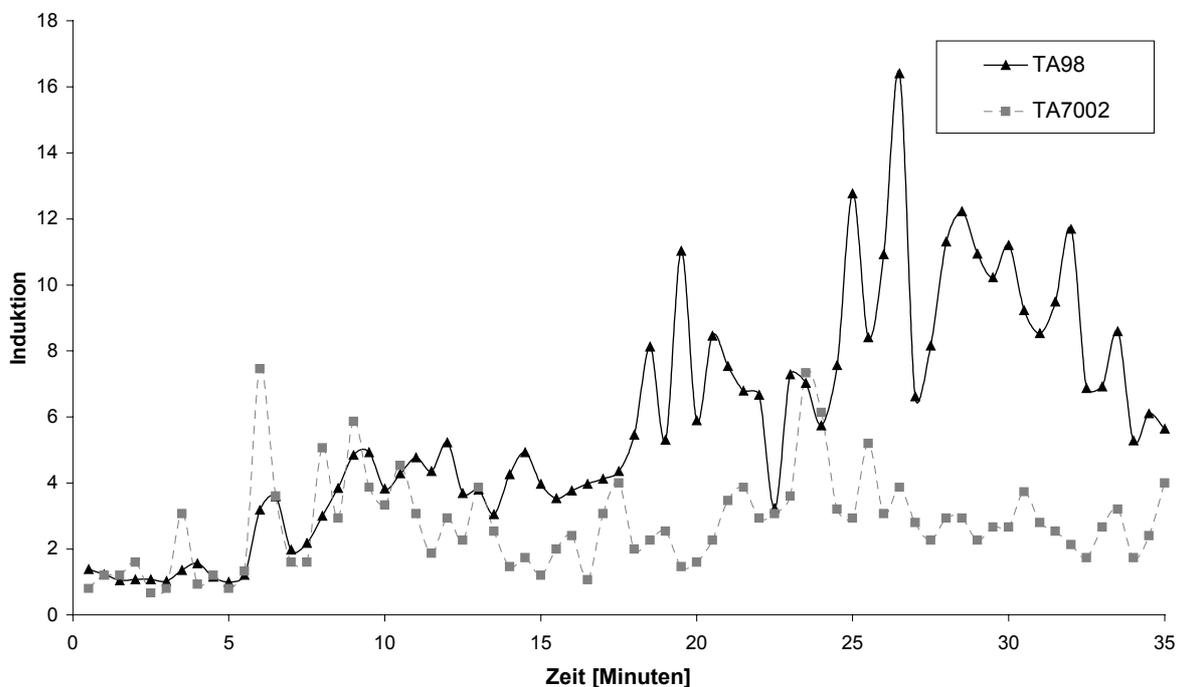


Abbildung 48: Mutagramme für den Extrakt Mannheim Januar 1996 im Stamm TA7002 (grau) und im Stamm TA98 (schwarz)

Die Auswertung der Mutagramme ergibt für den Stamm TA7002 einen Peak bei 6,5 Minuten und einen weiteren bei 24 Minuten mit einer Induktionsrate von etwa 6,5. Die Peaks im Stamm TA98 bei 20 und 26 Minuten haben keine korrespondierenden Peaks im TA7002 Mutagramm. Dies deutet auf völlig unterschiedliche, mutagene wirksame Stoffgruppen hin. Lediglich bei 6 und 24 Minuten liegen zwei korrelierbare Peaks in beiden Mutagrammen vor. Der Peak bei 6 Minuten liegt im Elutionsbereich der PAK und nitro-PAK, wobei bei einer Testdurchführung ohne metabolische Aktivierung ausschließlich die nitro-PAK für die Mutagenität an diesem Peak in Frage kommen.

5.5 Untersuchungen mit dem ^{32}P -Postlabeling Verfahren nach Randerath

Der Ausbildung von Mutationen und dem Wachstum von Revertanten im Ames-Test geht in jedem Fall unabhängig vom Teststamm eine Veränderung der DNA voraus. Diese Schädigung der Erbinformation kann unter anderem durch eine DNA-Adduktierung erfolgen. Diese Adduktbildung wird im ^{32}P -postlabeling Verfahren als quantifizierbare Größe meßbar. Der Extrakt eines Luftstaubes aus Freiburg vom Februar 1996 wurde über die HPLC-Methode in 9 Fraktionen je 10 Minuten fraktioniert. Um genügend Probematerial zur Verfügung zu haben, wurde die HPLC-Trennung 5fach wiederholt. Ein Fünftel der Probemenge jeder der 9 Fraktionen wurde im Ames-Test im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung untersucht. Vier Fünftel des Probematerials aus den Fraktionen wurde mit dem ^{32}P -postlabeling Verfahren untersucht.

Die folgende Abbildung 49 zeigt die Chromatogramme der 5 HPLC-Trennungen bei Fluoreszenzdetektion und die Anzahl der Revertanten für die 9 Fraktionen im Ames-Test.

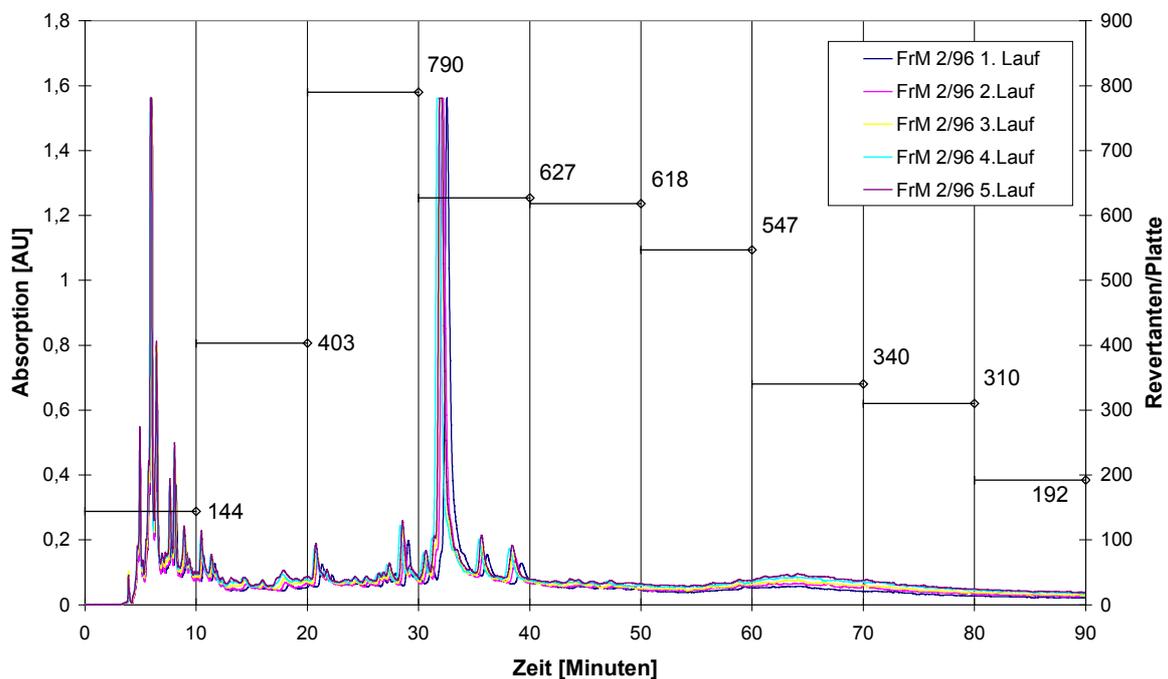


Abbildung 49: Chromatogramme der Trennung von Freiburg Februar 1996 Extrakt sowie die Anzahl der Revertanten je Fraktion im Stamm TA98

Insgesamt wurden 25 mg EOM in 5 HPLC-Trennungen mit jeweils 5 mg fraktioniert. Eine Trennung wurde für den Ames-Test verwendet, die restlichen 4 Trennungen zusammengefaßt und zur in vitro Adduktierung benutzt. Die Abbildung 49 verdeutlicht, daß die 3. Fraktion (20-30 min) die höchste Revertantenzahl mit 790 Revertanten ergibt.

Die ^{32}P -postlabeling Analysen zeigen für alle Fraktionen ohne Aktivierung eine DRZ mit relativ unspezifischem Fleckenmuster (Abbildung 50). Die ersten 3 Fraktionen unterscheiden sich jedoch deutlich in ihren DNA-Adduktfleckenmustern voneinander.

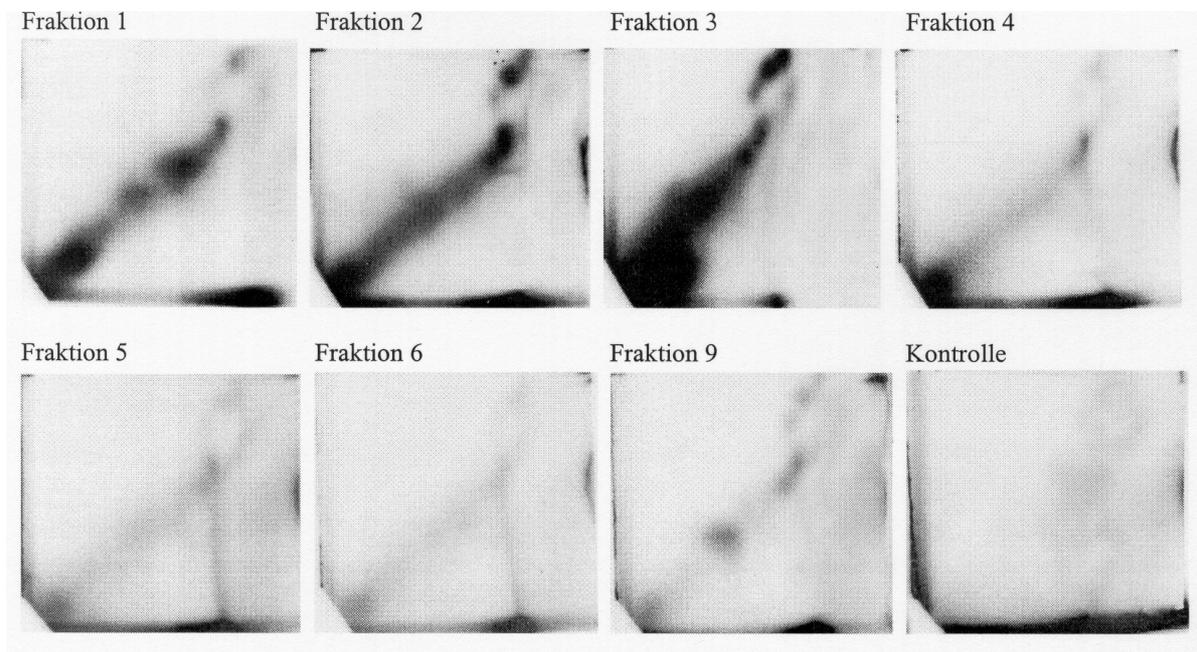


Abbildung 50: Autoradiographien der 9 HPLC-Fraktionen und eines GFF-Blindwertes

In den Fraktionen 2 und 3 erreichen die DRZs die höchsten RAL-Werte (Abbildung 51) bei einer Durchführung ohne reduktive Aktivierung.

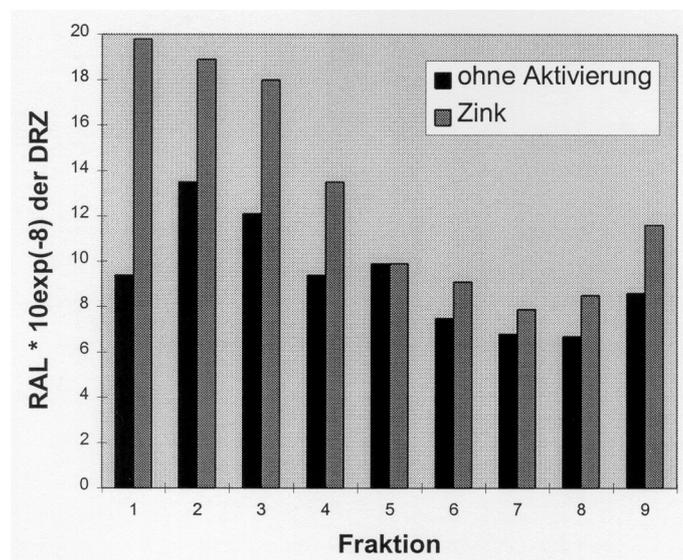


Abbildung 51: RAL-Werte der HPLC-Fraktionen nach ^{32}P -postlabeling mit Butanolextraktion mit und ohne Zinkaktivierung

Nach Aktivierung der HPLC-Fraktionen mit Zink ergeben sich generell höhere Adduktierungsraten als ohne aktivierendes System. Hier erhält man den höchsten RAL-Wert für die erste Fraktion, in der die Nitroaromaten zu finden sind. Nach reduktiver Aktivierung

werden die nitro-PAK verstärkt in ^{32}P -postlabeling Analysen detektiert. Das 3-Nitrobenzanthron ist nach seiner Retentionszeit in der 2. Fraktion enthalten.

Die DNA-Addukt-Fleckenmuster der Fraktionen 1, 2, 3 und 9 enthalten einzelne diskrete Addukt-Flecken. Diese speziellen Addukt-Muster könnten für ein späteres Biomonitoring zur Erfassung der Exposition gegenüber genotoxischen Luftstaubbestandteilen verwendet werden.

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit dem DKFZ Heidelberg Arbeitsgruppe Prof. Wiessler wurden die 4 Säure/Base-Fractionen des Standardmaterials NIST SRM1648 sowie der unbehandelte Vollextrakt mit der ^{32}P -Postlabeling Methode auf ihre DNA-Adduktraten untersucht. Hierzu wurde eine Einwaage von 1,6mg EOM je Probematerial in 3 verschiedenen Versuchsdurchführungen im Doppelansatz verwendet. Die Inkubation der DNA erfolgte ohne Aktivierung, enzymatisch mit S9-Mix und reduktiv mit Zink. Die Adduktierungsrate der einzelnen Fraktionen und des Vollextraktes wurden quantitativ über den RAL-Wert bestimmt.

Die folgende Abbildung zeigt die Auswertung der Postlabeling Untersuchung.

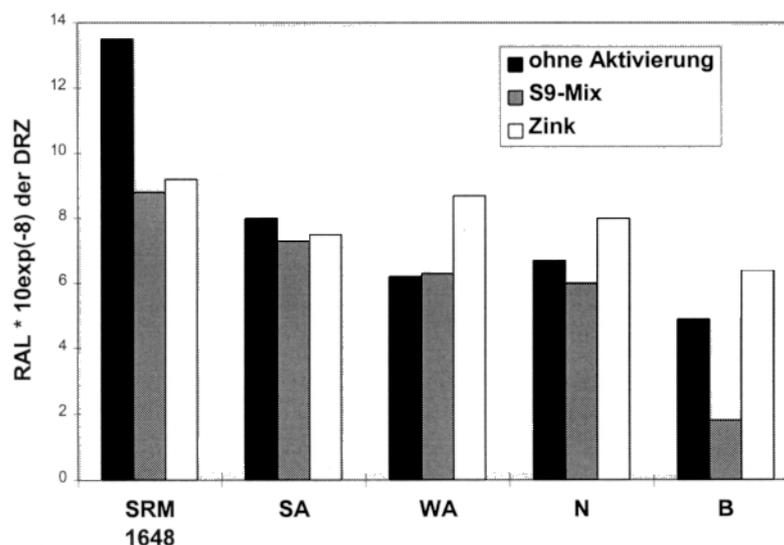


Abbildung 52: Postlabeling Untersuchungsergebnis der NIST SRM1648 Fraktionen SRM1648 – Vollextrakt, SA – Starke Säuren; WA – Schwache Säuren; N – Neutralfraktion; B – Basen

Die Adduktierungsraten der DRZs zeigen im Gegensatz zum Ames-Test keinen entscheidenden Unterschied zwischen den einzelnen Säure/Base-Fractionen. Die Fraktion der „starken Säuren“, der „schwachen Säuren“ und der „neutralen Verbindungen“ ergeben das gleiche Ausmaß an DNA-Adduktierung. Die Fraktion der Basen zeigt wie im Ames-Test die geringste Aktivität. Den deutlichsten Einfluss auf die Adduktierung zeigt die reduktive

Aktivierung mit Zink. Der Vollextrakt zeigt bei Zugabe eines metabolischen Enzymsystems zur Aktivierung indirekt wirksamer Mutagene durch Cytochrome eine Verringerung der Adduktrate. Dieses Verhalten tritt ebenfalls für die atmosphärischen Luftstäube im Ames-Test auf. Die Fraktion der neutralen Verbindungen zeigt keine erhöhte Adduktrate bei der Zugabe des metabolisch wirksamen S9-Mix. Die Ergebnisse im Ames-Test zeigen für die Inhaltsstoffe dieser Fraktion eine höhere Genotoxizität. Die Fraktion der „schwachen Säuren“ zeigt im Postlabeling-Experiment eine deutliche Aktivität. Hier ist im Ames-Test keine oder schwache genotoxische Wirksamkeit zu beobachten.

5.6 Chemische Untersuchungen

5.6.1 Zuordnung von Stoffgruppen zu den HPLC-Fractionen

Neben den Untersuchungen zur genotoxischen Aktivität wurden die Luftstaubextrakte und deren Fraktionen mit gaschromatographischen Methoden analysiert, um die mutagen wirksamen Verbindungen zu charakterisieren. Um diese Information zu erhalten, wurden die Fraktionen aus den verschiedenen Trennmethode mit der Hilfe von gaschromatographischen Gerätekopplungen untersucht. Der Schwerpunkt der analytischen Arbeiten war nicht möglichst viele Verbindungen aus den Staubextrakten zu identifizieren, sondern gezielt die Inhaltsstoffe der mutagen wirksamsten Fraktionen zu charakterisieren.

Im Vorfeld dieser Analysen wurden Einzelstandards verschiedener Stoffgruppen mit der HPLC-Methode getrennt. Die Fraktionen der bekannten Standardproben wurden entsprechend den Luftstaubextraktfraktionen mittels Gaschromatographie untersucht, um die Retentionszeitbereiche den einzelnen Substanzklassen einordnen zu können.

Die Retentionszeiten der PAK und ihrer nitrierten Derivate (Nitro-PAK) wurden durch die HPLC-Trennung von Standardlösungen bestimmt. Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 24) stellt die untersuchten Einzelstandards zusammengefasst dar.

PAK			NITRO-PAK
			9-Nitroanthracen
Naphthalin	Fluoranthen	Benzo[a]pyren	9-Nitrophenanthren
Acenaphthylen	Pyren	Dibenzo[ah]anthracen	3-Nitrophenanthren
Acenaphthen	Benzo[a]anthracen	Indeno[123-cd]pyren	3-Nitrofluoranthen
Fluoren	Chyrsen	Benzo[ghi]perylen	1-Nitropyren
Phenanthren	Benzo[b]fluoranthen		6-Nitrochyrsen
Anthracen	Benzo[k]fluoranthen		6-Nitrobenzo[a]pyren

Tabelle 24: Standardkomponenten PAK und nitro-PAK

Die folgende Abbildung 53 zeigt die Überlagerung der Chromatogramme des Mannheim Mitte Februar 1996 Luftstaubextraktes und einer PAK/nitro-PAK Standardlösung mit den in der Tabelle 24 aufgeführten Einzelkomponenten. Die Abbildung 53 veranschaulicht, daß die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe und ihre nitrierten Derivate innerhalb der ersten zehn Minuten eluieren.

Eine GC/MS-Analyse dieses Bereiches einer Trennung eines SRM1649 Luftstaubextraktes bestätigt diesen Sachverhalt. Die Substanzklasse der nitro-PAK ließ sich mit der verwendeten

Injektionstechnik (Split/Splitless) und der geringen Konzentrationen per GC/MS nicht verifizieren.

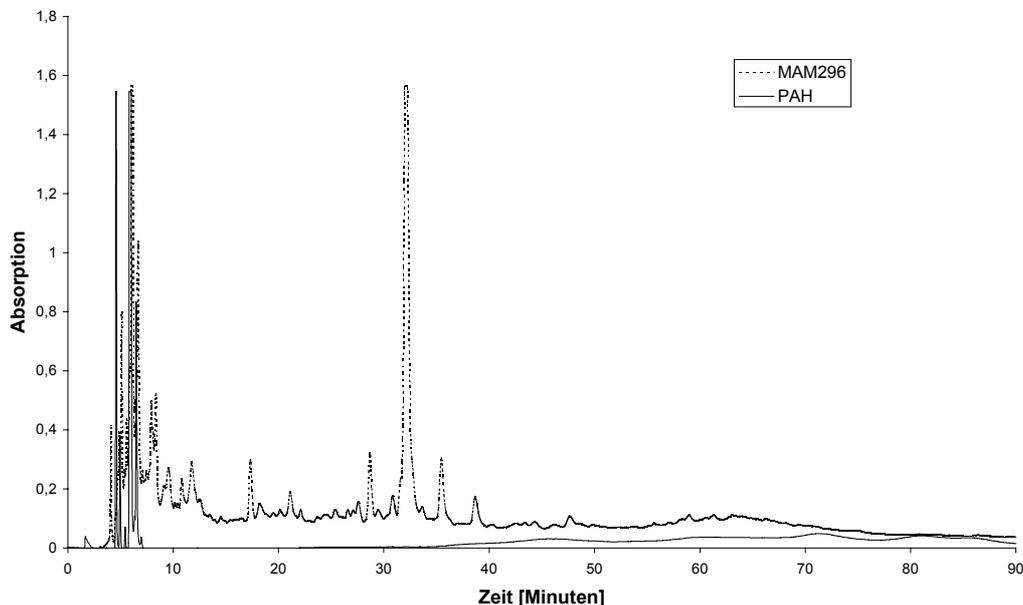
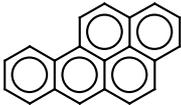
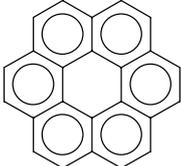


Abbildung 53: Chromatogramme eines des Mannheim Mitte Februar 1996 Staubextraktes und einer PAK/nitro-PAK Standardlösung

Das Eluat der ersten 10 Minuten wurde gesammelt und mit Hilfe einer GC/MS Kopplung untersucht. Sowohl der Luftstaubextrakt aus Mannheim wie auch die Standardlösung enthielten, wie aus dem HPLC-Chromatogramm und den bisherigen Versuchen zu erwarten war, die Stoffgruppe der PAK.

Neben den PAK und nitro-PAK wurden weitere Einzelverbindungen aus unterschiedlichen Substanzklassen mit der Normalphasenmethode auf der CN-modifizierten Kieselgelsäule untersucht und die Retentionszeiten bestimmt. Das Eluat wurde für die detektierten Peaks gesammelt und mittels GC/MS analysiert. Ein Vergleich mit den HPLC-Chromatogrammen der Luftstaubextrakte gibt Auskunft über die Elutionszeitpunkte bestimmter Stoffgruppen.

Die folgende Tabelle (Tabelle 25) stellt die Ergebnisse dieses Experiments zusammengefasst dar.

Substanz	Struktur	Retentionszeit
Benzo[a]pyren		4,7 Minuten
Coronen		5,3 Minuten

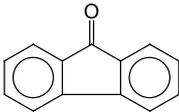
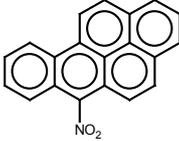
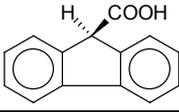
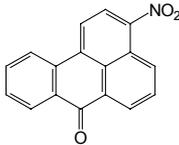
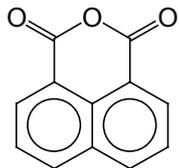
Substanz	Struktur	Retentionszeit
Fluoren-9-on		5,5 Minuten
6-Nitrobenzo[a]pyren		8,9 Minuten
9-Fluorencarbonsäure		9,1 Minuten
Hexadecansäure	$C_{15}H_{31}COOH$	11,1 Minuten
3-Nitrobenzanthron		12,1 Minuten
Hexadecandisäure	$HOOC-C_{14}H_{34}-COOH$	14,1 Minuten
1,8-Naphthaldicarbonsäureanhydrid		20,3 Minuten

Tabelle 25: Ergebnisse der Einzelstandarduntersuchungen mittels HPLC und GC/MS

Die Eluate der Einzelstandards wurden für die detektierten Peaks gesammelt und mittels GC/MS untersucht. Alle Verbindungen liessen sich über ihr Massenspektrum identifizieren. Eine Veränderung der Standards durch die HPLC-Trennung bzw. die Probearbeitung zur GC/MS-Analyse konnte nicht beobachtet werden. Die Einzelstandards wurden einzeln und als Gemisch im Ames-Test auf ihr mutagenes Potential untersucht. Hierbei zeigten die beiden aliphatischen Carbonsäuren keine Aktivität und die aromatischen Nitroverbindungen die größte Aktivität.

5.6.2 Quantitative Analyse der PAK und NitroPAK

Begleitend zur Bewertung der mutagenen Aktivität der Luftstaubextrakte und deren Fraktionen wurden die einzelnen Fraktionen der verschiedenen Luftstaubextrakte chemisch analysiert, um die Inhaltsstoffe bzw. die Träger der Mutagenität näher zu charakterisieren. Die einzelnen Fraktionen und Vollextrakte der Luftstäube wurden hierzu mittels GC/MS auf ihre Zusammensetzung untersucht und einzelne bekannte Inhaltsstoffe quantifiziert.

Zur Überprüfung der Aufarbeitungsmethode und der Quantifizierung wurden im ersten Schritt Wiederfindungsexperimente mit Standardproben bekannter Einwaage durchgeführt. Die Standardproben werden wie unbekannte Proben aufgearbeitet und quantifiziert. Ein Vergleich des Ergebnisses der Quantifizierung mit der eingesetzten Menge der Standardprobe gibt ein Maß für den Fehler der Methode an.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden je 3 PAK-Standardgemische mit den bekannten absoluten Mengen 20 ng, 100 ng und 500 ng allen Schritten der Probenvorbereitung unterworfen und quantifiziert. Das Verhältnis zwischen den quantifizierten und den eingesetzten Konzentrationen entspricht der Wiederfindung der Analysenmethode.

SUBSTANZ	EICHFUNKTION	KOEFFIZIENT (linear fit)	WIEDERFINDUNG [%]		
			20ng	100ng	500ng
Naphthalen	RR=1,66 * AR	0,996	< 5	< 5	< 5
Acenaphthylen	RR=1,93 * AR	0,994	96 ± 6	123 ± 24	97 ± 32
Acenaphthen	RR=1,11 * AR	0,996	99 ± 7	124 ± 30	98 ± 42
Fluoren	RR=1,43 * AR	0,996	97 ± 5	92 ± 32	89 ± 24
Phenanthren	RR=0,992 * AR	0,993	102 ± 14	122 ± 14	97 ± 2
Anthracen	RR=0,993 * AR	0,995	106 ± 8	114 ± 2	109 ± 1
Fluoranthren	RR=1,28 * AR	0,995	139 ± 9	153 ± 6	132 ± 1
Pyren	RR=1,23 * AR	0,996	140 ± 9	155 ± 5	135 ± 1
Benzo[a]anthracen	RR=1,04 * AR	0,995	93 ± 8	104 ± 7	81 ± 5
Chrysen	RR=1,05 * AR	0,995	88 ± 7	115 ± 15	95 ± 5
Benzo[b]fluoranthren	RR=1,68*AR	0,996	66 ± 9	74 ± 25	105 ± 7
Benzo[k]fluoranthren	RR=1,95*AR	0,995	71 ± 9	93 ± 12	83 ± 7
Benzo[a]pyren	RR=1,58*AR	0,998	124 ± 6	102 ± 17	88 ± 3
Indeno[1,2,3-cd]pyren	RR=2,13*AR	0,996	91 ± 10	81 ± 28	93 ± 1
Dibenzo[a,h]anthracen	RR=2,47*AR	0,996	130 ± 6	141 ± 14	99 ± 3
Benzo[ghi]perylen	RR=2,94*AR	0,994	110 ± 6	109 ± 5	106 ± 2

Tabelle 26: Quantifizierungsparameter der PAK-Methode

Die Variable AR (area response) ist das Verhältnis zwischen dem Peakflächenintegral des internen Standardpeaks und dem Integral des Peaks des PAK. Die RR (relative response) steht für das Konzentrationsverhältnis zwischen internem Standard und dem PAK. Aufgrund der

Tatsache, daß die Einwaage des internen Standards immer konstant 200 ng beträgt, kann der PAK Gehalt aus einer unbekannt Probe nach der Eichfunktion ermittelt werden. Die Eichung ist um so besser, je näher der Eichkoeffizient bei 1,0 liegt.

Die Qualität der Analysen wurde durch interne und externe Qualitätssicherungsmaßnahmen abgesichert. Die erfolgreiche Teilnahme an einem Ringversuch der AQS Baden-Württemberg im Jahr 1996 sichert die Ergebnisse der durchgeführten Messungen ab.

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse des Ringversuchs. Im Anhang Kapitel 7.4 ist eine Kopie des Ringsversuchszertifikats beigelegt.

Parameter	Fluoranthen µg/l	Benzo[b]- fluoranthen µg/l	Benzo[k]- fluoranthen µg/l	Benzo[ghi]- Perylen µg/l	Indeno[1,2,3- cd]-pyren µg/l
Probe 1					
Soll	0,055	0,2579	0,315	0,0976	0,4443
Gefunden	0,244	0,345	0,297	0,09	0,396
Probe 2					
Soll	0,351	0,1825	0,1582	0,0686	0,0834
Gefunden	0,169	0,224	0,15	0,072	0,097
Probe 3					
Soll	0,5209	0,0594	0,4101	0,3148	0,0606
Gefunden	0,466	0,142	0,383	0,147	0,057
Probe 4					
Soll	0,0766	0,0861	0,2226	0,6161	0,1827
gefunden	0,154	0,125	0,194	0,478	0,156
Proportionali- tätäsfaktor	1,915049	1,522042	0,924651	0,800711	0,971136
Korrelations- koeffizient	0,723775	0,972777	0,999461	0,954122	0,992775

Tabelle 27: Ergebnisse des Ringversuches im Rahmen der AQS Baden-Württemberg

Es wurden 4 verschiedene Ringsversuchsproben auf ihren PAK Gehalt hin untersucht. Die Tabellenwerte Soll stellen die Konzentrationen der PAK in den Proben dar. Die Angaben für „Gefunden“ geben die Werte der eigenen Messungen mittels GC/MS-Analyse an. Der Korrelationskoeffizient gibt die Übereinstimmung zwischen diesen beiden Werten an.

Aus den Erkenntnissen des Ringversuches wurde d₁₀-Fluoranthen als weiterer interner Standard hinzugefügt, um die Analysenqualität für die 4 Ring PAK Fluoranthen und Pyren zu verbessern.

5.6.3 Quantitative Analyse der tschechischen Luftstaubextrakte

Die Konzentrationen von 16 Referenz PAK wurden für die Fraktionen der neutralen bzw. sauren Verbindungen sowie für die unbehandelten Industrieabgaspartikelextrakte aus Tschechien ermittelt. Die tschechischen Proben wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Scram (Prag) entnommen. Die Bezugsgröße für die quantitative Analyse war die organisch extrahierbare Masse (EOM) je Probe.

Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 28) zusammengefasst dargestellt.

SUBSTANZ	KOSICE	OSTRAVA	KOSICE	KOSICE
	VOLLEXTRAKT [ng/mg EOM]	VOLLEXTRAKT [ng/mg EOM]	ST. SÄUREN [ng/mg EOM]	NEUTRAL [ng/mg EOM]
Naphthalen	n.n	n.n	n.n.	n.n
Acenaphthylen	44,8	120,2	n.n.	n.n
Acenaphthen	22,9	n.n	n.n.	n.n
Fluoren	96,0	376,5	n.n	n.n
Phenanthren	1691,2	3554,8	300,4	1742,3
Anthracen	692,0	2063,1	121,0	587,0
Fluoranthren	6642,3	16058,9	195,0	17154,8
Pyren	5704,7	13394,9	17809,3	13985,1
Benzo[a]anthracen	5605,5	9999,5	1731,8	16243,0
Chrysen	5481,7	9491,2	1404,2	16613,8
Benzo[b]fluoranthren	5635,1	7899,0	1780,0	14576,1
Benzo[k]fluoranthren	4070,6	6996,7	1207,0	11525,8
Benzo[a]pyren	2437,2	3375,0	475,1	5911,0
Indeno[1,2,3-cd]pyren	4673,4	5159,7	1521,2	9885,6
Dibenzo[a,h]anthracen	963,4	1013,1	310,6	1692,3
Benzo[ghi]perylen	3519,9	4506,0	1220,2	8639,9

Tabelle 28: Ergebnisse der PAK-Quantifizierung ausgewählter Luftstaubextrakte

Die Resultate der Quantifizierung ergeben, daß diese Kokereiabgaspartikelextrakte zu ca. 80% aus PAK bestehen. Die PAK mit einer Ringanzahl kleiner gleich 3 liegen größtenteils nicht partikelgebunden vor. Diese mittel- bis leichtflüchtigen PAK werden gasförmig oder als

Aerosole mit dem Abgas emittiert. Die PAK mit 4 kondensierten Ringsystemen oder mehr z.B. das Benzo[a]anthracen liegen fast vollständig partikelgebunden vor.

Die PAK sind indirekt wirksame Mutagene und entfalten ihr genotoxisches Potential erst nach einer metabolischen Aktivierung. Im Gegensatz hierzu besitzen die nitro-PAK eine direkte mutagene Wirksamkeit. Für einige Staubextrakte konnten für 6 Referenz-nitro-PAK die Konzentrationen mittels GC/MS² ermittelt werden.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der nitro-PAK Quantifizierung sowie ein GC/MS-Chromatogramm mit eingeblendeten Massenspektren.

SUBSTANZ	Teplice	Kosice
9-Nitroanthracen	111,4 ng/mg EOM	78ng/mg EOM
9-Nitrophenanthren	3,1 ng/mg EOM	66ng/mg EOM
3-Nitrophenanthren	5,3 ng/mg EOM	23ng/mg EOM
3-Nitroflouranthren	10,3 ng/mg EOM	-
1-Nitropyren	5,3 ng/mg EOM	27 ng/mg EOM
6-Nitrochrysen	-	-
6-Nitrobenzo[a]pyren	-	-

Tabelle 29: Ergebnisse der nitro-PAK Quantifizierung Kosice und Teplice

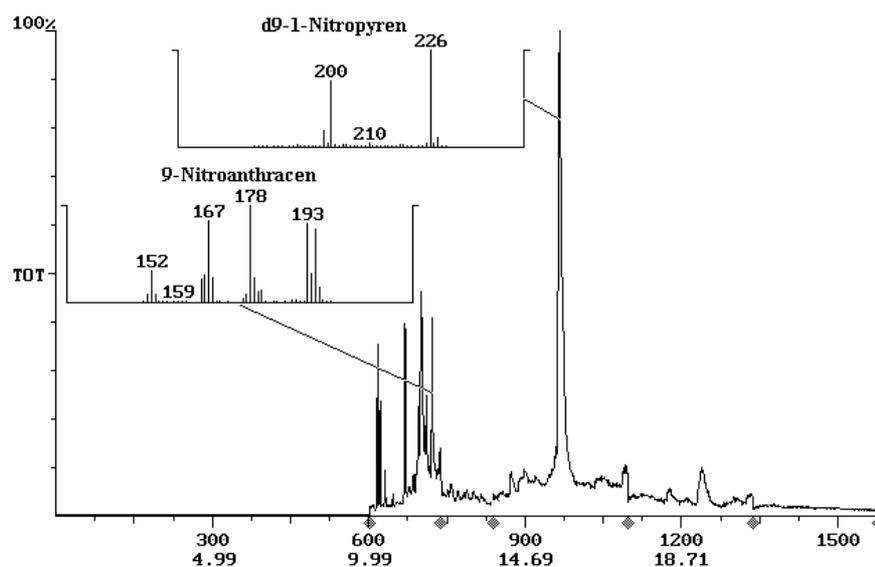


Abbildung 54: Chromatogramm der nitro-PAK Quantifizierung mit eingeblendeten Tochtermassenspektren von 9-Nitroanthracen und d₉-1-Nitropyren

Die Konzentrationen der nitro-PAK liegen im allgemeinen um ca. zwei bis drei Größenordnungen tiefer als die PAK-Konzentrationen.

Neben den Industrieabgasproben wurden atmosphärische Luftstaubextrakte aus Teplice (Nordböhmen, CSR) untersucht. Die Proben aus Teplice wurden im Winter entnommen und zeigen die Belastungssituation eines urbanen Raumes mit Hausbrandemissionen durch die Verbrennung von Braunkohle. Die Konzentrationen an PAK liegen um einen Faktor 3-4 tiefer im Vergleich zu den Kokereiabgasen.

Die Werte der PAK-Quantifizierung der Proben aus Teplice sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 30) dargestellt.

SUBSTANZ	Teplice VOLLEXTRAKT [µg/mg EOM]	Teplice STARKE SÄUREN [µg/mg EOM]	Teplice NEUTRAL [µg/mg EOM]
Phenanthren	0,4	n.n.	1,5
Anthracen	0,1	n.n.	0,3
Fluoranthren	1,4	0,1	4,6
Pyren	1,7	0,1	6,0
Benzo[a]anthracen	1,4	0,1	4,5
Chrysen	1,5	0,1	4,4
Benzo[b]fluoranthren	1,8	0,2	4,0
Benzo[k]fluoranthren	1,7	0,2	3,0
Benzo[a]pyren	0,7	0,1	1,6
Indeno[123-cd]pyren	1,0	n.n.	3,0
Dibenzo[ah]anthracen	n.n.	n.n.	0,1
Benzo[ghi]perylen	1,2	0,2	3,4

Tabelle 30: Ergebnisse der PAK-Quantifizierung von Luftstaubextrakten aus Teplice (CSR)

Die Fraktion der „starken Säuren“ aus Kosice und Teplice weisen beide PAK-Konzentrationen auf, welche durch den hohen Gesamtanteil an PAK und eine ungenügende Trennung entstanden sind. Die GC/MS-Analyse der beiden Fraktionen zeigt wesentliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Proben. Die Probe aus Teplice enthält größere Mengen an Carbonsäuren und anderen nicht näher identifizierbaren Verbindungen.

Die neutrale Fraktion des Luftstaubextraktes wurde in 4 unterschiedlichen Labors auf ihren PAK-Gehalt quantifiziert, wobei sowohl HPLC-Fluoreszenzmethoden wie auch GC/MS-Methoden in den verschiedenen Labors eingesetzt wurden. Die nachstehende Abbildung zeigt einen Vergleich der Quantifizierungsergebnisse zwischen den verschiedenen Labors und ihren Methoden.

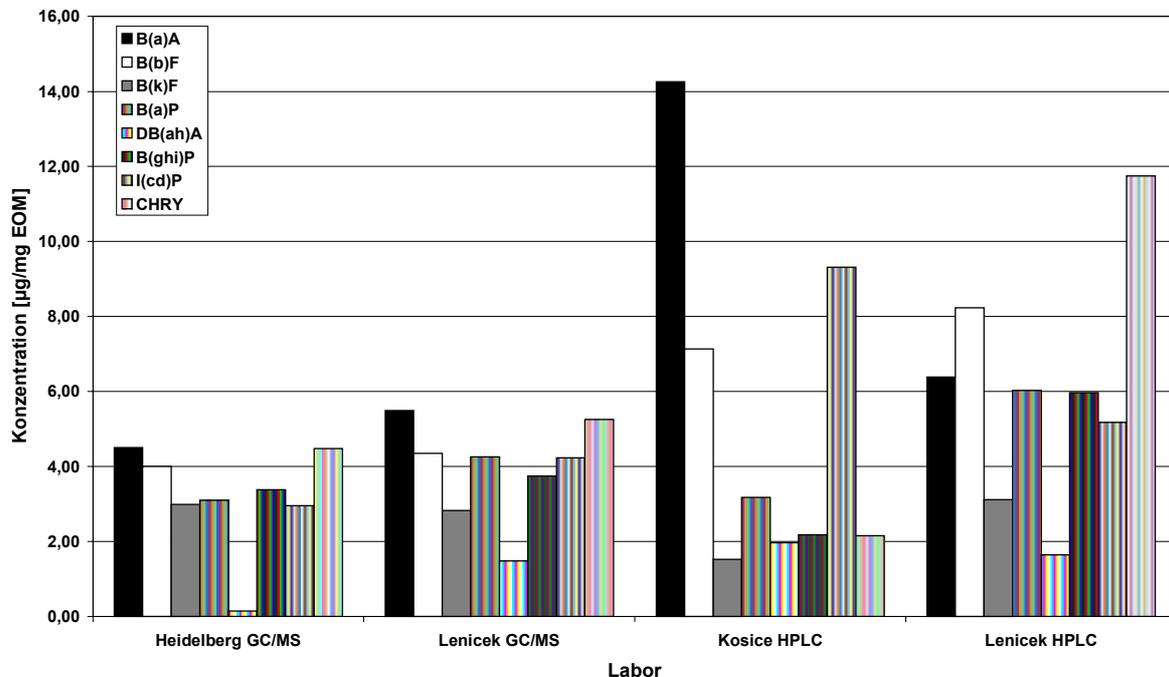


Abbildung 55: Vergleich der PAK-Quantifizierungsergebnisse zwischen verschiedenen Labors

Der Vergleich der PAK-Konzentrationen zwischen den einzelnen Labors zeigt, daß die Ergebnisse aus GC/MS Methoden gut übereinstimmen. Die Werte der HPLC-Messungen liegen deutlich höher als die per GC/MS ermittelten Konzentrationen. Der starke Unterschied bei dem Gehalt des Benzo[a]pyren ist vermutlich auf die Störung mit dem Isomer Benzo[e]pyren zurück zu führen. Die Ursache für die starke Differenz bei der Konzentration des Dibenzo[ah]anthracen ist nicht ganz geklärt. Vermutlich liegt eine Überschneidung zwischen Dibenzo[ah]anthracen und Indeno[123-cd]pyren vor, die eine geringe Differenz der Retentionszeiten von 0,2 Minuten aufweisen und ähnliche Massenspektren besitzen.

5.6.4 Quantitative Analyse von Luftstaubextrakten aus Baden-Württemberg

Parallel zu den tschechischen Proben wurden Luftstaubextrakte aus Mannheim und Freiburg auf ihre PAK Konzentrationen untersucht. Die Probennahmestellen Mannheim und Freiburg repräsentieren urbane industrielle Ballungszentren mit starkem Verkehrsaufkommen und zeigen weit geringere PAK-Konzentrationen als die Kokereiabgaspartikelextrakte aus Kosice bzw. Ostrava. Die Konzentrationen der Proben aus Baden-Württemberg sind im Gegensatz zu den tschechischen Werten nicht in $\mu\text{g}/\text{mg}$ EOM sondern in ng/m^3 Luft angegeben. Für die Proben aus Mannheim und Freiburg ist die Bezugsgrösse das angesaugte Luftvolumen der eigenen Probenahme. Die Bezugsgrösse der tschechischen Proben ist die Masse an extrahiertem, organischem Material (EOM), bedingt durch die Entnahme und Aufarbeitung der Proben innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Scram (Prag). Auf Grund des grossen systematischen Fehlers bei der Ermittlung der Masse an EOM wurden die Proben aus Baden-Württemberg nicht auf diese Basis umgerechnet.

Die beiden folgenden Tabellen (Tabelle 31, Tabelle 32) stellen die Ergebnisse der PAK-Quantifizierungen zusammengefasst dar.

SUBSTANZ	JANUAR [ng/m ³]	FEBRUAR [ng/m ³]	MÄRZ [ng/m ³]
Acenaphthylen	0,2	< 0,1	< 0,1
Acenaphthen	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Fluoren	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Phenanthren	0,3	0,9	0,4
Anthracen	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Fluoranthren	1,0	1,8	0,6
Pyren	1,0	1,5	0,4
Benzo[a]anthracen	2,0	1,1	0,8
Chrysen	2,0	1,2	0,8
Benzo[a]pyren	0,5	0,4	0,7
Indeno[123-cd]pyren	1,8	1,8	0,8
Dibenzo[ah]anthracen	0,2	0,2	< 0,1
Benzo[ghi]perylen	2,0	1,4	0,7

Tabelle 31: Ergebnisse der PAK Quantifizierung der Luftstaubextrakte Freiburg Mitte 1996

Ein Vergleich der beiden Tabellen ergibt eine höhere PAK Belastung der Stadt Mannheim als für die Stadt Freiburg. Die Konzentrationen sinken für beide Standorte zum März hin ab. Diese Beobachtung deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen im Rahmen der Diplomarbeit. Hier konnte ein eindeutiger jahrezeitlicher Verlauf der PAK Konzentrationen mit hohen Werten in den Wintermonaten und niedrigen Werten in den Sommermonaten

nachgewiesen werden. Auch die Erkenntnisse aus den Untersuchungen zur genotoxischen Aktivität dieser Proben spiegeln die Ergebnisse der PAK-Quantifizierungen sowie den jahreszeitliche Konzentrationsprofil wider.

SUBSTANZ	JANUAR [ng/m ³]	FEBRUAR [ng/m ³]	MÄRZ [ng/m ³]
Acenaphthylen	n.n	n.n	n.n
Acenaphthen	n.n	n.n	n.n
Flouren	n.n	0,2	n.n
Phenanthren	0,8	2,0	0,5
Anthracen	0,3	1,1	0,2
Fluoranthen	2,0	3,2	1,0
Pyren	1,8	2,4	0,8
Benzo[a]anthracen	1,3	3,0	1,3
Chrysen	3,0	3,0	1,3
Benzo[b]fluoranthen	2,7	2,1	1,1
Benzo[k]fluoranthen	2,5	1,9	1,0
Benzo[a]pyren	0,2	0,3	0,2
Indeno[123-cd]pyren	2,7	2,2	0,9
Dibenzo[ah]anthracen	0,2	0,2	0,0
Benzo[ghi]perylen	2,6	1,6	0,7

Tabelle 32: Ergebnisse der PAK Quantifizierung der Luftstaubextrakte Mannheim Nord 1996

5.6.5 Analyse der mutagen wirksamen Flüssig/Flüssig-Extraktionsfraktionen

Die Kenntnis der Identität der mutagen wirksamen Substanzen ist der Schlüssel zum Verständnis der Entstehung des genotoxischen Potentials von partikelgebundenen, organischen Verbindungen in der Troposphäre. Die einfache Klärung dieser Fragestellung ist jedoch durch das komplexe Vielstoffgemisch aus dem sich ein organischer Luftstaubextrakt zusammensetzt verhindert. Begleitend zur Bewertung der mutagenen Aktivität der flüssig/flüssig extrahierten Fraktionen wurden die einzelnen Fraktionen der verschiedenen Luftstaubextrakte chemisch analysiert, um die Inhaltsstoffe bzw. die Träger der Mutagenität näher zu charakterisieren. Die einzelnen Fraktionen und Vollextrakte der Luftstäube wurden hierzu mittels GC/MS auf ihre Zusammensetzung untersucht. Die folgenden Abbildungen (Abbildung 56-Abbildung 57) zeigen die Chromatogramme der „stark sauren“ Fraktion und die Neutralfraktion der Luftstaubextrakte aus Kosice.

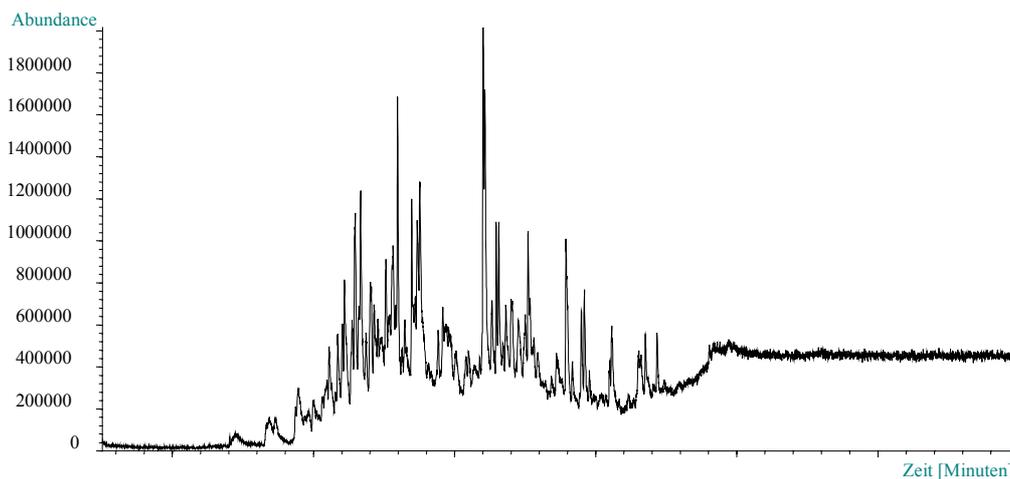


Abbildung 56: Kosice Kokereiabgaspartikel – Fraktion „Starke Säuren“

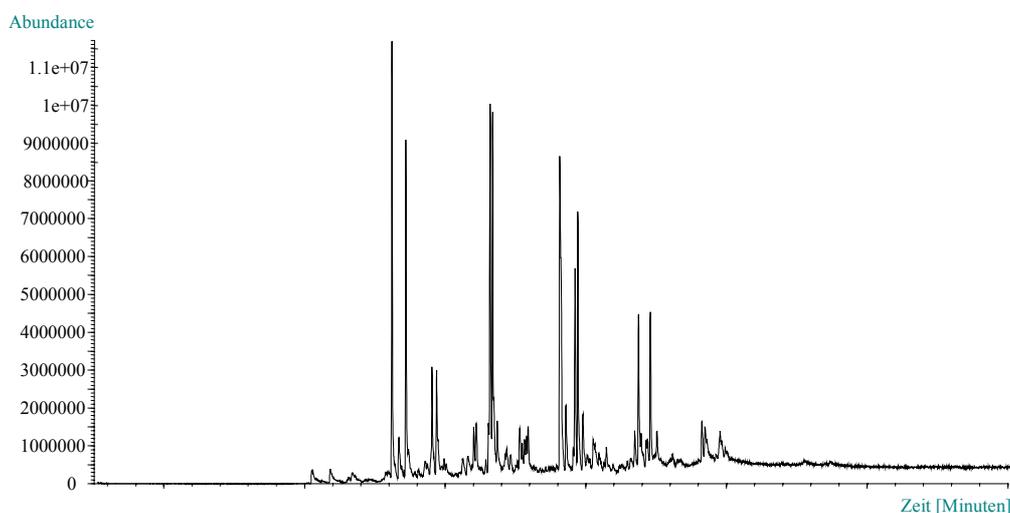


Abbildung 57: Kosice Kokereiabgaspartikel – „Neutralfraktion“

Der erste Vergleich der beiden Chromatogramme zeigt, daß die analysierten Flüssig/Flüssig-Fractionen weiterhin Vielstoffgemische darstellen. Über die Interpretation der Massenspektren aus den GC/MS-Chromatogrammen und über den Vergleich dieser Spektren mit Referenzspektren lassen sich Einzelverbindungen identifizieren.

Die nachstehende Abbildung (Abbildung 58) zeigt das GC/MS-Chromatogramm des unbehandelten Extraktes aus Kosice und die extrahierten Massenspuren der Molmassen ausgewählter PAK, wie z.B. Fluoranthen, Pyren, (202 m/z), Benzo[a]anthracen, Chrysen (228m/z), Benzofluoranthen, Benzopyren (252m/z) und Dibenzo[ah]anthracen, Benzo[ghi]perylen (276m/z). In der Literatur gelten die PAK als Leitsubstanzen für den Belastungsgrad der Luft durch die Verbrennung fossiler Energieträger. Die Fractionen der neutralen Verbindungen aus atmosphärischen Luftstaubextrakten enthalten ebenfalls PAK in geringeren Konzentrationen als die Proben aus Kosice oder Ostrava. Die PAK-Konzentrationen der einzelnen Fractionen sind dem Kapitel 5.6.2 zu entnehmen.

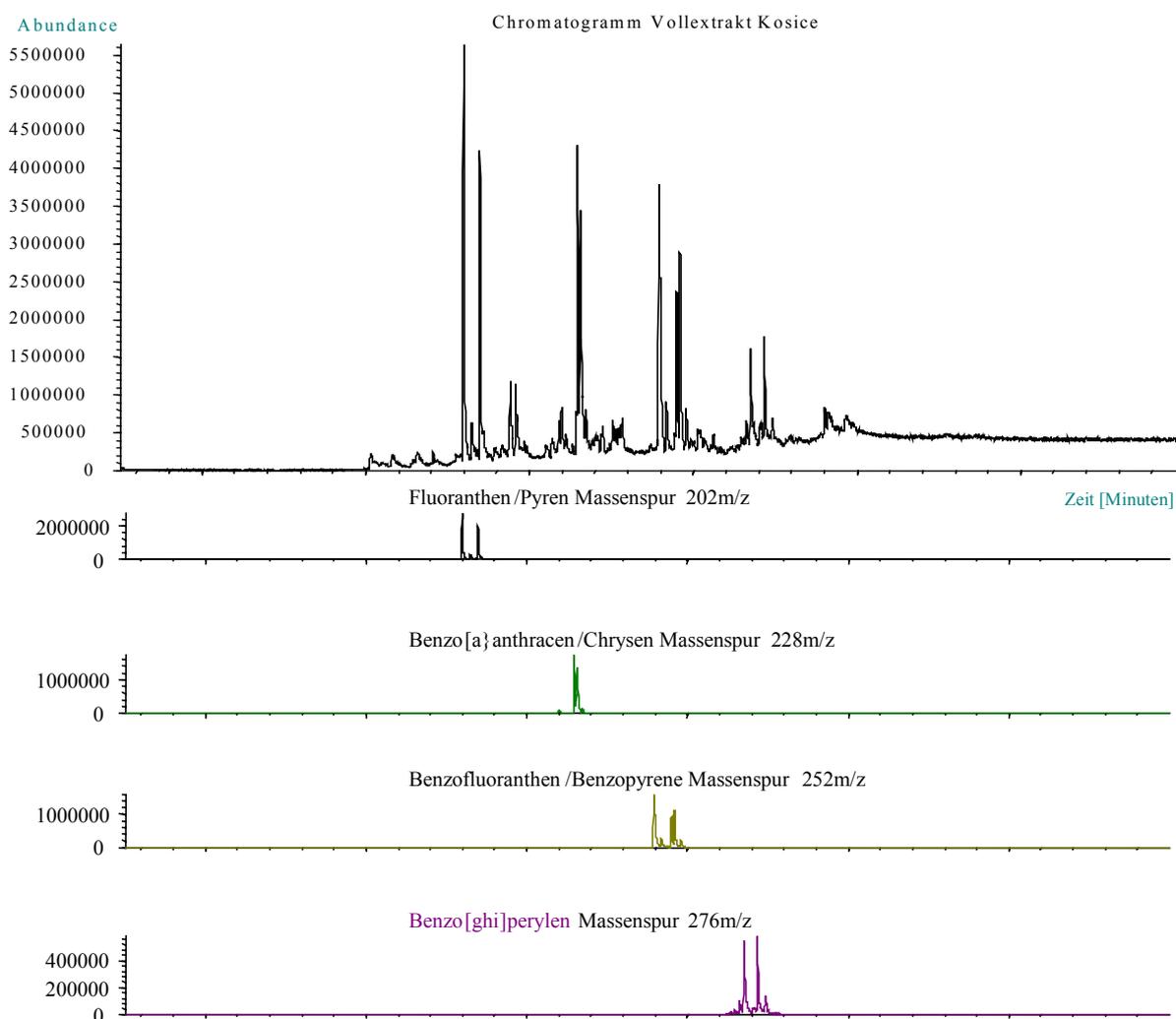


Abbildung 58: Vollextrakt (oben) und PAK Massenspuren (unten) der Probe aus Kosice

Diese Massenspuren lassen sich in der Neutralfraktion entsprechend extrahieren und somit die Stoffgruppe der PAK der Neutralfraktion zuordnen. In der „stark sauren“ Fraktion konnten ebenfalls PAK über ihre Massenspektren identifiziert werden. Diese Beobachtung ist auf eine ungenügende Trennung der Fraktionen durch den hohen Anteil an PAK zurück zu führen.

Über die Derivatisierung des Probematerials oder den Einsatz von chemischer Ionisation lassen sich polare Stoffklassen mit Hilfe einer GC/MS-Kopplung analysieren. Die Derivatisierung von komplexen Proben kann mit einem Methylierungsagens wie z.B. Diazomethan erfolgen. Diazomethan besitzt eine hohe Reaktivität. Die Methylierung ist einfach bei Raumtemperatur durchführbar und geht nur in geringem Umfang unerwünschte Nebenreaktionen ein. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von Diazomethan besteht auch darin, daß neben dem derivatisierten Produkt als weiteres Nebenprodukt Stickstoff gebildet wird.

Die saure Fraktion aus der Flüssig/Flüssig-Extraktion wurde mit Diazomethan methyliert, um die polaren Inhaltsstoffe für die gaschromatographische Analyse leichter verdampfbar zu machen. Über die Auswertung des GC/MS-Chromatogramms lassen sich einzelne Peaks anhand ihrer Massenspektren über eine Massenspektrenbibliothek identifizieren.

Die Abbildung 59 zeigt das GC/MS-Chromatogramm der methylierten Flüssig/Flüssig-Extraktionsfraktion der „sauren Verbindungen“.

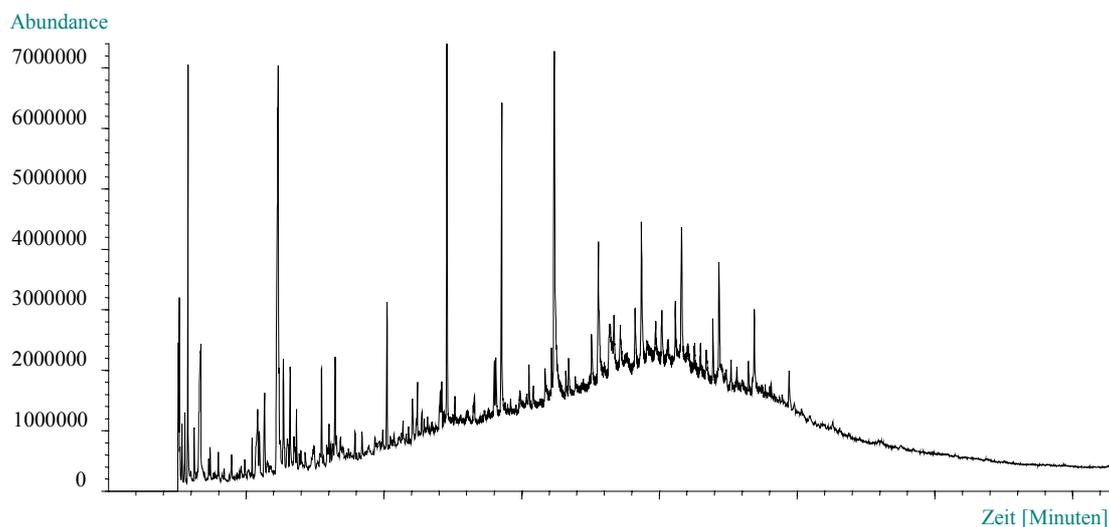


Abbildung 59: Mannheim 10/1995 Luftstaubextrakt – methylierte Fraktion Starke Säuren EI

Das in Abbildung 59 dargestellte Chromatogramm zeigt, daß die analysierte Flüssig/Flüssig-Fraktion ein Vielstoffgemisch repräsentiert. Über die Auswertung der Massenspektren liessen sich eiigen Einzelverbindungen aus der untersuchten Probe identifizieren. Die identifizierten Verbindungen waren größtenteils methylierte mono- bzw. di-Carbonsäuren.

Die folgende Tabelle 33 gibt einen Überblick über einen Teil der identifizierten Verbindungen aus der sauren Fraktion. Die Vielzahl der Verbindungen innerhalb der Fraktion „starke Säuren“ und die Möglichkeit, daß sich während des Trennvorganges über Nebenreaktionen Artefakte bilden, schränken die Sicherheit der Identifizierung ein.

SUBSTANZ	MOLMASSE	SUMMENFORMEL
4-Benzyloxybenzonnitril	209,8 g/mol	C ₁₄ H ₁₁ NO
Phthalsäure	166,1 g/mol	C ₈ H ₆ O ₄
Phthalsäureanhydrid	148,1 g/mol	C ₈ H ₄ O ₃
1,8-Naphthaldicarbonsäureanhydrid	198,2 g/mol	C ₁₂ H ₆ O ₃
3-Methylbenzoesäure	136,2 g/mol	C ₈ H ₈ O ₂
Nonansäure	160,3 g/mol	C ₉ H ₂₀ O ₂
Decansäure	174,3 g/mol	C ₁₀ H ₂₂ O ₂
Undecansäure	188,3 g/mol	C ₁₁ H ₂₄ O ₂
Octadecandicarbonsäure	318,5 g/mol	C ₁₈ H ₃₈ O ₄
1-Naphthalencarbonsäure	172,2 g/mol	C ₁₁ H ₈ O ₂
Hexadecandicarbonsäure	290,4 g/mol	C ₁₆ H ₃₄ O ₄

Tabelle 33: Repräsentative Inhaltsstoffe der Fraktion „starke Säuren“

Die aufgeführten Verbindungen (Tabelle 33) können jedoch für sich genommen nicht als die Träger der Mutagenität bezeichnet werden, da diese Substanzen als Einzelstoffe im Ames-Test nur schwach oder nicht mutagen wirksam sind.

5.6.6 Analyse der mutagen wirksamen HPLC-Fractionen

Zur Charakterisierung der Stoffklassen und der Identifizierung von Einzelstoffen wurden die HPLC-Fractionen mit der Hilfe von gaschromatographischen Gerätekopplungen untersucht. Die Möglichkeit nach der gaschromatographischen Trennung einen identifizierenden Detektor einzusetzen, macht diese Technik grundsätzlich zu einem für diesen Zweck sehr geeigneten Instrument. Über massenselektive Detektoren oder Atomemissionsdetektoren lassen sich Aussagen über Struktur und Zusammensetzung der analysierten Verbindung machen. Die Verwendbarkeit dieser Technik hängt jedoch entscheidend von der Verdampfbarkeit des Probematerials ohne thermische Zersetzungsphänomene bis zu einer Temperatur von etwa 320°C ab.

Dies ist jedoch bei den zu analysierenden Fraktionen bzw. Verbindungen ein besonders kritischer Punkt. Bei den gesuchten mutagenen Verbindungen handelt es sich primär um polare Verbindungen mit sauren Eigenschaften, die sich daher größtenteils nicht unzersetzt verdampfen lassen. Für die gaschromatographische Untersuchung müssen die Fraktionen bzw. Luftstaubextrakte daher in jedem Fall zunächst derivatisiert werden.

Für die hier vorgestellten gaschromatographischen Untersuchungen wurden die Fraktionen aus dem in dargestellten Mutagramm (Abbildung 60) verwendet. Das Mutagramm wurden mit einer Auflösung von je einer HPLC-Fraktion pro 30 Sekunden erhalten.

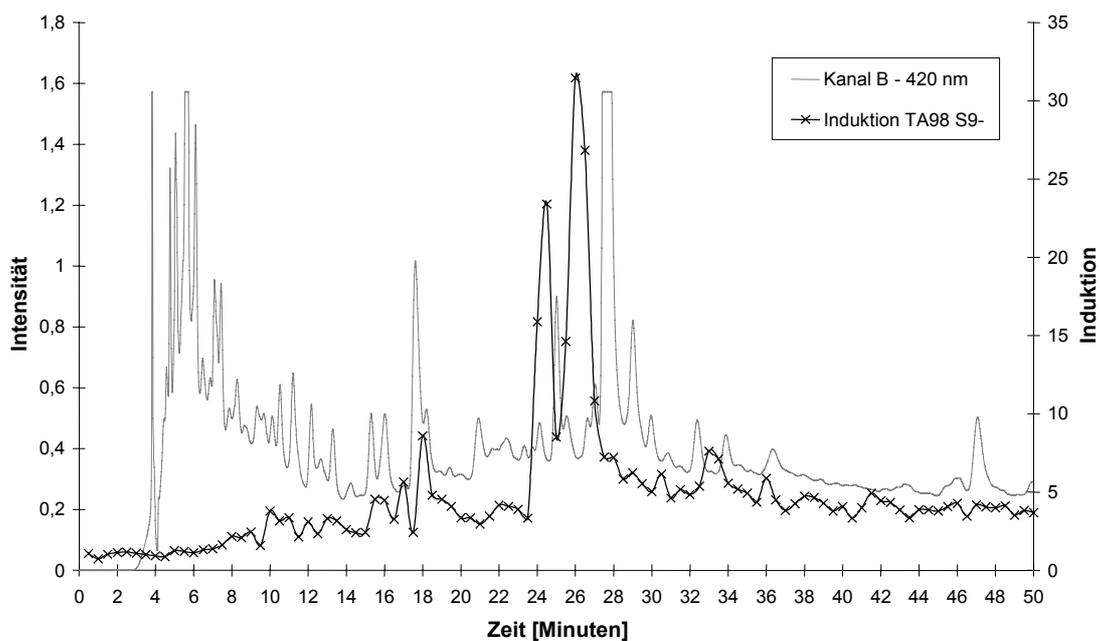


Abbildung 60: Mutagramm und HPLC-Chromatogramm bei Fluoreszenzdetektion von NIST SRM1649 Extrakt

In den ersten 20 Minuten ist ein kleines Maximum bei 18 Minuten erkennbar. Bis zu diesem Zeitpunkt eluieren unpolare und moderat polare Substanzen unter den bereits beschriebenen Trennparametern. Ein GC/MS-Chromatogrammvergleich zwischen der Neutralfraktion aus der Flüssig/Flüssig-Trennung und dem Eluat der ersten 18 Minuten der HPLC-Trennung vom NIST SRM1648 verdeutlicht die Übereinstimmung der Inhaltsstoffe innerhalb dieser Proben. Die folgende Abbildung (Abbildung 61) zeigt die beiden Chromatogramme im direkten Vergleich.

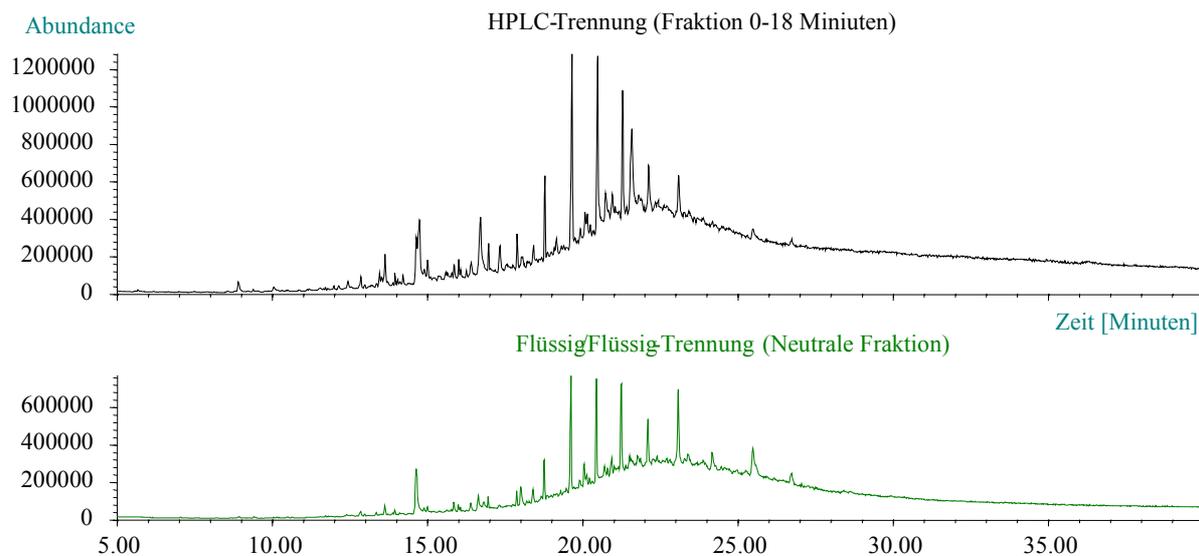


Abbildung 61: Vergleich zwischen den Chromatogrammen der Neutralen Fraktion Flüssig/Flüssig-Trennung (unten) und dem Eluat der ersten 18 Minuten der HPLC-Trennung (oben) vom NIST SRM1648

Innerhalb dieser ersten 18 Minuten eluieren Substanzklassen wie die aliphatischen Kohlenwasserstoffe, die PAK, die nitro-PAK und aromatische Ketone. Die meisten dieser Verbindungen lassen sich auch unmethyliert mit einer GC/MS-Kopplung nachweisen.

Das Mutagenitätsmaximum ist der Abbildung 60 zu entnehmen und liegt zwischen 24 und 28 Minuten. Die Untersuchung der Inhaltsstoffe in den Fraktionen am Maximum im Mutagramm wurde mit den 30 Sekunden Fraktionen der HPLC-Trennung durchgeführt. Diese Verbindungen haben einen weitaus polareren Charakter und bedürfen einer Derivatisierung mit Diazomethan.

Die folgende Abbildung (Abbildung 62) zeigt die Chromatogramme aus der Untersuchung der mit Diazomethan derivatisierten Fraktion am Mutagramm-Maximum (26 Minuten) aus dem NIST SRM1649 Luftstaubextrakt. Die beiden Chromatogramme wurden mit einem Elektroneneinfangdetektor (ECD) und einem nachgeschalteten Flammen-ionisationsdetektor (FID) aufgenommen.

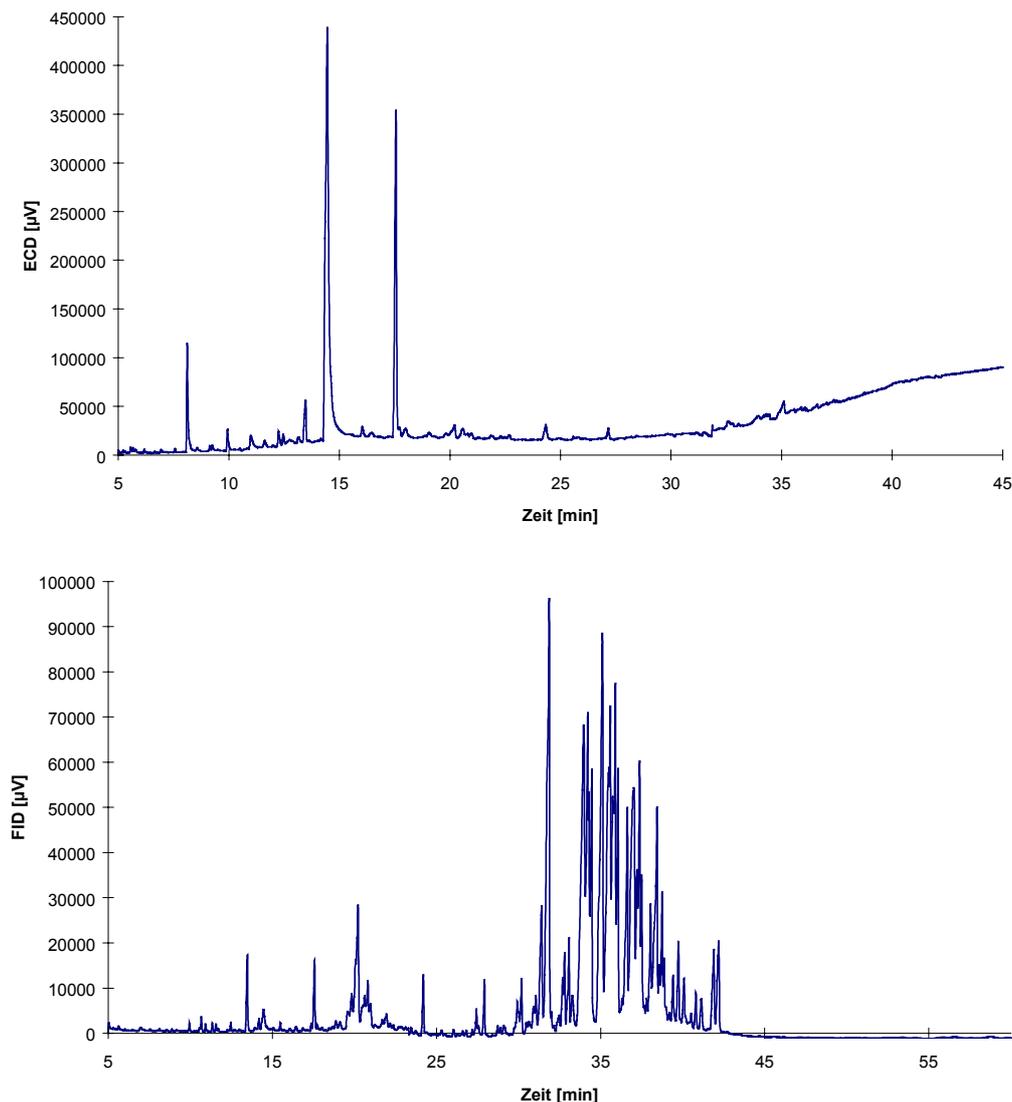


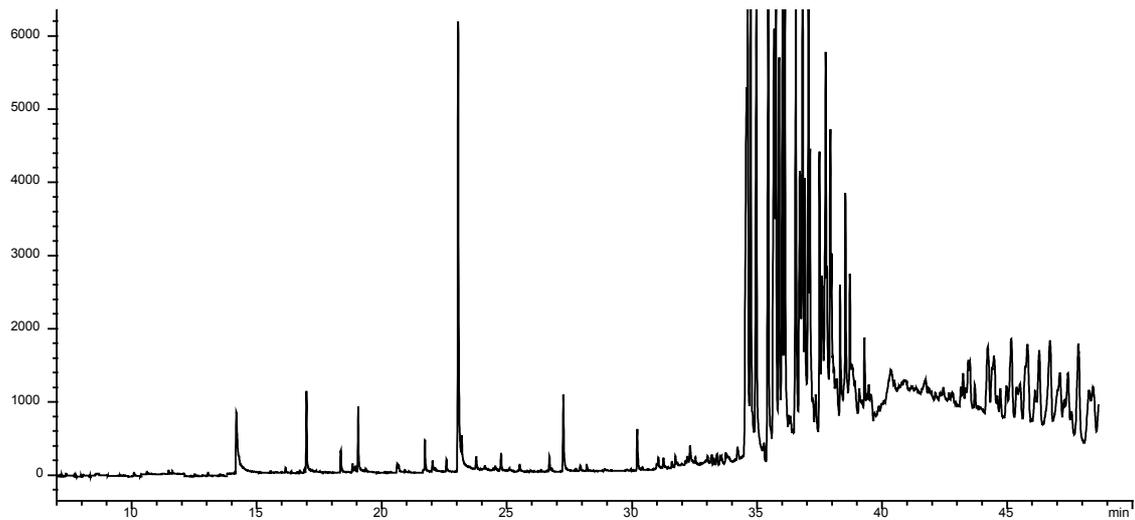
Abbildung 62: ECD-Chromatogramm (oben) und FID-Chromatogramm (unten) der NIST SRM1649 Fraktion bei 26 Minuten

Die beiden Chromatogramme liefern auf Grund der unterschiedlichen Detektionsmethoden einige Informationen über die Zusammensetzung der Fraktion. Die ECD-Detektion ist besonders empfindlich für halogenhaltige Verbindungen oder Verbindungen mit stark elektronegativen Gruppen, d.h. für funktionelle Gruppen mit einem hohen Einfangsquerschnitt für thermische Elektronen. Im ECD-Chromatogramm (Abbildung 62, oben) erscheinen wenige ausgeprägte Peaks, wohingegen das Chromatogramm bei FID-Detektion (Abbildung 62, unten) eine Vielzahl von Peaks enthält. Diese Beobachtung ist interessant, da bei der Trennung des Gesamtextraktes über die klassische Säulenchromatographie an Kieselgel in den mutagen wirksamsten Fraktionen halogenorganische Verbindungen nachweisbar waren. Die ECD- bzw. die FID-Chromatogramme enthalten neben der Retentionszeit keine weitere Information über die

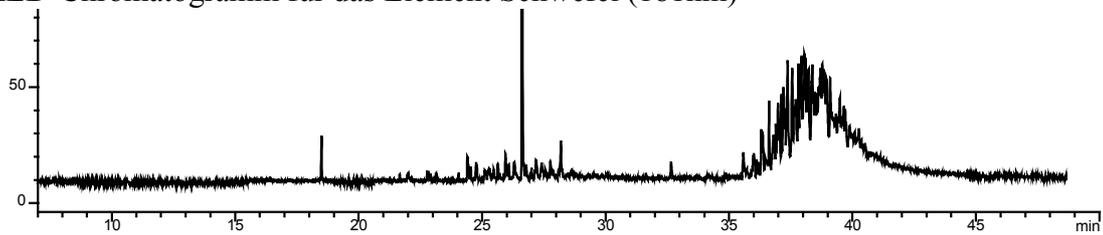
Identität der detektierten Peaks, so daß ein Einzelstoffnachweis nur über einen Vergleich der Retentionszeiten möglich wäre.

Über die Zusammenarbeit mit der Landesanstalt für Umweltschutz (LfU Karlsruhe) konnte die Fraktion am Maximum im Mutagramm mit einer GC/AED-Kopplung (Atomemissionsdetektion) untersucht werden. Die Atomemissionsdetektion gibt Informationen über einzelne chemische Elemente in der Probe, d.h. man erhält eine Aussage über die Summenformel der detektierten Verbindung. Bei einer AED-Detektion lassen sich Elemente wie z.B. Stickstoff, Sauerstoff, Kohlenstoff, Fluor, Chlor, Brom, Phosphor u.a. über ihre charakteristischen Emissionen bestimmen. Das Detektionsprinzip beruht auf der Anregung bestimmter elektronischer Energieniveaus der Elemente aus den von der chromatographischen Säule eluierten Verbindungen. Die Anregung erfolgt in einem Plasma, die Detektion erfolgt mit einer jeweils elementspezifischen Wellenlänge im UV/VIS-Spektralbereich.

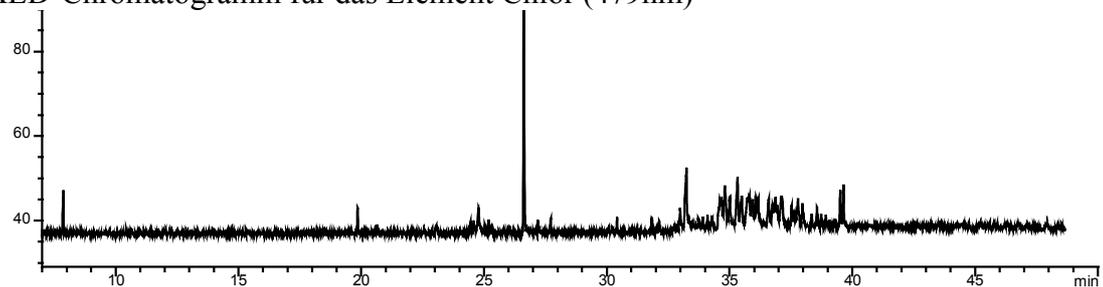
Die folgenden Chromatogramme (Abbildung 63) zeigen die einzelnen „Elementspuren“, d.h. Chromatogramme, in denen die Verteilung bestimmter Elemente über die Elutionszeit dargestellt ist. Es wurde, wie bei der GC/ECD bzw. bei der GC/FID Analyse, die HPLC-Fraktion des NIST SRM1649 Luftstaubextraktes untersucht, welche die höchste genotoxische Wirksamkeit aufwies. Die Retentionszeiten der FID/ECD-Chromatogramme lassen sich nicht direkt mit denen aus der AED-Detektion vergleichen, da bei dieser chromatographischen Trennung eine längere Trennsäule mit der gleichen Trennphase, (Kapillarsäule, HP-5MS 60m Länge, 0,25mm Durchmesser, 250µm Filmdicke) verwendet wurde. Die Elutionsreihenfolge hingegen bleibt auf Grund der identischen Trennphase zwischen den beiden Experimenten vergleichbar.



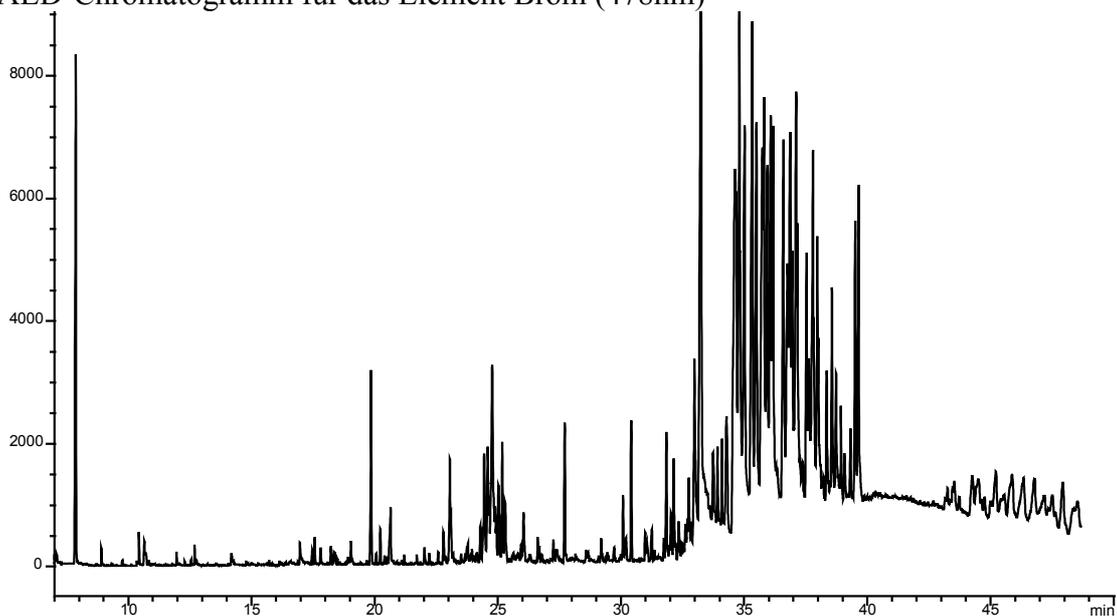
a.) AED-Chromatogramm für das Element Schwefel (181nm)



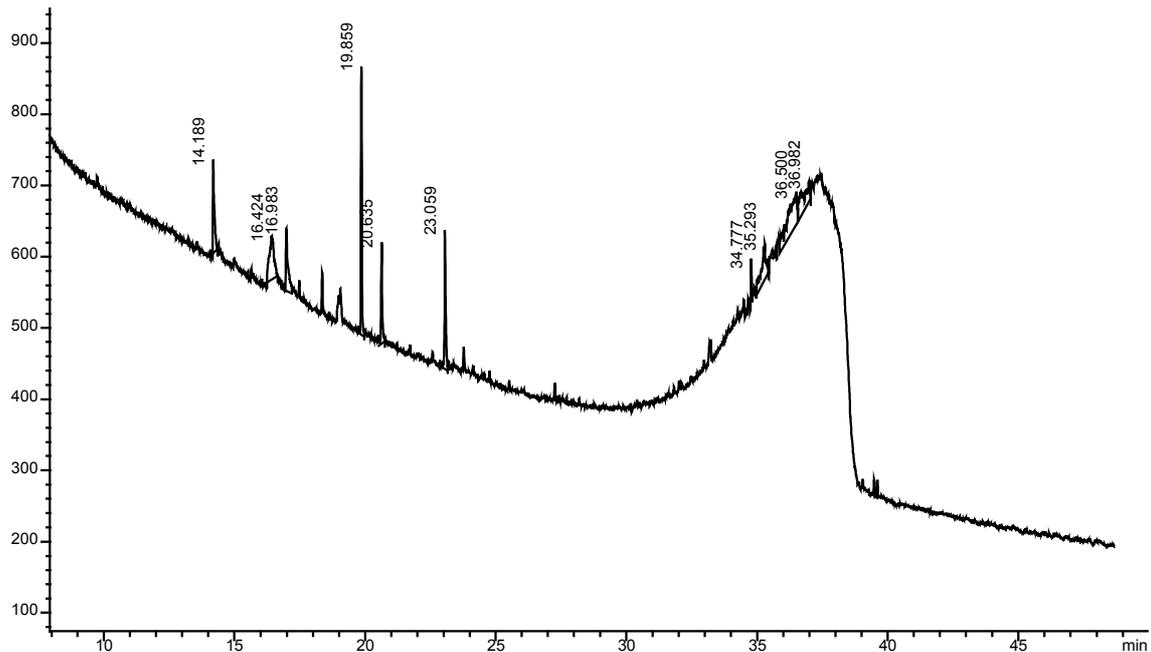
b.) AED-Chromatogramm für das Element Chlor (479nm)



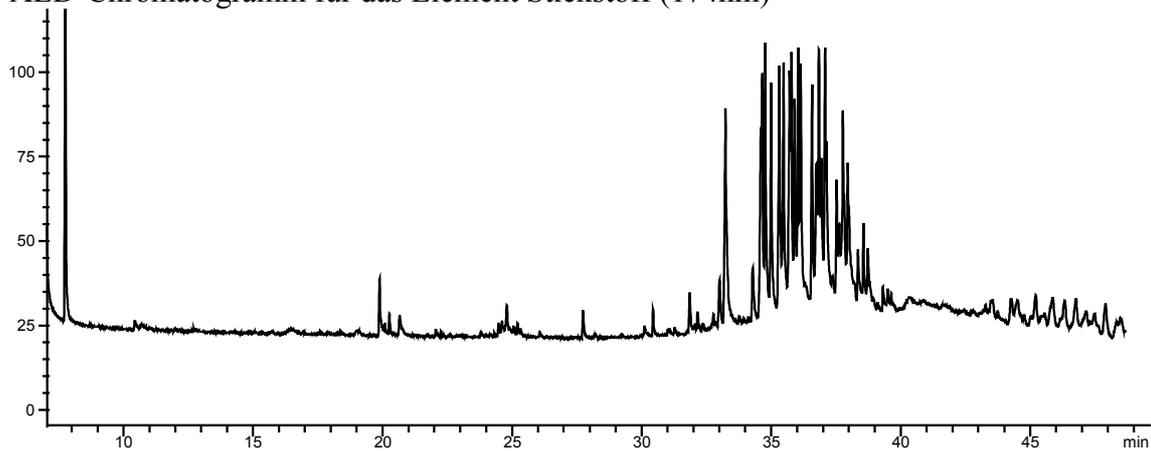
c.) AED-Chromatogramm für das Element Brom (478nm)



d.) AED-Chromatogramm für das Element Kohlenstoff (496nm)



e.) AED-Chromatogramm für das Element Stickstoff (174nm)



f.) AED-Chromatogramm für das Element Sauerstoff (777nm)

Abbildung 63: AED-Chromatogramme der bestimmten chemischen Elemente aus der HPLC-Fraktion bei 26 Minuten

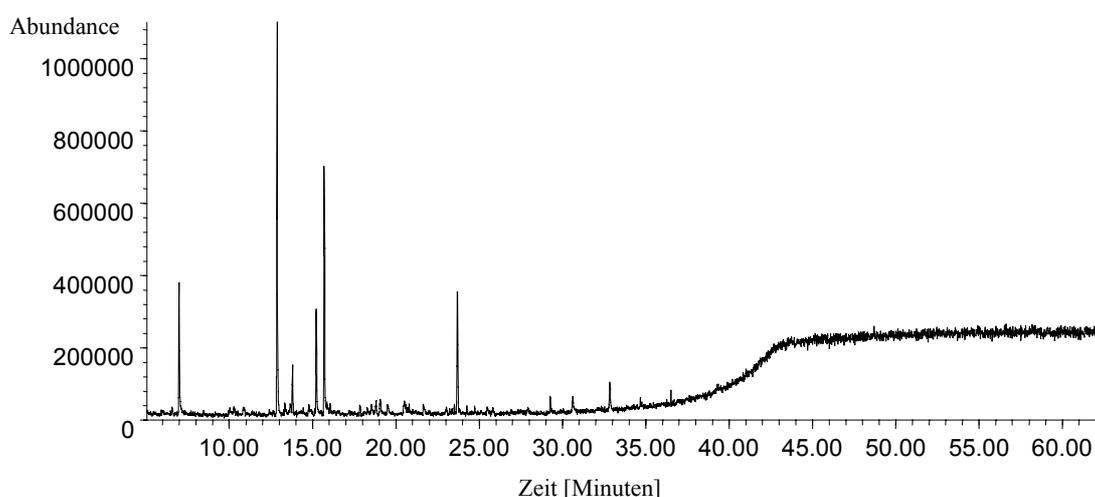
Für das Element Schwefel ist eine Vielzahl von Peaks erkennbar. Diese korrelieren mit den entsprechenden Peaks im „Kohlenstoffchromatogramm“ und sind ebenfalls in dem FID-Chromatogramm zu finden. Die untersuchte Fraktion enthält demnach einen Großteil an schwefelhaltigen Kohlenstoffverbindungen. Die Chromatogramme für die Elemente Brom und Chlor enthalten nur jeweils einen großen Peak, welcher dem zugesetzten internen Standard (Bromocyclen) entspricht. Es lassen sich kleine Peaks bis zu einer Retentionszeit von 30 Minuten erkennen, die auf Verbindungen mit Chlor oder Brom hinweisen. Dieses Ergebnis wird durch die Resultate der EOX-Bestimmungen aus den Luftstaubextrakten bestätigt. Die dichte Peakgruppierung bei einer Retentionszeit von 35-40 Minuten entspricht keinen halogenhaltigen Verbindungen, sondern wird durch Störungen aus der

Kohlenstoffemission hervorgerufen. Besonders deutlich wird dieser Effekt bei Stickstoffdetektion sichtbar. Hier steigt die Basislinie stark an und fällt danach wieder auf das vorhergehende Basisniveau ab. Trotz dieser Störung lassen sich jedoch einzelne Peak in der Stickstoffspur erkennen. Die analysierte Fraktion enthält daher auch stickstoffhaltige Verbindungen.

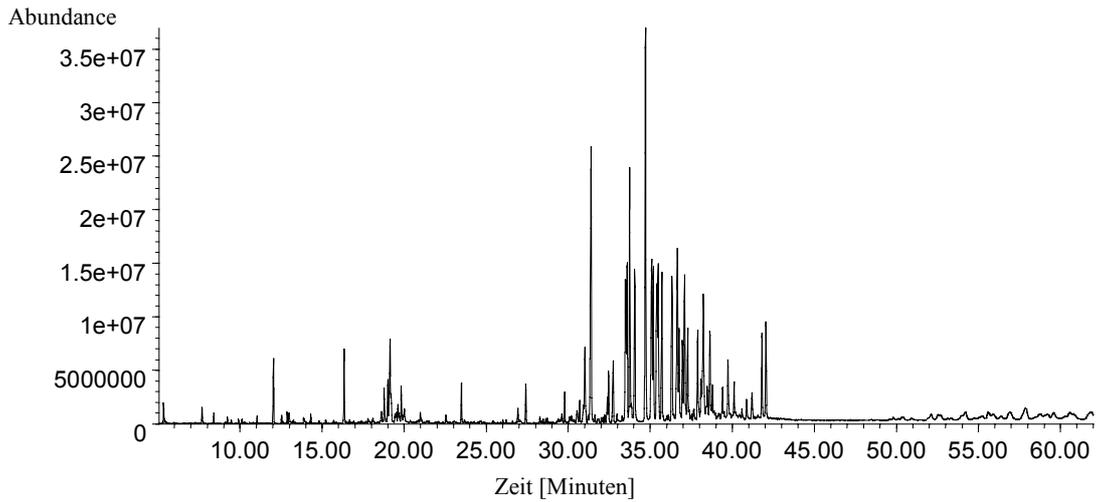
Das Chromatogramm der „Sauerstoffdetektion“ zeigt ein ähnliches Peakmuster wie die Kohlenstoff- oder Schwefelelementspur. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, daß es sich bei den detektierten Verbindungen um Kohlenstoffverbindungen handelt, die sowohl Schwefel als auch Sauerstoff als Heteroatome enthalten. Durch eine Kombination der Ergebnisse aus der Atomemissionsdetektion können als mögliche Substanzklassen, schwefelhaltige bzw. sauerstoffhaltige Heterozyklen, Sulfonsäurederivate oder Carbonsäurederivate angenommen werden, die in der mutagen wirksamsten Fraktion des Gesamtextraktes vorhanden sind.

Die Kenntnis der Elemente in der Fraktion ist jedoch nur ein weiterer Teilschritt in Richtung der Identifizierung der genotoxischen Verbindungen. Die Detektionsmethode der Wahl ist die Massenspektrometrie, die neben der Retentionszeit parallel ein Massenspektrum als stoffspezifische Information liefert. Die Fraktionen um das Maximum des Mutagrammes wurden hierzu gaschromatographisch aufgetrennt und die Peaks mittels Gaschromatographie und nachgeschaltetem massenselektiven Detektor (GC/MSD-Kopplung) analysiert.

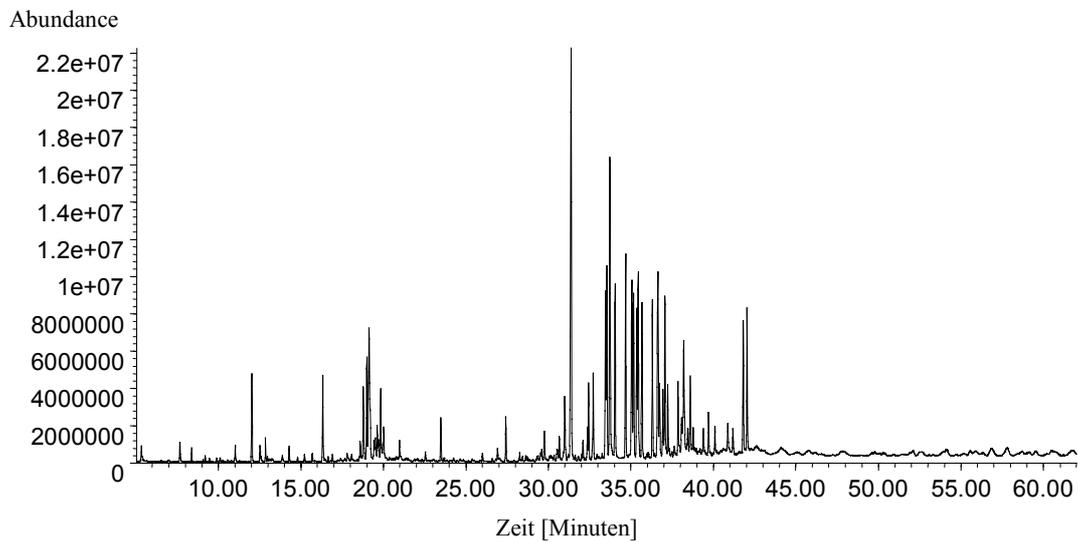
Die folgende Abbildung (Abbildung 64) zeigt die Chromatogramme der vier mit Diazomethan derivatisierten (methylierten) HPLC-Fractionen aus dem Bereich des Mutagrammes von 25,5 bis 27 Minuten.



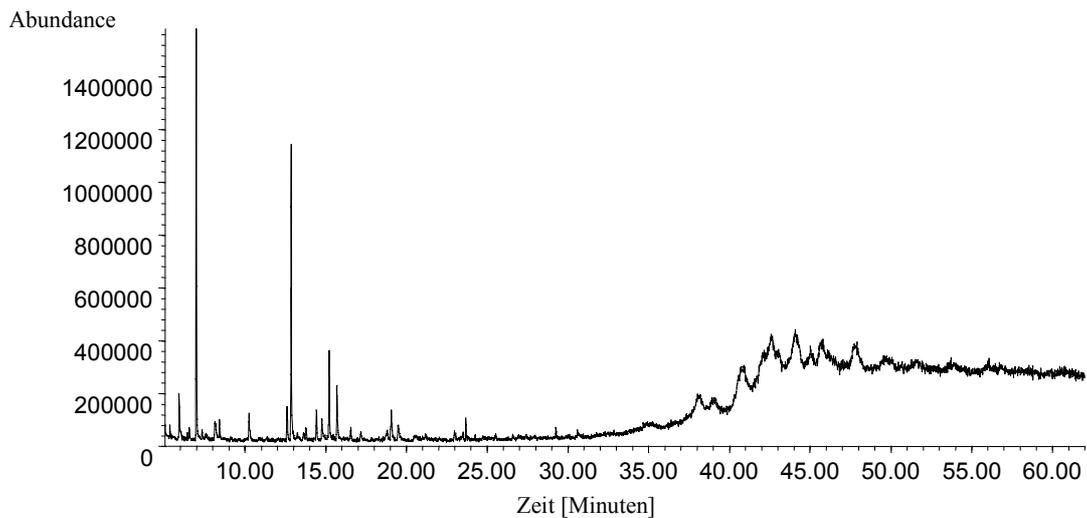
a.) Chromatogramm der HPLC-Fraktion bei 25,5 Minuten



b.) Chromatogramm der HPLC-Fraktion bei 26 Minuten



c.) Chromatogramm der HPLC-Fraktion bei 26,5 Minuten



d.) Chromatogramm der HPLC-Fraktion bei 27 Minuten

Abbildung 64: GC/MS Chromatogramme der HPLC-Fractionen von 25,5 bis 27 Minuten

Die Chromatogramme der verschiedenen Fraktionen aus dem Bereich vor und nach dem im Mutagramm auftretenden Maximum weisen deutliche Unterschiede auf. Vor allem wird klar, daß es sich auch bei den HPLC-Fractionen keinesfalls um Einzelverbindungen handelt, sondern daß sich unter den Peaks eine Vielzahl von Verbindungen verbirgt, die einzeln oder gemeinsam Träger der Aktivität sein können. Zur näheren Charakterisierung sind massenspektrometrische Daten aus den gleichen Proben notwendig, da nur mit dieser Methode direkt Einzelverbindungen aus der mutagenen Fraktion identifiziert werden können.

Die nachstehende Abbildung 65 zeigt beispielhaft die Identifizierung einer Verbindung anhand ihres Massenspektrums aus dem Chromatogramm der mutagen wirksamsten Fraktion.

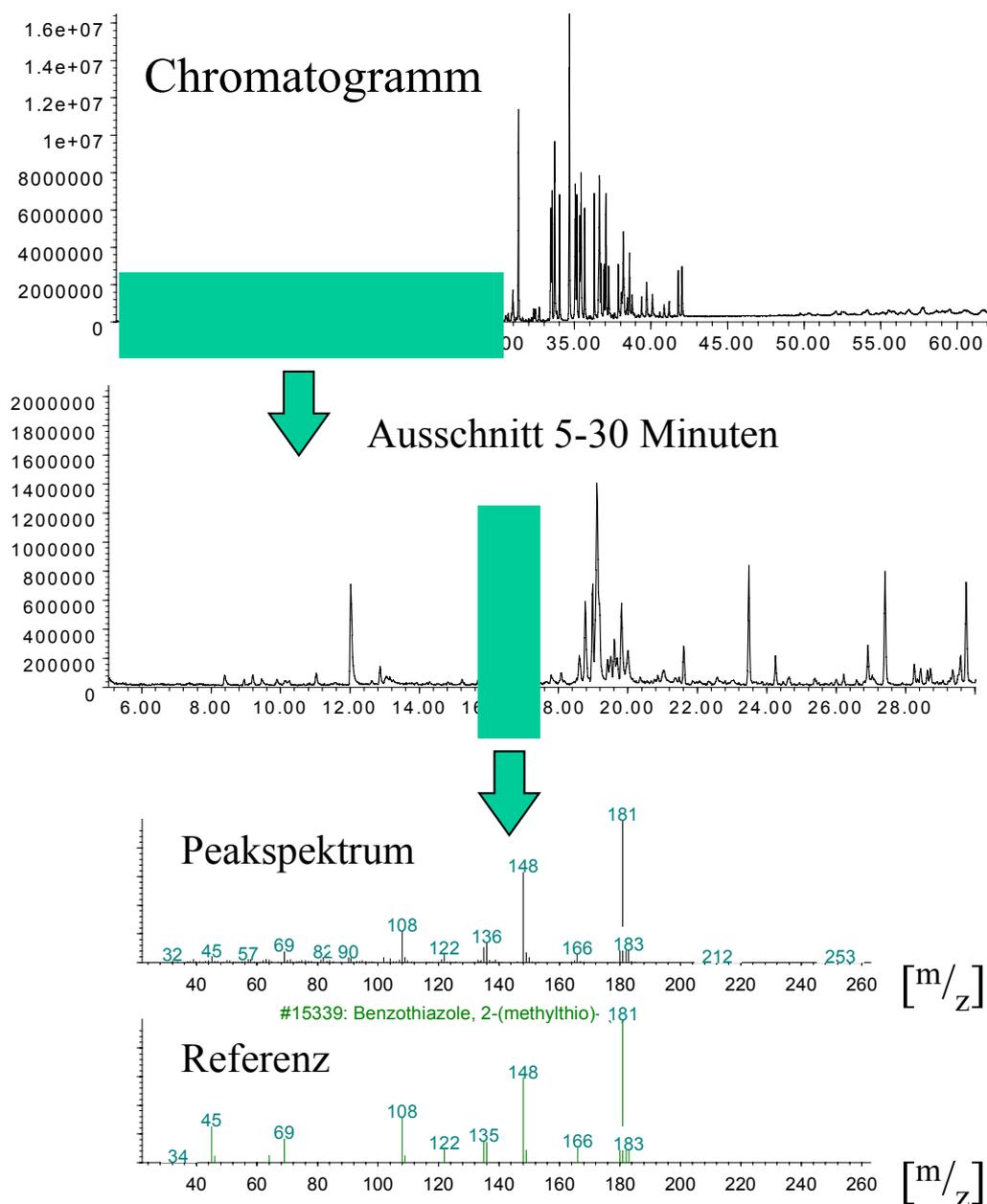


Abbildung 65: Identifizierung einer Einzelverbindung anhand ihres Massenspektrums

Einige der identifizierbaren Verbindungen sind in allen Fraktionen enthalten und lassen sich als Weichmacher (Phthalate) oder als Edukte aus der Methylierung mit Diazomethan (Benzosulfonsäuremethylester) identifizieren. Die mutagen wirksamste Fraktion enthält jedoch im Vergleich zu den anderen zusätzliche Peaks, die daher von besonderem Interesse sind. Auf die in Abbildung 65 dargestellte Weise konnten weitere Verbindungen aus der mutagen wirksamsten HPLC-Fraktion bei 26 Minuten identifiziert werden. In der nachfolgend dargestellten Tabelle (Tabelle 34) sind der Substanzname, die Retentionszeit des Peak im GC/MS-Chromatogramm, die Übereinstimmung mit dem Referenzspektrum (Match in %) sowie die Molmasse mit Summenformel aufgeführt.

SUBSTANZNAME	RETENTIONSZEIT [min]	MATCH [%]	MOLMASSE [g/mol]
Carbamodithioic acid, diethyl-, methyl ester	11,0	91	163 (C ₆ H ₁₃ NS ₂)
1H-Isoindole-1,3(2H)-dione, 2-methyl	12,0	64	161 (C ₉ H ₇ NO ₂)
Benzothiazole, 2-(methylthio)-	16,3	97	181 (C ₈ H ₇ NS ₂)
Phenol, nonyl-	18,6	58	220 (C ₁₅ H ₂₄ O)
Naphthalene, 1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-	19,1	72	198 (C ₁₅ H ₁₈)
2(3H)-Benzothiazolethione, 3-methyl-	22,5	94	181 (C ₈ H ₇ NS ₂)
Hexadecanoic acid, methyl ester	23,5	97	270 (C ₁₇ H ₃₄ O ₂)
11-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	26,9	99	296 (C ₁₉ H ₃₆ O ₂)
Octadecanoic acid, methyl ester	27,4	94	298 (C ₁₉ H ₃₈ O ₂)
Cyclohexanecarboxylic acid, 1,3-dimethyl-2-[2-[3-(1-methylethyl)phenyl]ethyl]-, methyl ester, (1.alpha.,2.alpha.,3.alpha.)-	28,2	97	316 (C ₂₁ H ₃₂ O ₂)
1-Phenanthrenecarboxylic acid, 7-ethenyl-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,10,10a-dodecahydro-1,4a,7-trimethyl-, methyl ester, [1R-(1.alpha.,4a.beta.,4b.alpha.,7.alpha.,10a.alpha.)]-, dihydro deriv.	29,8	91	318 (C ₂₁ H ₃₄ O ₂)
1-Phenanthrenecarboxylic acid, 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydro-1,4a-dimethyl-7-(1-methylethyl)-, [1R-(1.alpha.,4a.beta.,10a.alpha.)]-	31,4	98	300 (C ₂₀ H ₂₈ O ₂)
1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	34,7	53	390 (C ₂₄ H ₃₈ O ₄)

Tabelle 34: Identifizierte Substanzen in der mutagen wirksamsten Fraktion

Neben den Peaks im Chromatogramm, denen eine Verbindung zugeordnet werden konnte, existieren noch einige Peaks, deren Massenspektren keine Entsprechung in der Spektrenbibliothek haben. So kann der Peakgruppe, die in der Zeit zwischen 35 und 40 Minuten im Chromatogramm erscheint, den einzelnen Peaks über ihr Massenspektrum keine befriedigende Struktur zugeordnet werden. In diesem Bereich zeigen die AED-Chromatogramme für die Elemente Schwefel und Sauerstoff ebenfalls Peaks. Die Massenspektren dieser Peaks zeigen alle das Fragment 94 als Fragment mit der höchsten

Intensität. Vermutlich treten Diskriminierungen während der Injektion, der Trennung auf der Säule oder der Detektion auf.

Die in der Tabelle aufgeführten Verbindungen sind nicht notwendigerweise alleine die Träger der mutagenen Aktivität. Für die Carbonsäureester ist beispielsweise bekannt, daß sie im Ames-Test keine Effekte zeigen. Bei anderen Verbindungen wie den Benzothiazolen steht die entsprechende Untersuchung im Ames-Test noch aus.

Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analysen bestätigen die aus den Extraktionsversuchen gewonnenen Vorkenntnisse. Die Hauptträger der Mutagenität sind polare Verbindungen. Die Resultate der Flüssig/Flüssig-Extraktionen ergeben als Information, daß ein Großteil der mutagenen Verbindungen saure Eigenschaften besitzt. Als funktionelle Gruppen sind für diese Substanzklasse unter anderen aktivierte, saure Hydroxylgruppen wie Hydroxyketone, Carboxylgruppen und Sulfoxidgruppen möglich. Verbindungen mit diesen funktionellen Gruppen lassen sich in underivatisierter Form nur schwer verdampfen und somit gaschromatographisch trennen bzw. massenspektrometrisch identifizieren. Durch die Hydroxylgruppen wird eine infrarotspektroskopische Untersuchung ebenfalls erschwert, zumal eine Identifizierung einer unbekanntem Verbindung über ihr Infrarotspektrum in komplexen Mischungen selbst mit großen Spektrenbibliotheken fast unmöglich ist.

Zusammenfassend können über den direkten Vergleich der Chromatogramme und der qualitativen Analyse der verschiedenen Luftstaubextrakten und ihrer Fraktionen die folgenden Schlußfolgerungen abgeleitet werden.

- Die atmosphärische Luftstaubextrakte weisen die höchsten EOM Massenanteile in den Fraktionen der sauren Verbindungen bzw. der neutralen Verbindungen auf.
- Unpolare Verbindungen wie z.B. PAK oder nitro-PAK können nicht die Hauptträger der Mutagenität in atmosphärischen Luftstaubextrakten sein.
- Die Fraktion der „starken Säuren“ enthält hauptsächlich aliphatische und aromatische Oxyverbindungen.
- Das in Washington DC gewonnene Standardmaterial NIST SRM1649 weist eine vergleichbare Zusammensetzung auf wie die Staubproben aus Baden-Württemberg. Die Hauptemittenten oder die atmosphärischen Transformationsprozesse sind demnach ortsunabhängig.
- Die direkten Industrieemissionen zeigen eine von den atmosphärischen Luftstaubextrakten unterschiedliche Zusammensetzung, die durch den jeweiligen Emittenten bestimmt wird.

6 Diskussion

Die Beurteilung des Gesundheitsrisikos für den Menschen, das von partikelgebundenen Schadstoffen auf Grund ihrer genotoxischen Aktivität ausgeht, gestaltet sich schwierig. Eine Arbeitsgruppe in den USA um J. Lewtas und D. M. DeMarini hat einige Studien zu dieser Thematik publiziert^{78, 79, 80}. In ihren Arbeiten wurden Luftstaubextrakte aus unterschiedlichen Emissionsquellen in verschiedenen biologischen Testsystemen untersucht. Ein Ergebnis dieser Studien war die Risikobewertung von organischen Luftextrakten aus unterschiedlichen Emissionsquellen in der folgenden Abstufung: Kokereiabgas > Aluminiumhüttenabgas > Urbane Atmosphärenluft > Dieselabgas > Tabakrauch. Eine vergleichbare Reihenfolge ergibt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit sowie den Resultaten des Gesamtprojektes⁸.

Die stoffliche Zusammensetzung von organischen Luftstaubextrakten sowie deren Genotoxizität werden durch eine Vielfalt von Faktoren bestimmt. Die Partikelgröße des Probematerials spielt hierbei eine wesentliche Rolle. Betrachtet man die Verteilung verschiedener Leitsubstanzen⁸¹ oder repräsentativer Stoffgruppen z.B. PAK⁸² über die Partikelgröße, zeigt sich ein Konzentrationsmaximum für einen bestimmten Partikeldurchmesser. Atmosphärische Luftstäube ergeben für die Substanzklasse der PAK beispielsweise ein Konzentrationsmaximum bei Partikelgrößen kleiner 1µm. Dieser Größenbereich ist humantoxikologisch relevant, da diese Partikelgrößen bis in die Alveolen der Lunge gelangen können. Diese Partikel tragen die höchste organische Beladung und zeichnen für etwa 70% der genotoxischen Aktivität von organischen Luftstaubextrakten verantwortlich^{83, 84}. Die Staubproben im Rahmen dieser Arbeit enthalten Partikel in einem Durchmesser zwischen 10 und 0,5µm und erfassen somit die toxikologisch bzw. genotoxisch bedeutsamen Partikeldurchmesser⁸⁵. Allgemein werden Luftstäube mit einem Durchmesser kleiner 2,5µm (PM_{2,5}) als humantoxikologisch bedeutsam bewertet und sind auf Grund dieser Relevanz in den USA über einen Grenzwert gesetzlich limitiert⁸⁶.

Für Untersuchungen, die mit Luftstäuben bzw. organischen Extrakten aus Luftstäuben durchgeführt werden, gibt es keine genormten Verfahren zur Bestimmung der Genotoxizität. Ein internationaler Ringversuch mit NIST SRM1649 als Probematerial zeigte, daß die Untersuchung des gleichen Luftstaubes mit Hilfe des Ames-Tests in unterschiedlichen Labors zu signifikant unterschiedlichen Ergebnissen führen kann⁸⁷. Dennoch stellt der Ames-Test ein geeignetes Mittel zur Abschätzung ökotoxikologischer und humantoxikologischer Risiken dar. Aus den Ames-Test Ergebnissen der biologischen Routineuntersuchungen des

Gesamtprojektes über die Dauer von 4 Jahren wurde ein Datenstamm gewonnen, der die Reproduzierbarkeit und Stabilität des Ames-Test untermauert. Auf dieser Basis wurde der Ames-Test als „Indikator“ für die genotoxische Aktivität organischer Luftstaubextrakte im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

Organische Luftstaubextrakte sind neben den in In-vitro auch in In-vivo-Testsystemen aktiv. Es konnte gezeigt werden, daß durch die in den Extrakten von Luftstäuben enthaltenen organischen Verbindungen in-vivo Addukte induziert werden⁸⁸. Die meisten der durchgeführten Untersuchungen zur Wirkung organischer Extrakte partikelgebundener Luftschadstoffe stammen jedoch aus in-vitro-Experimenten, d.h. es wurden zur Detektion der spezifischen Schäden Bakterien oder Zellkulturen verwendet.

Die „neuen“ Ames-Teststämme (Ames II TA700X) zur Detektion spezifischer Basenaustauschmutationen könnten zu dieser Fragestellung einen neuen Ansatz darstellen. Die untersuchten Luftstaubextrakte sowie deren Fraktionen zeigen die größte Aktivität in den Teststämmen TA7002 und TA7005. Die Inhaltsstoffe induzieren somit bevorzugt Basenaustauschmutationen von T*A -> A*T für den Stamm TA7002 und C*G -> A*T für den Stamm TA7005. Aromatische Nitroverbindungen beispielsweise bilden DNA-Addukte an Guanin (C8, N², O⁶) und Adenin (C8, O⁶) mit dem Hauptaddukt C8-deoxyguanosin-arylamino. Die Adduktbildung an der DNA ist jedoch nur der Beginn einer Mutation und auch nur eine mögliche Ursache für eine Mutation. Mit den neuen Ames II-Teststämmen werden die erfolgten Basenpaarsubstitutionen detektiert. Inwieweit die bevorzugten Reversionen in den Teststämmen TA7002 und TA7005 von den chemischen Mutagenen in den Luftstaubextrakten oder von der Sensitivität der Teststämmen abhängig ist, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Hierbei kann die postlabeling Methode wertvolle Daten beisteuern.

Mit der ³²P-postlabeling Methode nach Randerath kann die Veränderung des Erbgutes durch DNA-Adduktbildung direkt bestimmt und quantifiziert werden. Innerhalb dieser Arbeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Dr. Schmeiser (DKFZ Heidelberg) wurde versucht eine direkte Korrelation zwischen dem Ames-Test und der ³²P-postlabeling Methode darzustellen. Über die Inkubation von Ames-Test Bakterien mit organischen Luftstaubextrakten und anschließender Durchführung beider Testverfahren sollten die im Ames-Test genotoxisch wirksamen Mutagene als DNA-Addukte mit der ³²P-postlabeling Methode nachgewiesen und identifiziert werden. Auf Grund von systematischen Problemen beim direkten Nachweis von DNA-Addukten in der Bakterien-DNA konnten für das Postlabeling-Verfahren keine

auswertbaren Ergebnisse erhalten werden. Entscheidende Hindernisse waren die niedrigere Konzentration an EOM in den Ansätzen mit Ames-Test Bakterien (40 µg/ml in Inkubationen mit Salmonellenzellen; vergleichsweise 167 µg/ml in Inkubationen mit reiner Kalbsthymus-DNA) und die erschwerte Aufnahme der genotoxischen Verbindungen durch die Membran in die Bakterienzelle sowie zusätzliche Proteinadduktierung.

Über die Adduktierung von freier Kalbsthymus-DNA durch Inkubation mit Luftstaubextrakten konnten in-vitro DNA-Addukte erhalten werden. Alle ³²P-postlabeling Analysen mit Luftstaubextrakten enthielten eine diagonale, radioaktive Zone (DRZ), wie sie für komplexe Schadstoffgemische aus Zigarettenrauch-Kondensat⁸⁹, Dieselruß-⁹⁰ oder Luftstaubextrakten aus Eisenhütten⁹¹ bekannt sind. Die Anwendung dieses Verfahren mit den Luftstaubfraktionen als Probematerial zeigte, daß die Inhaltsstoffe der polaren Fraktionen der Luftschadstoffextrakte die Wirkungsträger sind. Die Untersuchungen mit Referenzsubstanzen und Einzelverbindungen wie verschiedene PAK und nitro-PAK⁹² und dem 3-Nitrobenzanthron⁹³ zeigen im postlabeling Verfahren die gleichen Adduktmuster wie sie auch bei der Untersuchung der Luftstaubextrakten auftreten. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, daß organische Extrakte partikelgebundener Stoffe genotoxische Wirkung aufweisen⁹⁴, wobei der Ansatz im Rahmen dieser Arbeit eine direkte Verbindung zwischen einem Bakterienzelltest und der direkten DNA-Schädigung herzustellen ein Novum darstellt. Die Resultate aus den Versuchen mit den verschiedenen Testsystemen deuten darauf hin, daß es sich bei den beobachteten Effekten nicht um die Wirkung einer einzelnen Substanz handeln kann.

6.1 Extraktion

Die Ergebnisse der vorgestellten Extraktionsversuche zeigen, daß schon die Wahl des Extraktionsmittels einen entscheidenden Einfluß auf die Masse des extrahierbaren Anteils und die genotoxische Aktivität des Extraktes besitzt. In der Literatur finden sich nur wenige Arbeiten, die sich systematisch diesem Thema widmen⁹⁵. Die umfangreichste Studie stammt aus dem Jahr 1983 und wurde von G. Krishna et al. publiziert⁹⁶. Das Resultat dieser Studie entspricht dem Ergebnis dieser Arbeit und ergab ebenfalls Aceton als das Extraktionsmittel mit der höchsten Ausbeute. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte auch den Einfluß des Extraktionsverfahrens auf die detektierbare Genotoxizität im Ames-Test, wobei die Schüttel-, die Ultraschall- und die Soxhletextraktion untereinander verglichen wurden⁹⁷. Die Ergebnisse zeigen nur geringe Unterschiede in der detektierbaren Genotoxizität im Ames-Test, so daß aus Gründen der praktischen Durchführung die Soxhletextraktion für die Probeaufarbeitung der Luftproben im Rahmen dieser Arbeit und des Gesamtprojektes ausgewählt wurde.

Die unterschiedlich polaren Lösungsmittel sind eine bestimmende Größe bei der Mutagenität von Luftstaubextrakten. Es läßt sich eine Beziehung zwischen Polarität des Lösungsmittels und der biologischen Antwort im Ames-Test darstellen. Die unpolarsten Lösemittel wie n-Hexan und Cyclohexan zeigen die geringste mutagene Aktivität, weil die Lösekraft der unpolaren Lösungsmittel nicht ausreicht, um ausreichende Mengen der aktiven Substanzen von der Oberfläche der Staubpartikel zu lösen. Im Gegensatz ist das Wasser nicht in der Lage die hydrophobe Schicht auf der Partikeloberfläche zu durchdringen und die organischen Substanzen zu lösen. Die mittelpolaren Lösemittel wie Aceton oder Dichlormethan zeigen die höchste Extraktionsausbeute, da sie ein ausreichendes Lösungsvermögen für die aktiven Substanzen besitzen und in der Lage sind die hydrophobe Oberflächenschicht aufzulösen⁹⁸. Diese Mikrostruktur der Luftstäube, bestehend aus einem anorganischen Trägerpartikel und einer organischen Schicht adsorbierter Substanz, ist einer Mizelle in einer Emulsion vergleichbar. Die polaren Gruppen haften am Partikel, die unpolaren Kohlenstoffketten bzw. -gruppen ragen nach außen und hydrophobieren die Partikeloberfläche.

Eine einfache Art der Fraktionierung basierend auf der Polarität wurde schon im Zusammenhang mit der Validierung der Extraktionsmethode angewandt. Durch die sequentielle Extraktion mit n-Hexan, Aceton und Methanol des gleichen Luftstaubes wurden unterschiedliche Mutagenitätsraten für die Extrakte erhalten. Der n-Hexan Extrakt zeigte die kleinste mutagene Aktivität. Bei der Durchführung des Ames-Tests mit S9-Mix ergibt der

Extrakt von n-Hexan jedoch im Vergleich zu Aceton und Methanol als einziger eine höhere Mutagenität. Dies kann über den Anteil an polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) im Extrakt erklärt werden. Die PAK stellen eine unpolare Verbindungsklasse dar, die im Ames-Test nur mit metabolischer Aktivierung Revertanten induziert. Durch das unpolare n-Hexan werden demnach zuerst die unpolaren Verbindungen aus dem Luftstaubmaterial extrahiert, die ein geringes bzw. ein indirektes mutagenes Potential aufweisen. Die GC/MS-Analyse dieses Extraktes von n-Hexan bestätigt diese Erklärung. So können durch diese simple Trennung die unpolaren Kohlenwasserstoffe (Aliphaten) und die in der Literatur oft diskutierten PAK als die Träger der mutagenen Aktivität ausgeschlossen werden. Nach dem gleichen Prinzip arbeiteten Dehnen et al. zur Trennung der methanolischen Luftstaubextrakte in ihrer Studie⁹⁹. Sie verwendeten die zwei nicht mischbare Lösungsmittel Cyclohexan und Methanol zur Fraktionierung der Extrakte. Die Stoffgruppe der PAK konnte ebenfalls der unpolaren Cyclohexanphase zuordnet werden.

Eine neue Studie durch De Martinis et al. untersuchte PM10 Luftstaubextrakte aus Sao Paulo (Brasilien) mittels sequentieller Extraktion mit Dichlormethan und Aceton als Extraktionsmittel¹⁰⁰. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen ergaben eine Extraktionsausbeute von 20,3% für Dichlormethan und nachfolgend 10,2% für Aceton in Bezug auf die Gesamtmasse. Im Ames-Test für den Stamm TA98 weisen die beiden Extrakte ein unterschiedliches Verhalten bei der Zugabe der metabolische Aktivierung (S9-Mix) auf. Die Genotoxizität des Dichlormethanextraktes wird durch das metabolische Enzymsystem erhöht. Im Gegensatz hierzu verringert sich die genotoxische Aktivität des acetonischen Extraktes bei der Zugabe des S9-Mix. Die biologischen Testergebnisse des Ames-Tests stimmen mit den Befunden im Rahmen dieser Arbeit überein. Auch die identifizierten Stoffgruppen innerhalb der Extrakte decken sich mit den vorgestellten Ergebnissen. Die mutagen aktivste, acetonische Fraktion der brasilianischen Luftstaubproben erhielt Ketone, Aldehyde und Carbonsäuren. Diese Stoffgruppen konnten auch im Rahmen dieser Arbeit in der mutagenen Fraktion nachgewiesen werden.

6.2 Fraktionierung

Die organischen Extrakte von Luftstaubpartikeln sind ein komplexes Vielstoffgemisch aus Verbindungen unterschiedlicher Stoffgruppen und Polarität. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden angewandt, um das Probematerial „Luftstaubextrakt“ in definierte Fraktionen zu trennen.

Die flüssig/flüssig Extraktion von atmosphärischen Luftstaubextrakten, basierend auf den Säure/Base-Eigenschaften der Inhaltsstoffe, ergibt ein Maximum der mutagenen Aktivität für die saure Fraktion, gefolgt von der Fraktion der neutralen Verbindungen im Verhältnis 2:1. Auch bei anderen in der Literatur beschriebenen Untersuchungen ist dieses Verteilungsmuster zu finden, wie z.B. aus Berlin¹⁰¹, aus Kanada¹⁰² sowie aus Italien¹⁰³.

Die Untersuchung der Säure/Base-Fraktionen mit der ³²P-postlabeling Methode ergibt ein weniger eindeutiges Muster. Zwar zeigt auch hier die saure Fraktion die höchste Aktivität, jedoch weisen die restlichen drei Fraktionen ebenfalls ähnliche DNA-Adduktraten auf. Der Unterschied zu den Ergebnissen des Ames-Testes liegt in der Natur des jeweiligen Testsystemes begründet. Während die ³²P-postlabeling Methode die Adduktierung der DNA, d.h. eine Primärschädigung des Erbgutes anzeigt, weist der Ames-Test eine erfolgreiche Reversion in einem bestimmten Operon nach.

In diesem Kontext ergibt die Verwendung der „neuen“ Ames II Teststämme TA700X ein interessantes Verteilungsmuster für das genotoxische Potential der Fraktionen. Die saure, die neutrale Fraktion und der Vollextrakt zeigen bis auf den Stamm TA7001 immer die gleiche Rangfolge. Im Stamm TA7001 zeigt die Fraktion der sauren Verbindungen die höchste mutagene Aktivität. Eine vollständige Erklärung dieser Beobachtung kann mit der derzeitigen Datengrundlage nicht abgegeben werden. Eine Studie von DeMarini et al. über die Mutation in Ames-Testbakterien durch Luftstaubextrakte zeigt, daß PAK und auch komplexe atmosphärische Luftstaubextrakte bevorzugt G*C -> T*A Basenaustauschmutationen induzieren¹⁰⁴. Die für die saure Fraktion im Stamm TA7001 detektierten A*T -> G*C Basenaustauschmutationen lassen somit die Schlußfolgerung zu, daß die Aktivität nicht durch PAK entsteht. Die durchgeführten gaschromatographischen Analysen der Fraktionen bestätigen diese Aussage.

Der Vergleich der Mutagenitätsverteilung über die 4 Säure/Base-Fraktionen zwischen den atmosphärischen Luftstaubextrakten und den Staubextrakten der Kokereiabgasemissionen aus

Kosice verdeutlicht ebenfalls, daß die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe nicht die Träger der mutagenen Aktivität in atmosphärischen Luftstaubextrakten sein können. Die Industrieabgasextrakte bestehen zum größten Teil aus PAK bzw. PAK-Derivaten, durchschnittlich etwa 80% Massenanteil EOM und zeigen ein deutlich geringeres genotoxisches Potential.

Die Versuche mit Dieselrußextrakten ergeben ebenfalls eine geringere mutagene Aktivität über alle Fraktionen im Vergleich zu den atmosphärischen Luftstäuben. Der Vergleich der Ergebnisse der flüssig/flüssig Extraktion von atmosphärischen Luftstaubextrakten zeigt, daß sowohl bei den Luftstäuben aus Baden-Württemberg wie auch bei den untersuchten Referenzstäuben der Großteil der mutagenen Aktivität in den polaren bzw. sauren Fraktionen zu finden ist; unabhängig von der Jahreszeit und damit vom Oxidationsvermögen in der Atmosphäre. Lediglich in der Höhe der biologischen Aktivität lassen sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Jahreszeiten eines Probenahmestandortes feststellen.

Weiterhin verringert die Zugabe eines metabolischen Enzymsystemes (S9-Mix) die Genotoxizität der atmosphärischen Luftstaubextrakte um etwa 20-25%. Diese Beobachtung wird durch andere Arbeitsgruppen bestätigt, die von einer bis zu 30%igen Abnahme berichten¹⁰⁰. Diese Ergebnisse können als Hinweis gewertet werden, daß atmosphärische Transformationsprozesse zu einer Veränderung der primär emittierten Stoffe beitragen und das genotoxische Potential der Luftstäube verändern.

Die Trennleistung der flüssig/flüssig Extraktion ist eingeschränkt und liefert nur eine grobe Aufteilung in wenige Fraktionen. Weiterhin besteht die Gefahr der Bildung von Artefakten durch mögliche Reaktionen mit den verwendeten Säuren bzw. Laugen. Eine feinere Auftrennung des Extrakte bietet die offene Säulenchromatographie. Eine Trennung über die klassische Säulenchromatographie wurde in der ersten Phase des Forschungsprojektes mit den baden-württembergischen Luftstaubextrakten sowie dem Referenzmaterial NIST SRM1648 an Kieselgelmaterial durchgeführt¹⁰⁵. Die Extrakte wurden über unterschiedliche Elutionsmittel steigender Polarität in sieben Fraktionen getrennt. Die polare 6. Fraktion zeigte im Ames-Test die höchste Mutagenität sowie den höchsten EOX-Gehalt. Die mutagen aktivste Fraktion aus der präparativen HPLC-Trennung weist entsprechend im AED-Chromatogramm für Chlor und Brom Peaks auf. Mittels GC/MS konnte in der sauren Fraktion die Verbindung Dichlorophen (2,2'-Methylen-bis-4-chlorphenol, C₁₃H₁₀O₂Cl₂, CAS No. 97-23-4) und diverse Methylderivate nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der frühen

Untersuchungen konnten somit im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden und Einzelverbindungen identifiziert werden.

Die Normalphasenchromatographie an Kieselgel hat jedoch einige analytische Nachteile. Der Wassergehalt der Elutionsmittel und des Säulenmaterials beeinflusst die Aktivität des Trennmaterials und erschwert die Reproduzierbarkeit der chromatographischen Trennung. Weiterhin zeigen die komplex zusammengesetzten Luftstaubextrakte irreversible Absorptionseffekte an dem Kieselgelmaterial. Diese Nachteile wurden durch die Verwendung einer modifizierten Kieselgelphase unter Einsatz der HPLC-Technik weitgehend ausgeschlossen.

Die semi-präparative HPLC-Methode zur Fraktionierung der Luftstaubextrakte unterliegt in der Anwendung im Rahmen der bioassay directed fractionation“-Strategie den bereits erläuterten Einschränkungen. Mit der vorgestellten Methode zur Fraktionierung der Luftstaubextrakte mittels nicht-wässriger Gelpermeationschromatographie (GPC) konnten keine reproduzierbaren Ames-Testergebnisse erhalten werden. Das Anwendungsgebiet der GPC ist auf Grund der beobachteten Trennleistung und der Bakterientoxizität des Eluats auf eine Vortrennstufenmethode beschränkt. In der Literatur sind einige Arbeiten publiziert, die die GPC-Methode mit einer nachfolgenden Umkehrphasen- oder Normalphasenchromatographie beschreiben^{61,57}. Auf Grund des hohen Zeitbedarfs, der erhöhten Wahrscheinlichkeit der Artefaktbildung und der Notwendigkeit möglichst viele unterschiedliche Probenmaterialien zu untersuchen, wurde dieser Ansatz im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

Die Normalphasenchromatographie mittels der HPLC-Technik erweist sich als die Methode der Wahl, wenn es um die Fraktionierung komplexer Gemische unter Berücksichtigung der Kompatibilität zu biologischen Testsystemen geht. Die Wiederfindungsrate der Mutagenität über die Gesamtmethode beträgt etwa 85%. Die Mutagenität im Ames-Test ist direkt proportional der eingesetzten Probemenge. Die maximale Beladung der Trennsäule beträgt 16mg EOM für das Standardmaterial NIST SRM 1649. Vergleicht man diese Kenndaten mit den wenigen in der Literatur publizierten Werten, ergeben sich für die Wiederfindung der Mutagenität Prozentzahlen bei 80%⁵⁴ bis 90%⁵⁹. Auf Grund der Stabilität der entwickelten Trennmethode konnten unterschiedliche Luftstaubextrakte fraktioniert und deren Chromatogramme und biologischen Testergebnisse verglichen werden. Die HPLC-Chromatogramme sowie die Mutagramme der Standorte Mannheim und Freiburg zu den verschiedenen Jahreszeiten zeigen wie in Kapitel 5.4.2 beschrieben deutliche Unterschiede.

Diese Unterschiede spiegeln sich auch in den Routineparametern der Luftqualitätsüberwachung und den Konzentrationen an PAK wider⁸.

Der limitierende Faktor von analytischen HPLC-Trennverfahren und biologischen Testsystemen im Rahmen der „bioassay directed fractionation“-Strategie ist jedoch die zur Verfügung stehende Menge an fraktioniertem Probematerial. Die begrenzte Kapazität der semi-präparativen Trennsäule bedingt die mehrfache Durchführung der Trennmethode, um für die chemisch analytischen und biologischen Untersuchungen ausreichende Probemengen zu sammeln. Die vorgestellte Methode weist eine entsprechend gute Reproduzierbarkeit auf, die parallele Untersuchungen im Ames-Test, im ³²P-Postlabeling Verfahren und GC/MS-Untersuchungen aus einer „Trenncharge“ über 5 Wiederholungen ermöglicht. Über die Variation der Sammeldauer der Fraktionen bis zu einer maximalen Auflösung von 0,5 Minuten kann die Methode flexibel an die Randbedingungen der folgenden Untersuchungen angepaßt werden.

6.3 Charakterisierung der Inhaltsstoffe

Die Identität der mutagen wirksamen organischen Verbindungen ist der Schlüssel zum Verständnis der genotoxischen Aktivität und der Frage nach der Entstehung dieser Luftschadstoffe. Die publizierten Untersuchungen zu diesem Thema konnten bislang kein abschließendes Ergebnis liefern. Schon 1976 veröffentlichte W. Cautreels et al. eine Liste von mehr als 100 Verbindungen, die mittels einer GC/MS-Kopplung identifiziert werden konnten^{106, 107}. Dieser Identifizierung ging eine Trennung nach den Säure/Basen-Eigenschaften voraus, ähnlich der wie sie im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurde. Es konnten, wie in der dargestellten Arbeit, aliphatische und aromatische Carbonsäuren der sauren Fraktion zugeordnet werden. Eine Bewertung der Mutagenität der Fraktion oder der identifizierten Einzelverbindungen fehlte im Rahmen der niederländischen Untersuchungen.

Die PAK und nitro-PAK stehen als Leitsubstanzen im Mittelpunkt vieler in der Literatur beschriebenen Arbeiten, weil sie sich relativ einfach über ihre charakteristischen Massenspektren identifizieren und quantifizieren lassen¹⁰⁸. Für die Standardmaterialien NIST SRM1648 und NIST SRM1649 sind die Gehalte ausgewählter PAK zertifiziert und dienen so als Referenzmaterial für die PAK-Quantifizierung aus Luftstäuben¹⁰⁹. Eine weitergehende Analyse der PAK in diesen Referenzstäuben wurde 1986 von Wise et al. publiziert in der mehr als 180 verschiedene PAK-Isomere identifiziert und quantifiziert werden konnten¹¹⁰. Auch in dieser Studie wurde keine Betrachtung der Mutagenität des Probematerials durchgeführt.

Die Ergebnisse der vorgestellten Arbeit zeigen jedoch eindeutig, daß die Substanzklasse der PAK nicht Träger des genotoxischen Potential sein kann. Vielmehr stellen die PAK die Eduktverbindungen für die atmosphärischen Transformationsreaktionen dar, die zur Entstehung der direkt mutagen aktiven Verbindungen führen. Dieser These läßt sich über die sehr gute Korrelation zwischen der Konzentration an PAK in Luftstaubextrakten und den biologischen Testergebnissen aus dem Ames-Test untermauern¹⁰.

Weitere rein analytische Arbeiten beschäftigten sich mit PAK^{111, 112}, oxidierten PAK¹¹³ z.B. Chinonen oder Aldehyden¹¹⁴ sowie mit der Bestimmung der Carbonsäuren¹¹⁵ aus Luftstaubextrakten. So wurden mehr als 2800 Einzelverbindungen identifiziert ohne einen direkten Bezug zur biologischen Wirksamkeit herzustellen. Die reine Generierung von identifizierten Verbindungen ohne die Berücksichtigung der biologischen Aktivität hat nur einen geringen Informationsgehalt, wenn es um die Frage nach den mutagen wirksamen

Substanzen geht. Im Rahmen dieser Arbeit stand jedoch genau die Frage nach der Identität der genotoxischen Verbindungen im Vordergrund.

Die Liste der detektierten Substanzen in den mutagen aktiven Fraktionen deckt sich mit den bisher aus der Literatur bekannten Verbindungen. In diesem Kontext soll die Bedeutung der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) bzw. ihre nitrierten Derivate diskutiert werden. In der Literatur werden im Zusammenhang mit Dieselrußemissionen die Substanzklasse der nitro-PAK als Träger der mutagene Aktivität beschrieben. Im Fall der atmosphärischen Luftstäube können die nitro-PAK aus mehreren Gründen nicht diese Rolle spielen. Die Nitroaromaten sind als Zwischenprodukte in der Atmosphärenchemie zu oxidationsempfindlich und werden durch weiterführende Transformationsreaktionen in der Atmosphäre verhältnismäßig schnell abgebaut. Parallel zeigen die Ergebnisse aus der Literatur sowie die Untersuchungen im Rahmen des Gesamtprojektes aus Untersuchungen mit nitroreduktasedefizienten Stämmen z.B. Stamm TA98NR, daß ein geringer Teil, bis etwa zu 30% der mutagenen Gesamtaktivität, auf nitrierte Verbindungen zurückgeführt werden kann. Weiterhin ergeben die Resultate aus der flüssig/flüssig Extraktion sowie der HPLC-Fraktionierung, daß die Träger der mutagenen Aktivität weitaus polarere Verbindungen sind. Die Beobachtung, daß sich die Genotoxizität der Extrakte durch die Zugabe eines metabolisch aktiven Enzymsystem kaum verändert bzw. für die mutagen aktivsten Fraktionen sogar verringert, relativiert die Bedeutung der einfach nitrierten-PAK. Die Bedeutung der nitro-PAK liegt nicht in der Eigenschaft der Genotoxizitätsträger zu sein, sondern daß diese als Zwischenprodukte oder Vorläuferverbindungen vorliegen. Weitere Hinweise darauf, daß stabilere Oxidationsprodukte aus den primär emittierten Verbindungen für die Aktivität verantwortlich gemacht werden können, ergeben sich daraus, daß im Dunkeln gesammelte Stäube nach der Exposition gegen Sonnenlicht in ihrer genotoxischen Wirkung unabhängig von der Zugabe von S9-Mix werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine einfach nitrierten PAK in der mutagen aktivsten Fraktion identifiziert werden. Die Messungen an einer GC/AED Kopplung zeigen allerdings das Vorhandensein von Stickstoffverbindungen und Schwefelverbindungen an. Bei den stickstoffhaltigen Verbindungen kann es sich um mehrfach nitrierte PAK oder um Stickstoffheterozyklen handeln. Die Untersuchung dieser Fraktion mittels GC/MS ergibt Hinweise auf heterozyklische Verbindungen. Eine schwedische Arbeitsgruppe konnte bei ihren Analysen Thiaarene aus Kohleabgas nachweisen¹¹⁶. Diese aromatischen Aza- bzw. Thioverbindungen könnten zu dem hohen genotoxischen Potential führen. In der Lebensmittelchemie ist die grosse mutagene Potenz von aromatischen Aza- bzw.

Aminoverbindungen lange bekannt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten einige stickstoff- bzw. schwefelhaltige Heterozyklen in Dieselabgasen¹¹⁷, Zigarettenrauch¹¹⁸ und Müllverbrennungsabgasen¹¹⁹ nachweisen. In den Extrakten von Müllverbrennungsabgaspartikeln zeigte die aktivste Fraktion ebenfalls eine Verringerung der Mutagenität bei Zugabe eines metabolischen Enzymsystemes (S9-Mix), wobei die direkt aktiven Mutagene als polare Verbindungen identifiziert werden konnten.

Die Ergebnisse der Identifizierung von Einzelverbindungen im Rahmen dieser Arbeit zeigen deutlich, daß die PAK und nitro-PAK eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der genotoxischen Verbindungen in Luftstaubextrakten spielen. Die Hauptträger der Mutagenität sind atmosphärische Transformationsprodukte mit polaren Eigenschaften. Hier können die Heterozyklen mit Stickstoff und/oder Schwefel als Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen dienen. Das identifizierte 2-Methylthiobenzothiazol kann nicht für das genotoxische Potential der aktivsten Fraktion verantwortlich zeichnen, kann aber die Grundlage für weitere Untersuchungen darstellen.

Schlußfolgerungen

Die Kombination der in dieser Arbeit vorgestellten Extraktions-, Fraktionierungs- und Analysenmethoden weist eine hohe Reproduzierbarkeit, Flexibilität und Kompatibilität zu den verschiedensten biologischen Testsystemen auf. Aus den HPLC-Fraktionierungen und den Ergebnissen der gaschromatographischen Untersuchungen kann man ableiten, daß es „den“ Träger der Mutagenität als Einzelverbindung nicht gibt. Vielmehr kann man ein Spektrum von polaren Substanzen definieren, die je nach Belastungssituation und meteorologischen Randbedingungen für die genotoxische Wirksamkeit in Luftstaubextrakten verantwortlich sind. Die analytische Nachweisgrenze für Einzelverbindungen in der Matrix „Luftstaubextrakt“ stellt das Haupthindernis bei der Suche und der Identifizierung der mutagen wirksamen Substanzen dar. Das Hauptaugenmerk der derzeitigen Untersuchungen zur Identität mutagen wirksamer Substanzen liegt bei aromatischen Nitro- bzw. Nitro-Ketoverbindungen. Die hier vorgestellten Ergebnisse weisen in den mutagen aktivsten Fraktionen einen hohen Anteil an bisher nicht identifizierten Schwefelverbindungen auf. Weitere Forschungen mittels HPLC/MS Kopplungen in Verbindung mit den vorgestellten analytischen Trennverfahren und biologischen Testsystemen im Rahmen der „bioassay directed fractionation“-Strategie könnten die bestehenden offenen Fragen zur Identität und genotoxischen Bedeutung dieser Substanzen klären.

7 Anhang

7.1 UMEG Meßstationen

Die folgende Tabelle (Tabelle 35) stellt die routinemäßig erfassten Luftqualitätsparameter und die Meßmethode zusammengefasst dar¹²⁰.

MEßOBJEKT	GERÄTETYP	MEßPRINZIP	NACHWEISGRENZE
Stickoxide	Bendix 8101 C	Chemilumineszenz	2,5 µg/m ³ (NO ₂)
Schwefeldioxid	Monitor	UV-Fluoreszenz	2 µg/m ³
Schwebstaub	FAG/FH 62	β -Meter	10 µg/m ³
Schwebstaub	VEREWA F703	β- Meter	<10 µg/m ³
Kohlenmonoxid	Horiba APMA 300	IR-Absorption	125 µg/m ³
Ozon	Bendix 8002	Chemilumineszenz	3 µg/m ³
Ozon	Dasibi 1008 AH	UV-Absorption	4 µg/m ³
CO ₂	Maihak	IR-Absorption	-
CmHn	Horiba	FID	-
Staub	DIGITEL	Staubprobensammler	-
Staub	Apparatebau Gauting	Staubprobensammler	-
Staub	VEREWA	Staubprobensammler	-
Windrichtung	Thies Clima	opt. Codeabtastung	-
Windgeschwindigkeit	Thies Clima	optoelektronische (Impulsgeber)	-
Temperatur	Sprenger	Widerstandsmessung PT 100	-
Taupunkt	Sprenger	Lithiumchlorid mit PT 100	-
Niederschlag	Thies Clima	Tropfenzählung mittels einer Lichtschranke	-
Luftdruck	Vaisäla	kapazitiver Siliziumdetektor	-
Strahlung	Dirmhirn	Thermokette auf hell/dunkel gefärbter Fläche	-

Tabelle 35: Meßparameter des UMEG-Luftüberwachungsnetzes

Die Luftmeßstation Karlsruhe-Mitte liegt unmittelbar an einer Kreuzung mit hohem Kfz-Aufkommen. Die Meßstation Mannheim Mitte liegt in der Nähe des Hauptbahnhofes, unmittelbar neben den Gleisanlagen der Deutschen Bahn AG sowie einer Verladestation der Post. Auf der anderen Seite befindet sich die stark befahrene Reichkanzler-Müller Strasse, über die der Durchgangsverkehr geleitet wird. Die Meßstation Stuttgart Mitte ist im Zentrum der Stadt angesiedelt. Die dort unmittelbar vorbeiführenden Straßen weisen eine weniger hohe Verkehrsbelastung auf. In Reutlingen befindet sich die Meßstation auf dem Gelände eines botanischen Gartens (Pomologie), in deren Nähe eine stark befahrene Durchgangsstrasse vorbeiführt. Die Meßstationen in Freudenstadt und Weil am Rhein sind in Wohngebieten mit wenig Durchgangsverkehr lokalisiert, während an der Meßstation Freiburg-Mitte eine vergleichsweise hohe Verkehrsbelastung zu beobachten ist. Bei der Meßstation Schwarzwald-Süd handelt es sich um eine Reinluftmeßstation in Waldlage. Die Meßstation spiegelt die Verhältnisse eines hochgelegenen, emittentenfernen Reinluftgebietes wider.

7.2 MS/MS Parameter der nitro PAK Methode

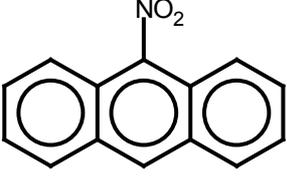
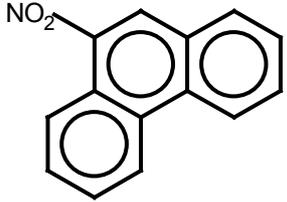
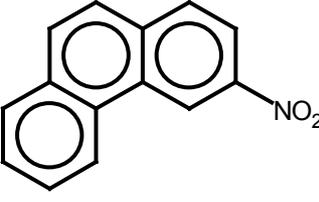
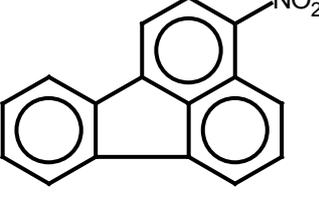
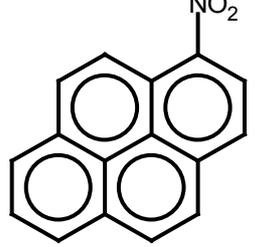
Die Detektion der einzelnen nitro-PAK erfolgte in 6 unterschiedlichen, optimierten Segmenten mit variablen Ionisierungszeiten.

<u>Segment 1</u>		<u>Segment 2</u>	
Untere Masse	100 m/z	Untere Masse	150 m/z
Obere Masse	320 m/z	Obere Masse	200 m/z
Scan Rate	1000 ms	Scan rate	1000 ms
Segmentdauer	10,0 min	Segmentdauer	2,3 min
Peak Schwellwert	1 counts	Peak Schwellwert	0 counts
Filament/multiplier delay	10,0 min	Filament/multiplier delay	0,0 min
Background mass	99 m/z	Background mass	149 m/z
Scan Modus	EI	Scan Modus	MS/MS
<u>Segment 3</u>		<u>Segment 4</u>	
Untere Masse	150 m/z	Untere Masse	180 m/z
Obere Masse	200 m/z	Obere Masse	230 m/z
Scan Rate	1000 ms	Scan Rate	350 ms
Segmentdauer	1,7 min	Segmentdauer	3,0 min
Peak Schwellwert	0 counts	Peak Schwellwert	0 counts
Filament/multiplier delay	0,0 min	Filament/multiplier delay	0,0 min
Background mass	149 m/z	Background mass	179 m/z
Scan Modus	MS/MS	Scan Modus	GROUP
<u>Segment 5</u>		<u>Segment 6</u>	
Untere Masse	180 m/z	Untere Masse	230 m/z
Obere Masse	250 m/z	Obere Masse	275 m/z
Scan Rate	1000 ms	Scan Rate	1000 ms
Segmentdauer	4,0 min	Segmentdauer	4,0 min
Peak Schwellwert	0 counts	Peak Schwellwert	0 counts
Filament/multiplier delay	0,0 min	Filament/multiplier delay	0,0 min
Background mass	179 m/z	Background mass	229 m/z
Scan Modus	MS/MS	Scan Modus	MS/MS

Tabelle 36: Methodenparameter der einzelnen Detektionssegmente

Die Massenspektren der einzelnen Zielverbindungen wurden im EI/MS Betriebsmodus mit Einzelstandardlösungen aufgezeichnet und für den Molpeak der Verbindungen die MS/MS Methodenparameter bestimmt.

Die folgende Tabelle (Tabelle 37) stellt die einzelnen quantifizierten nitro-PAK und MS/MS-Methodenparameter dar.

Substanz	Struktur	Parameter
9-Nitroanthracen 223 g/mol		Isolierte Masse 223,0m/z Massenfenster 3,0m/z Waveform Typ Resonant Anregungsdauer 20ms Anregungsamplitude 0,70Volt Isolationsdauer 5ms Prescan Ionization Typ Parent Excitation Storage Level 110,0m/z
9-Nitrophenanthren 223g/mol		Isolierte Masse 223,0m/z Massenfenster 3,0m/z Waveform Typ Resonant Anregungsdauer 20ms Anregungsamplitude 0,30Volt Isolationsdauer 5ms Prescan Ionization Typ Parent Excitation Storage Level 110,0m/z
3-Nitrophenanthren 223g/mol		Isolierte Masse 223,0m/z Massenfenster 3,0m/z Waveform Typ Resonant Anregungsdauer 20ms Anregungsamplitude 0,30Volt Isolationsdauer 5ms Prescan Ionization Typ Parent Excitation Storage Level 110,0m/z
3-Nitrofluoranthren 247g/mol		Isolierte Masse 247,0m/z Massenfenster 3,0m/z Waveform Typ Resonant Anregungsdauer 20ms Anregungsamplitude 0,50Volt Isolationsdauer 5ms Prescan Ionization Typ Parent Excitation Storage Level 130,0m/z
1-Nitropyren 247g/mol		Isolierte Masse 247,0m/z Massenfenster 3,0m/z Waveform Typ Resonant Anregungsdauer 20ms Anregungsamplitude 0,50Volt Isolationsdauer 5ms Prescan Ionization Typ Parent Excitation Storage Level 130,0m/z

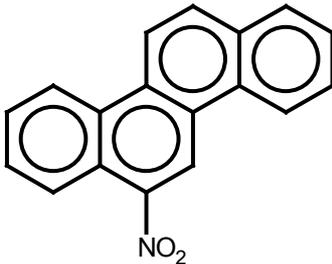
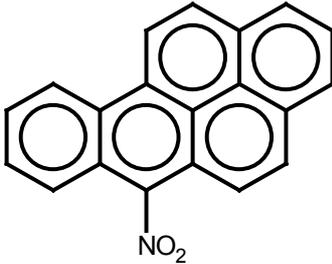
Substanz	Struktur	Parameter	
6-Nitrochrysen 273g/mol		Isolierte Masse	273,0m/z
		Massenfenster	3,0m/z
		Waveform Typ	Resonant
		Anregungsdauer	20ms
		Anregungsamplitude	0,60Volt
		Isolationsdauer	5ms
		Prescan Ionization Typ	Parent
		Excitation Storage Level	140,0m/z
6-Nitrobenzo[a]pyren 297g/mol		Isolierte Masse	297,0m/z
		Massenfenster	3,0m/z
		Waveform Typ	Resonant
		Anregungsdauer	20ms
		Anregungsamplitude	0,50Volt
		Isolationsdauer	5ms
		Prescan Ionization Typ	Parent
		Excitation Storage Level	160,0m/z
d ₉ -1-Nitropyren 256g/mol		Isolierte Masse	256,0m/z
		Massenfenster	3,0m/z
		Waveform Typ	Resonant
		Anregungsdauer	20ms
		Anregungsamplitude	0,50Volt
		Isolationsdauer	5ms
		Prescan Ionization Typ	Parent
		Excitation Storage Level	130,0m/z

Tabelle 37: MS/MS-Methodenparameter der verschiedenen nitro-PAK

7.3 MSD-Parameter der PAH Methode

Die Chromatogramme wurde im SIM-Modus des Massenspektrometers aufgezeichnet. Hierbei werden in definierten Zeitfenstern ausgewählte Massenfragmente mit einer festgelegten zeitlichen Auflösung (Dwell Time) detektiert. Die nachstehende Tabelle zeigt die quantifizierten PAK und die verwendeten Parameter.

NAME	RETENTIONS- ZEIT [MIN]	ZEIT- FENSTER [MIN]	DWELL TIME [MS]	DETEKTIERTE MASSEN [M/Z]
Naphthalen	4,6	4,0	100	129.10 128.10 127.10 126.10
Acenaphthylen	8,2	7,5	70	164.20 162.10 160.15
Acenaphthen-d ₁₀	8,6			158.15 154.05 153.05
Acenaphthen	8,7			152.05 151.05 150.10
Fluoren	9,9	9,5	100	166.10 165.10 164.10 163.10
Phenanthren-d ₁₀	12,2	11,5	75	189.20 188.20 187.20
Phenanthren	12,3			184.10 179.15 178.15
Anthracen	12,4			177.15 176.05
Fluoranthren-d ₁₀	15,2	14,5	75	212,10 213,10 211,15
Fluoranthren	15,3			203.10 202.15 201.15
Pyren	15,8			200.05
Benzo[a]anthracen-d ₁₂	18,8	18,0	75	241.15 240.15 239.15
Benzo[a]anthracen	18,9			236.10 229.10 228.10
Chrysen	19,0			227.10 226.10
Benzo[b]fluoranthren	21,45	20,5	75	253.10 252.10 251.10
Benzo[k]fluoranthren	21,55			250.10
Perylen-d ₁₂	22,2			265.15 264.15 263.15
Benzo[a]pyren	22,4	24	75	260.15 253.10 252.10
Indeno[1,2,3-cd]pyren	25,7			251.10 250.10
Dibenzo[a,h]anthracen	25,9			279.15 278.15 277.15
Benzo[ghi]perylen	26,7			277.05 276.05 275.05
				274.10

Tabelle 38: Quantifizierte PAK und die Analysenparameter

Eine genauere Beschreibung der Bedeutung der einzelnen Parameter und des Detektionsablaufes findet sich in der Diplomarbeit¹⁰.

7.4 AQS PAH-Ringversuchszertifikat

Analytische Qualitätssicherung Baden-Württemberg

Sonder-Ringversuch 1995 - Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe -

Hiermit wird bestätigt, daß das Laboratorium

Hygiene-Institut
Univ. Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 324

69120 Heidelberg

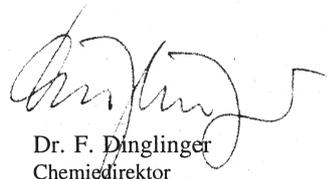
am Sonder-Ringversuch 1995 - Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe -
mit den unten aufgeführten Parametern **erfolgreich** teilgenommen hat.

Benzo(b)fluoranthen
Benzo(ghi)perylen
Benzo(k)fluoranthen
Indeno(1,2,3-cd)pyren

Stuttgart, den 30. Oktober 1995


Dr.-Ing. M. Koch
Diplomchemiker
AQS-Leitstelle an der
Universität Stuttgart




Dr. F. Dinglinger
Chemiedirektor
Umweltministerium
Baden-Württemberg

7.5 Abkürzungen

A	Adenin
AED	Atomemissionsdetektion
ATP	Adenosintriphosphat
BaP	Benzo[a]pyren
C	Cytosin
CI	Chemische Ionisation
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DRZ	Diagonale radioaktive Zone
ECD	Elektroneneinfangdetektor
EI	Elektronenstoßionisation
EOM	Organisch extrahierbare Masse
EOX	Organisch extrahierbare Halogenverbindungen
FID	Flammenionisationsdetektor
G	Guanin
GC/MS	Gaschromatograph/Massenspektrometer-Gerätekopplung
GC/MS ²	Gaschromatograph/Massenspektrometer-Massenspektrometer Gerätekopplung
GFF	Glasfaserfilter
GSF	Gesellschaft zur Strahlenforschung
HLPC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LfU	Landesanstalt für Umweltschutz
NIST	National Institute of Standards and Technology
nitro-PAK	Nitro-Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
NK	Negativkontrolle
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PK	Positivkontrolle
PM10	Staubpartikel mit einem Durchmesser kleiner 10µm
PM25	Staubpartikel mit einem Durchmesser kleiner 2,5µm
PUF	Polyurethanschaumfilter
RAL	Relative Addukt Level
SEC	Größenausschlußchromatographie
SIM	Selected Ion Monitoring
SPE	Festphasenextraktion
SRM	Standard Referenz Material
T	Thymin
UMEG	Gesellschaft für Umweltmessungen und Umwelterhebungen mbH
UV	Ultraviolett

7.6 Ablaufschema der ^{32}P -postlabeling Methode

In der folgenden Abbildung (Abbildung 66) ist die Aufarbeitung der adduktierten DNA in einem Ablaufschema dargestellt. Die verschiedenen Extraktionsvarianten sind in der Abbildung parallel aufgeführt.

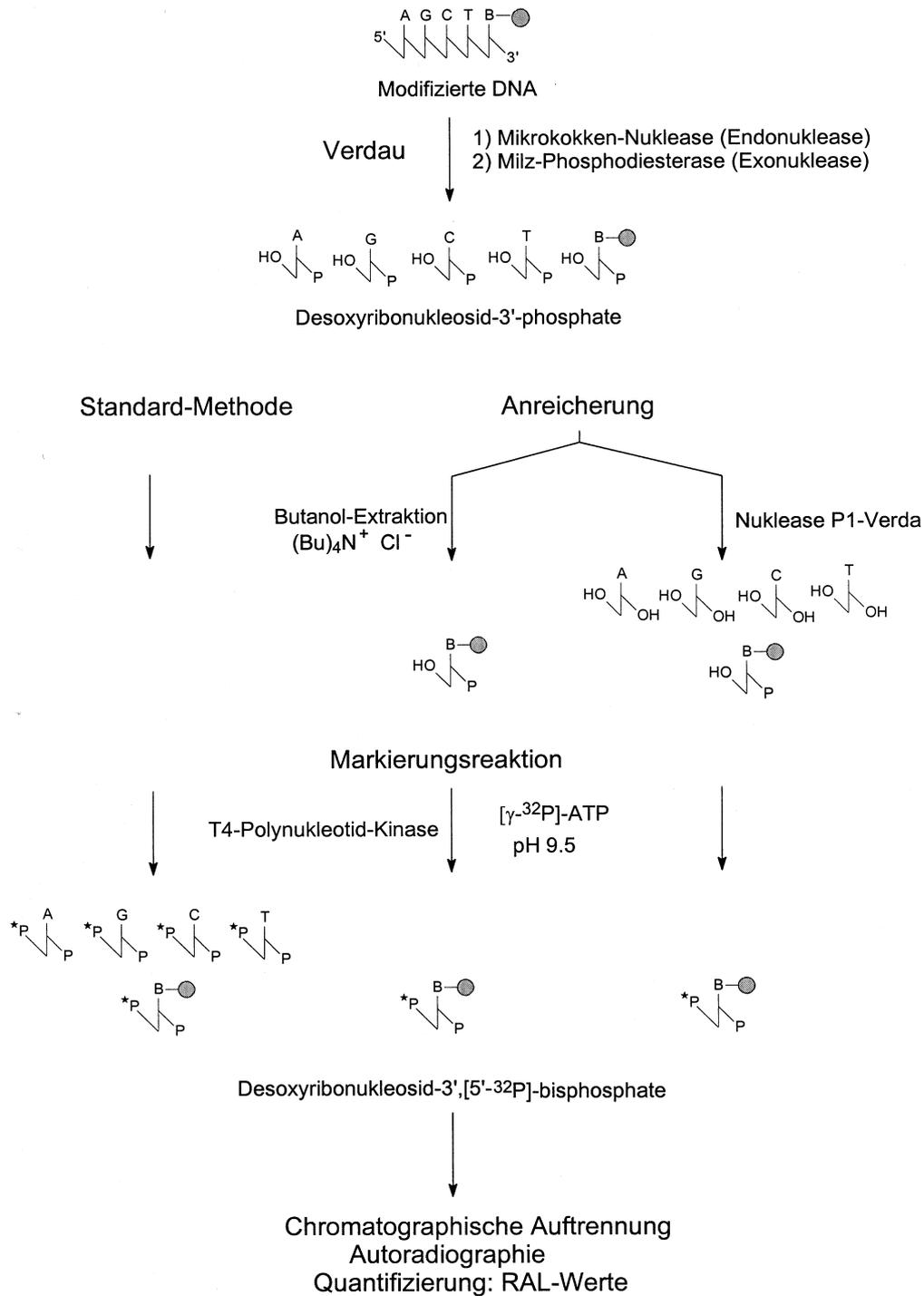


Abbildung 66: Schematischer Verlauf der ^{32}P -Postlabeling Methode

7.7 Publikationen und Präsentationen

7.7.1 Publikationen

Erdinger L., Dittton H., Dürr M., Dörr I., Fried M., Jehle S., Sonntag H.-G.

„Entwicklung und Anwendung von in-vitro Testverfahren zur routinemäßigen Untersuchung mutagener und cytotoxischer Wirkungen organischer Luftschadstoffe“

Veröff. PAÖ, Band 8 (1994) 501-515

Erdinger L., Höpker, K.A., Dürr, M., Dörr, I., Fried, M., Sonntag, H.-G.

„Entwicklung und Anwendung von in-vitro Testverfahren zur routinemäßigen Untersuchung mutagener und cytotoxischer Wirkungen organischer Luftschadstoffe“

Veröff. PAÖ 12 (1995) 371-388

Erdinger L., Fried M., Dörr I., Dürr M.

„Genotoxische organische Verbindungen in der Außenluft“

Veröff. PAÖ, Band 22 (1997), 279-291

Erdinger L., Höpker K., Dörr I., Dürr M., Fried M.

„Genotoxische organische Verbindungen in der Außenluft“

Veröff. PAÖ, Band 25 (1997) 1-215

Erdinger L., Dörr I., Fried M.

„Identität, Transformation und ökotoxikologische Bedeutung mutagener organischer Verbindungen in der Außenluft“

Veröff. PAÖ 16 (1996) 539-553

Binkova B., Lenicek J., Benes I., Vidova P., Gajdos O., Fried M., Sram R. J.

„Genotoxicity of coke-oven and urban air particulate matter in in-vitro acellular assays with ³²P-postlabeling and HPLC analysis of DNA adducts“

Mutat. Res. 414 (1998) 77-94

Topinka J., Schwarz LR., Kiefer F., Wiebel FJ., Gajdos O., Vidova P., Dobias L., Fried M., Sram RJ., Wolff T.

„DNA adduct formation in mammalian cell cultures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and nitro-PAH in coke oven emission extract“

Mutat. Res. 419(1-3) (1998) 91-105

Dobias L. Kusova J. Gajdos O. Vidova P. Gajdosova D. Havrankova J. Fried M. Binkova B. Topinka J.

„Bioassay-directed chemical analysis and detection of mutagenicity in ambient air of the coke oven“

Mutat. Res. 445(2) (1999) 285-293

7.7.2 Posterpräsentationen

Fried M., Erdinger L., Höpker K., Sonntag H.-G.

„Untersuchungen zur zeitlichen Verteilung von PCBs und PAHs in der Luft in Baden-Württemberg - Korrelation mit routinemäßig erhobenen Untersuchungsdaten“

24. Jahrestagung der ÖGHMP, Salzburg, Österreich, 1994, Poster

Dörr I., Fried M., Höpker K., Erdinger L., Sonntag, H.-G.

„Untersuchungen zur Partikelgrößenverteilung und genotoxischen Aktivität partikelgebundener Luftschadstoffe“

4. Kongreß der Gesellschaft für Hygiene und Umweltmedizin (GHU) 1996 Poster

Fried M., Dörr I., Erdinger L., Schramm B., Sonntag H.-G.

„Identität von genotoxischen partikelgebundenen organischen Luftschadstoffen“

4. Statuskolloquium PAÖ Ettlingen 1996, Poster

Erdinger L., Fried M.

„Genotoxische organische Verbindungen in der Außenluft“

50. Kongreß der DGHM, Berlin, 1998, Poster

7.7.3 Vorträge

Jehle S., Fried M., Erdinger L., Sonntag H.-G.

„Schwermetallgehalt, PAH-Konzentration und mutagene Aktivität von Luftschadstoffen aus Baden–Württemberg“

24. Jahrestagung der ÖGHMP, Salzburg, Österreich, 1994, Vortrag

Fried M., Erdinger L. Dörr I., Höpker K.

„Charakterisierung mutagener Luftschadstoffe aus industriellen Ballungsgebieten“

4.Kongreß der Gesellschaft für Hygiene und Umweltmedizin (GHU) 1996 Vortrag

Erdinger L., Dörr I., Fried M.

„Identität, Transformation und ökotoxikologische Bedeutung mutagener organischer Verbindungen in der Außenluft“

4. Statuskolloquium PAÖ Ettlingen 1996

Fried M., Schramm B., Sonntag H.-G., Erdinger L.

„Identifizierung von genotoxischen partikelgebundenen organischen Luftschadstoffen“

49. Kongreß der DGHM, Jena, 1997, Vortrag

Schmeiser H.H., Bieler M., Wießler M., Fried M., Erdinger L.

„Identifizierung spezifischer DNA-Adduktmuster durch organische Verbindungen in der Außenluft“

Statusbericht Projekt Umwelt und Gesundheit (1997) Ettlingen

7.8 Originaldaten

Abbildung 32: Mutagramm von NIST SRM1649 (schwarz) und Blindtrennung (grau) im Stamm TA98 *ohne* S9-Mix (Probenwerte)

SRM1649 Probe

Stamm TA98 dreifach
 Probe SRM1649
 Menge 300mg Staubeinwaage

Stamm	TA98	ohne S9	PROBE	MW
NK	69	76	74	73
(DMSO)				
PK (NF)	1220	1438	1313	1324

Probe	Zeit	Platte 1	Platte 2	Platte 3	MW	Induktion
1	0	68	65	63	65	0,9
2	2	61	66	69	65	0,9
3	4	67	70	65	67	0,9
4	6	76	51	54	60	0,7
5	8	72	79	54	68	0,7
6	10	81	57	64	67	0,9
7	12	96	86	78	87	1,1
8	14	121	121	104	115	1,4
9	16	144	115	111	123	1,5
10	18	342	333	328	334	4,5
11	20	475	530	448	484	6,1
12	22	184	220	228	211	3,1
13	24	119	127	152	133	2,1
14	26	132	102	106	113	1,5
15	28	89	84	56	76	0,8
16	30	51	63	45	53	0,6
17	32	61	85	80	75	1,1
18	34	88	72	95	85	1,3
19	36	78	69	69	72	0,9
20	38	70	91	77	79	1,1
21	40	84	82	75	80	1,0
22	42	79	64	53	65	0,7
23	44	77	87	75	80	1,0
24	46	72	77	72	74	1,0
25	48	61	75	64	67	0,9

Abbildung 32: Mutagramm von NIST SRM1649 (schwarz) und Blindtrennung (grau) im Stamm TA98 ohne S9-Mix (Blindwertdaten)

Stamm	TA98	ohne S9	BLINDWERT	Mittelwert
NK (DMSO)	69	76	74	73
PK (NF)	1220	1438	1313	1324

Probe	Zeit	Platte 1	Platte 2	Platte 3	Mittelwert	Induktion
1	0	33	84	33	50	0,5
2	2	30	51	69	50	0,9
3	4	75	54	43	57	0,6
4	6	28	21	68	39	0,9
5	8	74	63	70	69	1,0
6	10	60	59	57	59	0,8
7	12	37	80	59	59	0,8
8	14	53	75	79	69	1,1
9	16	73	63	80	72	1,1
10	18	65	58	63	62	0,9
11	20	48	68	66	61	0,9
12	22	73	71	66	70	0,9
13	24	60	45	63	56	0,9
14	26	73	77	57	69	0,8
15	28	66	63	70	66	1,0
16	30	73	56	62	64	0,8
17	32	71	77	77	75	1,1
18	34	89	71	69	76	0,9
19	36	70	64	71	68	1,0
20	38	54	64	54	57	0,7
21	40	65	65	84	71	1,2
22	42	89	78	70	79	1,0
23	44	71	67	67	68	0,9
24	46	73	84	66	74	0,9
25	48	68	75	75	73	1,0

Abbildung 33: Mutagramm von NIST SRM1649 (schwarz) und Blindtrennung (grau) im Stamm TA98 mit S9-Mix (NIST SRM1649 Probenwerte)

SRM1649 Probe

Stamm TA98 dreifach
 Probe SRM1649
 Menge 300mg Staubeinwaage

Stamm	TA98	mit S9		
				Mittelwert
NK (DMSO)	70	56	64	63
PK (2-AA)	1604	1560	1744	1636

Probe	Zeit	Platte 1	Platte 2	Platte 3	Mittelwert	Induktion
1	0	56	64	72	64	1,1
2	2	75	74	55	68	0,9
3	4	91	83	83	86	1,3
4	6	72	79	92	81	1,5
5	8	79	81	44	68	0,7
6	10	84	89	99	91	1,6
7	12	99	99	89	96	1,4
8	14	92	101	116	103	1,8
9	16	124	121	123	123	1,9
10	18	180	166	139	162	2,2
11	20	162	126	120	136	1,9
12	22	123	90	82	98	1,3
13	24	99	96	88	94	1,4
14	26	87	84	50	74	0,8
15	28	46	81	78	68	1,2
16	30	76	79	102	86	1,6
17	32	91	61	75	76	1,2
18	34	83	73	85	80	1,3
19	36	85	71	70	75	1,1
20	38	71	89	84	81	1,3
21	40	110	79	72	87	1,1
22	42	60	102	83	82	1,3
23	44	90	79	73	81	1,2
24	46	74	95	90	86	1,4
25	48	59	60	55	58	0,9

Abbildung 33: Mutagramm von NIST SRM1649 (schwarz) und Blindtrennung (grau) im Stamm TA98 **mit** S9-Mix (Blindwertdaten)

Stamm	TA98	mit S9	BLINDWERT	Mittelwert
NK (DMSO)	70	56	64	63
PK (2-AA)	1604	1560	1744	1636

Probe	Zeit	Platte 1	Platte 2	Platte 3	Mittelwert	Induktion
1	0	80	73	59	71	0,9
2	2	70	76	75	74	1,2
3	4	64	80	74	73	1,2
4	6	59	79	77	72	1,2
5	8	81	74	76	77	1,2
6	10	76	60	80	72	1,3
7	12	77	55	74	69	1,2
8	14	65	50	80	65	1,3
9	16	86	85	79	83	1,2
10	18	62	92	61	72	1,0
11	20	85	72	76	78	1,2
12	22	75	68	80	74	1,3
13	24	68	73	69	70	1,1
14	26	69	79	85	78	1,3
15	28	88	90	67	82	1,1
16	30	61	72	74	69	1,2
17	32	75	60	71	69	1,1
18	34	66	71	79	72	1,2
19	36	81	73	68	74	1,1
20	38	74	73	73	73	1,2
21	40	64	68	89	74	1,4
22	42	75	86	85	82	1,3
23	44	65	76	68	70	1,1
24	46	90	61	80	77	1,3
25	48	82	66	81	76	1,3

Abbildung 34: Chromatogramm und Mutagramm von NIST SRM1649 aus einer Trennung mit einem n-Hexan/Dioxan-Gradienten

Mutagramm SRM1649

Stamm TA98 doppelt
 Probe SRM1649
 Menge 2 mal 40mg
 Staubeinwaage

Stamm TA98 ohne S9

NK (DMSO) 83

Zeit	Platte 1	Platte 2	Mittelwert	Induktion
1	89	71	80	1,0
2	78	74	76	0,9
3	92	86	89	1,1
4	71	74	72,5	0,9
5	71	70	70,5	0,8
6	79	80	79,5	1,0
7	68	82	75	0,9
8	84	94	89	1,1
9	83	84	83,5	1,0
10	80	72	76	0,9
11	75	72	73,5	0,9
12	85	78	81,5	1,0
13	82	91	86,5	1,0
14	87	87	87	1,0
15	58	96	77	0,9
16	83	108	95,5	1,2
17	103	87	95	1,1
18	91	102	96,5	1,2
19	81	103	92	1,1
20	85	99	92	1,1
21	109	125	117	1,4
22	91	95	93	1,1
23	111	123	117	1,4
24	99	95	97	1,2
25	98	102	100	1,2
26	105	104	104,5	1,3
27	112	87	99,5	1,2
28	118	110	114	1,4
29	116	104	110	1,3
30	116	126	121	1,5
31	118	99	108,5	1,3
32	123	131	127	1,5
33	126	126	126	1,5
34	98	118	108	1,3
35	190	171	180,5	2,2
36	145	173	159	1,9
37	189	166	177,5	2,1

38	130	139	134,5	1,6
39	135	130	132,5	1,6
40	185	155	170	2,0
41	205	186	195,5	2,4
42	440	432	436	5,3
43	526	496	511	6,2
44	380	390	385	4,6
45	286	174	230	2,8
46	278	340	309	3,7
47	286	302	294	3,5
48	292	264	278	3,3
49	114	182	148	1,8
50	282	260	271	3,3
51	248	246	247	3,0
52	224	228	226	2,7
53	206	170	188	2,3
54	189	192	190,5	2,3
55	191	181	186	2,2
56	214	180	197	2,4
57	206	178	192	2,3
58	149	172	160,5	1,9
59	182	220	201	2,4
60	153	155	154	1,9
61	143	148	145,5	1,8
62	150	139	144,5	1,7
63	153	143	148	1,8
64	147	145	146	1,8
65	126	144	135	1,6
66	126	142	134	1,6
67	133	128	130,5	1,6
68	120	124	122	1,5
69	118	130	124	1,5
70	128	125	126,5	1,5
71	121	121	121	1,5
72	125	123	124	1,5
73	131	129	130	1,6

Abbildung 35: Chromatogramm und Mutagramm einer Fraktionierungen eines Staubextraktes aus Mannheim Mitte Oktober 1995 mit 120mg Staubeinwaage

Mutagramm MAM 10/95

Stamm TA98 doppelt
 Probe Mannheim Mitte 10 / 1995
 Menge 120mg Staubeinwaage

Stamm TA98 ohne S9

NK (DMSO) 149 145 154 149,3

Minute	Platte 1	Platte 2	Mittelwert	Induktion
1	126	160	143	1,0
2	146	139	142,5	1,0
3	153	134	143,5	1,0
4	141	141	141	0,9
5	124	143	133,5	0,9
6	149	144	146,5	1,0
7	144	134	139	0,9
8	156	148	152	1,0
9	130	139	134,5	0,9
10	164	173	168,5	1,1
11	126	134	130	0,9
12	141	132	136,5	0,9
13	160	127	143,5	1,0
14	125	136	130,5	0,9
15	159	161	160	1,1
16	156	148	152	1,0
17	158	176	167	1,1
18	171	176	173,5	1,2
19	193	185	189	1,3
20	176	131	153,5	1,0
21	185	179	182	1,2
22	179	189	184	1,2
23	150	165	157,5	1,1
24	160	159	159,5	1,1
25	181	176	178,5	1,2
26	197	192	194,5	1,3
27	174	159	166,5	1,1
28	163	130	146,5	1,0
29	178	177	177,5	1,2
30	172	194	183	1,2
31	162	167	164,5	1,1
32	171	145	158	1,1
33	163	144	153,5	1,0
34	154	166	160	1,1
35	185	200	192,5	1,3
36	235	257	246	1,6
37	226	213	219,5	1,5
38	169	215	192	1,3
39	208	203	205,5	1,4

40	195	204	199,5	1,3
41	247	214	230,5	1,5
42	317	277	297	2,0
43	218	240	229	1,5
44	282	289	285,5	1,9
45	363	374	368,5	2,5
46	350	361	355,5	2,4
47	307	347	327	2,2
48	384	382	383	2,6
49	315	322	318,5	2,1
50	341	315	328	2,2
51	252	260	256	1,7
52	289	277	283	1,9
53	273	314	293,5	2,0
54	296	278	287	1,9
55	298	297	297,5	2,0
56	234	232	233	1,6
57	277	241	259	1,7
58	209	221	215	1,4
59	269	269	269	1,8
60	280	258	269	1,8
61	289	269	279	1,9
62	240	214	227	1,5
63	269	258	263,5	1,8
64	228	229	228,5	1,5
65	213	208	210,5	1,4
66	224	193	208,5	1,4
67	195	208	201,5	1,3
68	193	192	192,5	1,3
69	215	213	214	1,4
70	208	205	206,5	1,4
71	203	177	190	1,3
72	200	217	208,5	1,4
73	193	179	186	1,2

Abbildung 36: Mutagramm zweier unabhängiger Fraktionierungen von NIST SRM1649 mit 80mg und 160mg Staubeinwaage

Zeit [Minuten]	Mittelwert Revertanten (80mg Einwaage)	Induktion (80mg Einwaage)	Mittelwert Revertanten (160mg Einwaage)	Induktion (160mg Einwaage)
1	80	1,0	88	0,9
2	76	0,9	49	0,5
3	89	1,1	82	0,8
4	72,5	0,9	95	1,0
5	70,5	0,8	79	0,8
6	79,5	1,0	97	1,0
7	75	0,9	77	0,8
8	89	1,1	76	0,8
9	83,5	1,0	78	0,8
10	76	0,9	101	1,0
11	73,5	0,9	84	0,9
12	81,5	1,0	78	0,8
13	86,5	1,0	86	0,9
14	87	1,0	92	0,9
15	77	0,9	83	0,9
16	95,5	1,2	94	1,0
17	95	1,1	92	0,9
18	96,5	1,2	89	0,9
19	92	1,1	90	0,9
20	92	1,1	98	1,0
21	117	1,4	110	1,1
22	93	1,1	109	1,1
23	117	1,4	106	1,1
24	97	1,2	100	1,0
25	100	1,2	104	1,1
26	104,5	1,3	111	1,1
27	99,5	1,2	99	1,0
28	114	1,4	120	1,2
29	110	1,3	118	1,2
30	121	1,5	110	1,1
31	108,5	1,3	103	1,1
32	127	1,5	119	1,2
33	126	1,5	122	1,3
34	108	1,3	134	1,4
35	180,5	2,2	158	1,6
36	159	1,9	159	1,6
37	177,5	2,1	161	1,7
38	134,5	1,6	116	1,2
39	132,5	1,6	136	1,4
40	170	2,0	149	1,5
41	195,5	2,4	183	1,9
42	436	5,3	948	9,8
43	511	6,2	454	4,7
44	385	4,6	345	3,6
45	230	2,8	393	4,1
46	309	3,7	404	4,2
47	294	3,5	293	3,0
48	278	3,3	363	3,7

49	148	1,8	398	4,1
50	271	3,3	303	3,1
51	247	3,0	351	3,6
52	226	2,7	336	3,5
53	188	2,3	291	3,0
54	190,5	2,3	296	3,1
55	186	2,2	247	2,5
56	197	2,4	220	2,3
57	192	2,3	225	2,3
58	160,5	1,9	223	2,3
59	201	2,4	221	2,3
60	154	1,9	200	2,1
61	145,5	1,8	169	1,7
62	144,5	1,7	170	1,8
63	148	1,8	216	2,2
64	146	1,8	183	1,9
65	135	1,6	152	1,6
66	134	1,6	156	1,6
67	130,5	1,6	176	1,8
68	122	1,5	162	1,7
69	124	1,5	147	1,5
70	126,5	1,5	165	1,7
71	121	1,5	181	1,9
72	124	1,5	142	1,5
73	130	1,6	135	1,4

Abbildung 38: Chromatogramm und Mutagramm von NIST SRM1649 aus einer Trennung mit einem optimierten n-Hexan/1,4-Dioxan-Gradienten

Stamm TA 98		S9-			SRM 1649
PK= Nitropyren 2,5µg/50µl		2258	2094	2176	46,8
NK=Dms0		45	48	47	1
HPLC-Fractionen	Zeit	1	2	Mittelwert	Induktion
Probe 1	2	56	45	51	1,1
Probe 2	4	46	38	42	0,9
Probe 3	6	48	40	44	0,9
Probe 4	8	64	72	68	1,5
Probe 5	10	83	89	86	1,8
Probe 6	12	102	106	104	2,2
Probe 7	14	88	99	93,5	2,0
Probe 8	16	96	98	97	2,1
Probe 9	18	260	273	267	5,7
Probe 10	20	168	182	175	3,8
Probe 11	22	102	102	102	2,2
Probe 12	24	157	119	138	3,0
Probe 13	26	988	999	994	21,4
Probe 14	28	398	373	386	8,3
Probe 15	30	199	202	201	4,3
Probe 16	32	137	194	166	3,6
Probe 17	34	149	144	147	3,2
Probe 18	36	159	122	141	3,0
Probe 19	38	113	119	116	2,5
Probe 20	40	95	99	97	2,1
Probe 21	42	102	105	104	2,2
Probe 22	44	106	132	119	2,6
Probe 23	46	85	91	88	1,9
Probe 24	48	82	68	75	1,6
Probe 25	50	72	90	81	1,7
Probe 26	52	102	107	105	2,2
Probe 27	54	77	85	81	1,7
Probe 28	56	65	84	75	1,6
Probe 29	58	104	97	101	2,2
Probe 30	60	75	76	76	1,6
Probe 31	62	80	94	87	1,9
Probe 32	64	70	91	81	1,7
Probe 33	66	72	91	82	1,8
Probe 34	68	71	77	74	1,6
Probe 35	70	72	41	57	1,2
Probe 36	72	64	96	80	1,7
Probe 37	74	61	44	53	1,1
Probe 38	76	32	49	41	0,9
Probe 39	78	49	46	48	1,0
Probe 40	80	54	69	62	1,3
Probe 41	82	42	30	36	0,8
Probe 42	84	43		43	0,9
Probe 43	86	49		49	1,1
Probe 44	88	46		46	1,0
Probe 45	90	49		49	1,1

Abbildung 39: Vergleich der Mutagramme von Standardstaubextrakten im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung (NIST SRM 1648)

Stamm	TA 98	S9-			SRM 1648
PK= Nitropyren 2,5µg/50µl		2258	2094	2176	46,8
NK=Dmso		45	48	47	1
HPLC-Fractionen	Zeit	1	2	Mittelwert	Induktion-
Probe 1	2	37	36	37	0,8
Probe 2	4	42	41	41,5	0,9
Probe 3	6	42	59	50,5	1,1
Probe 4	8	87	79	83	1,8
Probe 5	10	128	108	118	2,5
Probe 6	12	144	109	126,5	2,7
Probe 7	14	147	124	135,5	2,9
Probe 8	16	119	124	121,5	2,6
Probe 9	18	133	167	150	3,2
Probe 10	20	122	183	152,5	3,3
Probe 11	22	112	102	107	2,3
Probe 12	24	188	203	195,5	4,2
Probe 13	26	593	620	607	13,0
Probe 14	28	279	301	290	6,2
Probe 15	30	168	154	161	3,5
Probe 16	32	149	146	148	3,2
Probe 17	34	156	191	174	3,7
Probe 18	36	138	130	134	2,9
Probe 19	38	130	102	116	2,5
Probe 20	40	114	107	110,5	2,4
Probe 21	42	119	127	123	2,6
Probe 22	44	99	104	101,5	2,2
Probe 23	46	101	107	104	2,2
Probe 24	48	88	92	90	1,9
Probe 25	50	94	104	99	2,1
Probe 26	52	77	93	85	1,8
Probe 27	54	104	88	96	2,1
Probe 28	56	69	89	79	1,7
Probe 29	58	84	113	99	2,1
Probe 30	60	115	150	133	2,8
Probe 31	62	104	94	99	2,1
Probe 32	64	142	152	147	3,2
Probe 33	66	124	124	124	2,7
Probe 34	68	116	108	112	2,4
Probe 35	70	106	103	105	2,2
Probe 36	72	94	78	86	1,8
Probe 37	74	65	69	67	1,4
Probe 38	76	64	52	58	1,2
Probe 39	78	52	75	64	1,4
Probe 40	80	46	60	53	1,1
Probe 41	82	59	85	72	1,5
Probe 42	84	41		41	0,9
Probe 43	86	81		81	1,7
Probe 44	88	49		49	1,1
Probe 45	90	59		59	1,3

Abbildung 39: Vergleich der Mutagramme von Standardstaubextrakten im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung (NIST SRM 1649)

Stamm TA 98		S9-		SRM 1649	
PK= Nitropyren 2,5µg/50µl		2258	2094	2176	46,8
NK=Dmso		45	48	47	1
HPLC-Fractionen	Zeit	1	2	Mittelwert	Induktion
Probe 1	2	56	45	51	1,1
Probe 2	4	46	38	42	0,9
Probe 3	6	48	40	44	0,9
Probe 4	8	64	72	68	1,5
Probe 5	10	83	89	86	1,8
Probe 6	12	102	106	104	2,2
Probe 7	14	88	99	93,5	2,0
Probe 8	16	96	98	97	2,1
Probe 9	18	260	273	267	5,7
Probe 10	20	168	182	175	3,8
Probe 11	22	102	102	102	2,2
Probe 12	24	157	119	138	3,0
Probe 13	26	988	999	994	21,4
Probe 14	28	398	373	386	8,3
Probe 15	30	199	202	201	4,3
Probe 16	32	137	194	166	3,6
Probe 17	34	149	144	147	3,2
Probe 18	36	159	122	141	3,0
Probe 19	38	113	119	116	2,5
Probe 20	40	95	99	97	2,1
Probe 21	42	102	105	104	2,2
Probe 22	44	106	132	119	2,6
Probe 23	46	85	91	88	1,9
Probe 24	48	82	68	75	1,6
Probe 25	50	72	90	81	1,7
Probe 26	52	102	107	105	2,2
Probe 27	54	77	85	81	1,7
Probe 28	56	65	84	75	1,6
Probe 29	58	104	97	101	2,2
Probe 30	60	75	76	76	1,6
Probe 31	62	80	94	87	1,9
Probe 32	64	70	91	81	1,7
Probe 33	66	72	91	82	1,8
Probe 34	68	71	77	74	1,6
Probe 35	70	72	41	57	1,2
Probe 36	72	64	96	80	1,7
Probe 37	74	61	44	53	1,1
Probe 38	76	32	49	41	0,9
Probe 39	78	49	46	48	1,0
Probe 40	80	54	69	62	1,3
Probe 41	82	42	30	36	0,8
Probe 42	84	43		43	0,9
Probe 43	86	49		49	1,1
Probe 44	88	46		46	1,0
Probe 45	90	49		49	1,1

Abbildung 40: Vergleich der Mutagramme von Luftstaubextrakten im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung (Mannheim November 1996)

Stamm TA 98		S9-		Mannheim-Mitte 11/96	
PK= Nitropyren 2,5µg/50µl		2258	2094	2176	46,8
NK=Dms0		45	48	47	1
HPLC -Fraktionen	Zeit	1	2	Mittelwert	Induktion
Probe 1	2	32	36	34	0,7
Probe 2	4	43	28	36	0,8
Probe 3	6	52	73	63	1,3
Probe 4	8	93	106	100	2,1
Probe 5	10	185	221	203	4,4
Probe 6	12	126	159	143	3,1
Probe 7	14	139	136	138	3,0
Probe 8	16	134	127	131	2,8
Probe 9	18	119	139	129	2,8
Probe 10	20	130	152	141	3,0
Probe 11	22	108	121	115	2,5
Probe 12	24	144	143	144	3,1
Probe 13	26	132	174	153	3,3
Probe 14	28	145	129	137	2,9
Probe 15	30	118	95	107	2,3
Probe 16	32	122	162	142	3,1
Probe 17	34	133	146	140	3,0
Probe 18	36	135	137	136	2,9
Probe 19	38	139	204	172	3,7
Probe 20	40	116	112	114	2,5
Probe 21	42	88	93	91	1,9
Probe 22	44	81	89	85	1,8
Probe 23	46	78	96	87	1,9
Probe 24	48	85	80	83	1,8
Probe 25	50	64	73	69	1,5
Probe 26	52	64	72	68	1,5
Probe 27	54	64	74	69	1,5
Probe 28	56	78	69	74	1,6
Probe 29	58	56	65	61	1,3
Probe 30	60	63	88	76	1,6
Probe 31	62	58	59	59	1,3
Probe 32	64	72	63	68	1,5
Probe 33	66	60	56	58	1,2
Probe 34	68	82	77	80	1,7
Probe 35	70	64	80	72	1,5
Probe 36	72	71	54	63	1,3
Probe 37	74	48	69	59	1,3
Probe 38	76	86	87	87	1,9
Probe 39	78	78	67	73	1,6
Probe 40	80	67	73	70	1,5
Probe 41	82	72	86	79	1,7
Probe 42	84	55	64	60	1,3
Probe 43	86	55		55	1,2
Probe 44	88	45		45	1,0
Probe 45	90	58		58	1,2

Abbildung 40: Vergleich der Mutagramme von Luftstaubextrakten im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung (Mannheim Juli 1996)

Stamm TA 98		S9-		Mannheim-Mitte 7/96	
PK= Nitropyren 2,5µg/50µl		2258	2094	2176	46,8
NK=Dmso		45	48	47	1
HPLC-Fractionen	Zeit	1	2	Mittelwert	Induktion
Probe 1	2	37	39	38	0,8
Probe 2	4	48	42	45	1,0
Probe 3	6	47	58	53	1,1
Probe 4	8	64	73	69	1,5
Probe 5	10	140	172	156	3,4
Probe 6	12	137	148	143	3,1
Probe 7	14	102	91	97	2,1
Probe 8	16	114	115	115	2,5
Probe 9	18	124	131	128	2,7
Probe 10	20	132	119	126	2,7
Probe 11	22	110	100	105	2,3
Probe 12	24	119	120	120	2,6
Probe 13	26	206	200	203	4,4
Probe 14	28	174	163	169	3,6
Probe 15	30	104	115	110	2,4
Probe 16	32	130	123	127	2,7
Probe 17	34	119	140	130	2,8
Probe 18	36	107	104	106	2,3
Probe 19	38	110	97	104	2,2
Probe 20	40	77	84	81	1,7
Probe 21	42	132	116	124	2,7
Probe 22	44	92	87	90	1,9
Probe 23	46	91	98	95	2,0
Probe 24	48	74	78	76	1,6
Probe 25	50	74	70	72	1,5
Probe 26	52	77	84	81	1,7
Probe 27	54	61	79	70	1,5
Probe 28	56	96	90	93	2,0
Probe 29	58	52	48	50	1,1
Probe 30	60	55	75	65	1,4
Probe 31	62	68	65	67	1,4
Probe 32	64	90	98	94	2,0
Probe 33	66	67	79	73	1,6
Probe 34	68	44	67	56	1,2
Probe 35	70	92	67	80	1,7
Probe 36	72	51	56	54	1,2
Probe 37	74	57	64	61	1,3
Probe 38	76	55	73	64	1,4
Probe 39	78	54	78	66	1,4
Probe 40	80	60	66	63	1,4
Probe 41	82	51	69	60	1,3
Probe 42	84	52	31	42	0,9
Probe 43	86	59		59	1,3
Probe 44	88	44		44	0,9
Probe 45	90	55		55	1,2

Abbildung 42: Vergleich der Mutagramme von Luftstaubextrakten unterschiedlicher Herkunft aus der Routineprobenahme

Stamm TA 98					
Probe/Verduennung					
PK=Nitropyren 2,5µg/50µl		2468	68,6		
NK=DMSO		36	1		
HPLC-Fraktionen			Induktions	HPLC-Fraktionen	
Freiburg Mitte 2/96(100µl)			faktor	Mannheim Mitte 2/96(100µl)	
Probe 1		84	2,3	Probe 1	68
Probe 2		105	2,9	Probe 2	54
Probe 3		112	3,1	Probe 3	59
Probe 4		110	3,1	Probe 4	66
Probe 5		89	2,5	Probe 5	55
Probe 6		86	2,4	Probe 6	64
Probe 7		101	2,8	Probe 7	65
Probe 8		82	2,3	Probe 8	48
Probe 9		177	4,9	Probe 9	53
Probe 10		89	2,5	Probe 10	47
Probe 11		86	2,4	Probe 11	60
Probe 12		121	3,4	Probe 12	64
Probe 13		164	4,6	Probe 13	52
Probe 14		149	4,1	Probe 14	42
Probe 15		128	3,6	Probe 15	36
Probe 16		97	2,7	Probe 16	72
Probe 17		128	3,6	Probe 17	66
Probe 18		114	3,2	Probe 18	65
Probe 19		109	3,0	Probe 19	36
Probe 20		122	3,4	Probe 20	43
HPLC-Fraktionen			Induktions	HPLC-Fraktionen	
Mannheim Mitte 5/96(100µl)			faktor	VEP (100µl)	
Probe 1		48	1,3	Probe 1	37
Probe 2		59	1,6	Probe 2	39
Probe 3		55	1,5	Probe 3	65
Probe 4		44	1,2	Probe 4	65
Probe 5		67	1,9	Probe 5	40
Probe 6		36	1,0	Probe 6	44
Probe 7		43	1,2	Probe 7	45
Probe 8		87	2,4	Probe 8	48
Probe 9		132	3,7	Probe 9	49
Probe 10		192	5,3	Probe 10	73
Probe 11		142	3,9	Probe 11	65
Probe 12		144	4,0	Probe 12	56
Probe 13		219	6,1	Probe 13	51
Probe 14		193	5,4	Probe 14	56
Probe 15		159	4,4	Probe 15	54
Probe 16		165	4,6	Probe 16	50
Probe 17		160	4,4	Probe 17	53
Probe 18		61	1,7	Probe 18	44
Probe 19		99	2,8	Probe 19	51
Probe 20		100	2,8	Probe 20	39

Abbildung 44: Mutagramm für die Fraktion der „neutralen Verbindungen“ und der Fraktion der „starken Säuren“ im Stamm TA98 ohne metabolische Aktivierung

Ames-Test

Testlösungsmittel: DMSO

PK (1-NP) 5µg/50µl

NK (DMSO)

3000

64

Neutral Fraktion über HPLC Stamm TA 98-

Material

SRM1649

Zeit	Gesamtextrakt	Induktion	Neutralfraktion	Induktion
2	69	1,08	61	0,95
4	61	0,95	72	1,13
6	61	0,95	62	0,97
8	69	1,08	69	1,08
10	73	1,14	89	1,39
12	79	1,23	74	1,16
14	130	2,03	124	1,94
16	113	1,77	95	1,48
18	116	1,81	124	1,94
20	117	1,83	151	2,36
22	240	3,75	125	1,95
24	149	2,33	148	2,31
26	122	1,91	107	1,67
28	446	6,97	303	4,73
30	261	4,08	193	3,02
32	226	3,53	152	2,38
34	178	2,78	100	1,56
36	165	2,58	128	2,00
38	131	2,05	125	1,95
40	231	3,61	102	1,59
42	149	2,33	99	1,55
44	141	2,20	89	1,39
46	110	1,72	83	1,30
48	140	2,19	72	1,13
50	131	2,05	91	1,42
52	111	1,73	87	1,36
54	95	1,48	77	1,20
56	99	1,55	91	1,42
58	111	1,73	76	1,19
60	117	1,83	76	1,19
62	86	1,34	81	1,27
64	228	3,56	80	1,25
66	103	1,61	73	1,14
68	106	1,66	67	1,05
70	101	1,58	75	1,17
72	102	1,59	66	1,03
74	81	1,27	77	1,20
76	91	1,42	84	1,31
78	91	1,42	79	1,23
80	90	1,41	73	1,14
82	92	1,44	57	0,89
84	93	1,45	80	1,25
86	95	1,48	74	1,16
88	88	1,38	80	1,25
90	94	1,47	78	1,22

Abbildung 45: Vergleich der Mutagramme von methyliertem und unmethyliertem NIST SRM1649 Luftstaubextrakt im Bereich zwischen 20-35 Minuten (methyliert mit Diazomethan)

Stamm	TA 98	S9-	HPLC-Fractionen SRM 1649 methyliert			
Probe/Verduennung						
PK= Nitropyren 2,5µg/50µl			2827	2916	2872	110,4
NK=Dms0			29	23	26	1
Proben	Zeit [min]	Platte 1	Platte 2	Mittelwert	Induktion	
Probe 1	20	50	60	55	2,1	
Probe 2	20,5	38	37	38	1,4	
Probe 3	21	50	51	51	1,9	
Probe 4	21,5	43	45	44	1,7	
Probe 5	22	37	51	44	1,7	
Probe 6	22,5	52	57	55	2,1	
Probe 7	23	50	43	47	1,8	
Probe 8	23,5	46	59	53	2,0	
Probe 9	24	54	38	46	1,8	
Probe 10	24,5	54	46	50	1,9	
Probe 11	25	57	60	59	2,3	
Probe 12	25,5	45	37	41	1,6	
Probe 13	26	30	37	34	1,3	
Probe 14	26,5	40	36	38	1,5	
Probe 15	27	39	38	39	1,5	
Probe 16	27,5	50	40	45	1,7	
Probe 17	28	52	51	52	2,0	
Probe 18	28,5	45	46	46	1,8	
Probe 19	29	80	75	78	3,0	
Probe 20	29,5	69	79	74	2,8	
Probe 21	30	60	74	67	2,6	
Probe 22	30,5	74	57	66	2,5	
Probe 23	31	50	53	52	2,0	
Probe 24	31,5	57	55	56	2,2	
Probe 25	32	54	52	53	2,0	
Probe 26	32,5	52	61	57	2,2	
Probe 27	33	41	38	40	1,5	
Probe 28	33,5	52	52	52	2,0	
Probe 29	34	53	50	52	2,0	
Probe 30	34,5	40	52	46	1,8	
Aceton Blindwert		26	26	26	1,0	

Abbildung 45: Vergleich der Mutagramme von methyliertem und unmethyliertem NIST SRM1649 Luftstaubextrakt im Bereich zwischen 20-35 Minuten (unmethylierter Extrakt)

Stamm	TA 98	S9-	HPLC-Fraktionen SRM 1649 unmethyliert		
Probe/Verduennung					
PK= Nitropyren 2,5µg/50µl		2827	2916	2872	110,4
NK=Dmso		29	23	26	1
Proben	Zeit [min]	Platte 1	Platte 2	Mittelwert	Induktion
Probe 1	20	56		56	2,2
Probe 2	20,5	78		78	3,0
Probe 3	21	55		55	2,1
Probe 4	21,5	73		73	2,8
Probe 5	22	57		57	2,2
Probe 6	22,5	43		43	1,7
Probe 7	23	61		61	2,3
Probe 8	23,5	52		52	2,0
Probe 9	24	52		52	2,0
Probe 10	24,5	54		54	2,1
Probe 11	25	54		54	2,1
Probe 12	25,5	43		43	1,7
Probe 13	26	29		29	1,1
Probe 14	26,5	44		44	1,7
Probe 15	27	43		43	1,7
Probe 16	27,5	49		49	1,9
Probe 17	28	67		67	2,6
Probe 18	28,5	82		82	3,2
Probe 19	29	123		123	4,7
Probe 20	29,5	100		100	3,8
Probe 21	30	102		102	3,9
Probe 22	30,5	65		65	2,5
Probe 23	31	57		57	2,2
Probe 24	31,5	57	70	64	2,4
Probe 25	32	67	68	68	2,6
Probe 26	32,5	85	60	73	2,8
Probe 27	33	70	48	59	2,3
Probe 28	33,5	51	66	59	2,3
Probe 29	34	49	47	48	1,8
Probe 30	34,5	52	46	49	1,9
Aceton Blindwert		30	35	32,5	1,3

Abbildung 46: Vergleich von zwei Mutagrammen der gleichen Probe (TA98 mit / ohne metabolische Aktivierung)

DMSO (NK) 54 TA98+
 DMSO (NK) 33 TA98-

Zeit [min]	TA98+		TA98-	
	Revertanten	Induktion	Revertanten	Induktion
2	57	1,1	40	1,2
4	55	1,0	38	1,2
6	67	1,2	54	1,6
8	105	1,9	65	2,0
10	167	3,1	82	2,5
12	74	1,4	96	2,9
14	82	1,5	84	2,5
16	79	1,5	92	2,8
18	74	1,4	81	2,5
20	71	1,3	98	3,0
22	62	1,1	84	2,5
24	66	1,2	91	2,8
26	80	1,5	270	8,2
28	64	1,2	115	3,5
30	50	0,9	93	2,8
32	74	1,4	88	2,7
34	102	1,9	94	2,8
36	78	1,4	107	3,2
38	67	1,2	99	3,0
40	66	1,2	117	3,5
42	79	1,5	99	3,0
44	76	1,4	78	2,4
46	70	1,3	53	1,6
48	82	1,5	94	2,8
50	66	1,2	72	2,2
52	60	1,1	71	2,2
54	74	1,4	60	1,8
56	61	1,1	76	2,3
58	68	1,3	72	2,2
60	75	1,4	70	2,1
62	67	1,2	66	2,0
64	75	1,4	71	2,2
66	83	1,5	70	2,1
68	77	1,4	58	1,8
70	82	1,5	62	1,9
72	73	1,4	50	1,5
74	66	1,2	43	1,3
76	63	1,2	60	1,8
78	56	1,0	50	1,5
80	60	1,1	36	1,1
82	59	1,1	51	1,5
84	49	0,9	48	1,5
86	45	0,8	53	1,6
88	55	1,0	39	1,2
90	56	1,0	47	1,4

Abbildung 60: Mutagramm und HPLC-Chromatogramm bei Fluoreszenzdetektion von NIST SRM1649 Extrakt

NK DMSO

42

Proben-Nr	Zeit [min]	Revertanten TA98-	Induktion
1	0,5	45	1,1
2	1	31	0,7
3	1,5	43	1,0
4	2	48	1,1
5	2,5	49	1,2
6	3	46	1,1
7	3,5	42	1,0
8	4	39	0,9
9	4,5	37	0,9
10	5	53	1,3
11	5,5	51	1,2
12	6	47	1,1
13	6,5	55	1,3
14	7	58	1,4
15	7,5	68	1,6
16	8	91	2,2
17	8,5	88	2,1
18	9	103	2,5
19	9,5	67	1,6
20	10	159	3,8
21	10,5	133	3,2
22	11	141	3,4
23	11,5	90	2,1
24	12	130	3,1
25	12,5	98	2,3
26	13	139	3,3
27	13,5	133	3,2
28	14	109	2,6
29	14,5	101	2,4
30	15	102	2,4
31	15,5	191	4,5
32	16	188	4,5
33	16,5	137	3,3
34	17	237	5,6
35	17,5	102	2,4
36	18	361	8,6
37	18,5	202	4,8
38	19	191	4,5
39	19,5	172	4,1
40	20	141	3,4
41	20,5	141	3,4
42	21	124	3,0
43	21,5	145	3,5
44	22	175	4,2
45	22,5	172	4,1
46	23	164	3,9
47	23,5	140	3,3
48	24	667	15,9

Proben-Nr	Zeit [min]	Revertanten TA98-	Induktion
49	24,5	983	23,4
50	25	358	8,5
51	25,5	614	14,6
52	26	1321	31,5
53	26,5	1127	26,8
54	27	455	10,8
55	27,5	304	7,2
56	28	303	7,2
57	28,5	245	5,8
58	29	262	6,2
59	29,5	233	5,5
60	30	211	5,0
61	30,5	258	6,1
62	31	194	4,6
63	31,5	217	5,2
64	32	203	4,8
65	32,5	226	5,4
66	33	320	7,6
67	33,5	299	7,1
68	34	234	5,6
69	34,5	218	5,2
70	35	207	4,9
71	35,5	183	4,4
72	36	247	5,9
73	36,5	189	4,5
74	37	161	3,8
75	37,5	179	4,3
76	38	199	4,7
77	38,5	195	4,6
78	39	180	4,3
79	39,5	159	3,8
80	40	171	4,1
81	40,5	140	3,3
82	41	168	4,0
83	41,5	207	4,9
84	42	187	4,5
85	42,5	182	4,3
86	43	162	3,9
87	43,5	141	3,4
88	44	163	3,9
89	44,5	162	3,9
90	45	159	3,8
91	45,5	171	4,1
92	46	180	4,3
93	46,5	145	3,5
94	47	176	4,2
95	47,5	170	4,0
96	48	168	4,0
97	48,5	173	4,1
98	49	148	3,5
99	49,5	161	3,8
100	50	155	3,7

8 Literatur

- 1 D. L. Fox, *Anal. Chem.* 65 (1992) 156R-170R
- 2 R. E. Clement, *Anal. Chem.* 67 (1995) 221R-255R
- 3 L. D. Betowski; W. Winnik; A. B. Marcus, S. M. Pyle, *Int. J. Mass Spectrometry and Ion Processes* 173 (1998) 27-39
- 4 K. Ballschmiter, *Angew. Chem.* 104(5) (1992) 501-528
- 5 J. Arey, W. P. Harger, D. Helmig, R. Atkinson, *Mutat. Res.* 281 (1992) 67-76
- 6 I. Eide, H. G. Johnsen, *Env. Health Perspect.* 106(6) (1998) 1373-1376
- 7 M. D. Waters, H. F. Stack, M. A. Jackson, *Mutat. Res.* 437(1) (1999) 21-49
- 8 L. Erdinger, K. Höpker, I. Dörr I., M. Dürr, M. Fried, *Veröff. PAÖ, Band 25* (1997) 1-215
- 9 Environmental Health Criteria, „Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons“ 202 (1998) 840 Seiten Monographie
- 10 M. Fried, Diplomarbeit 1994, Hygiene-Institut der Universität Heidelberg
- 11 A.J. Grosovsky, J.C. Sasaki, J. Arey, D.A. Eastmond, K.K. Parks, R. Atkinson, *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 84 (1999) 1-22, 23.7
- 12 B. D. Crittenden, R. Long: "Carcinogenesis - A Comprehensive Survey" Vol. 1, Raven, New York 1976
- 13 G. M. Badget, R. G. Buttery, R. W. L. Kimber, G. F. Lewis, A. G. Moritz, I. M. Napier, *J. Chem. Soc.* (1958) 2449
- 14 N.T.K. Oanh, L.B. Reutergardh, N.T. Dung, *Environ. Sci. Technol.* 33(16) (1999) 2703-2709
- 15 D. J. T. Smith, R. M. Harrison, *Atmos. Environ.* 30(14) (1995) 2513-2525
- 16 C.Y. Kuo, Y. W. Cheng, C.Y. Chen, H. Lee, *Environ. Res.* 78(1) (1998) 43-49
- 17 T. Otha, M. Watanabe-Akunuma, S. Tokishita, H. Yamagata, *Mutat. Res.* 440(1) (1999) 59-74
- 18 B. Binokova, D. Vesely, D. Vesela, R. Jelinek, R. J. Sram, *Mutat. Res.* 440(1) (1999) 45-48
- 19 M. Jang, S. R. McDow, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 2654-2660
- 20 J. Sasaki, J. Arey, W. P. Harger, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 1324-1335
- 21 K. Kawamura, I. R. Kaplan, *Environ. Sci. Technol.* 21 (1987) 105-110
- 22 H. E. Jeffries, J. Yu, L. Bartolotti, „Theoretical and Analytical Advances in Understanding Aromatic Atmospheric Oxidation Mechanisms“
- 23 T. E. Kleindienst, D. F. Smith, E. E. Hudgens, R. F. Snow, *Atmos. Environ.* 26A(16) (1992) 3039-3053
- 24 Z. Fan, D. Chen, P. Birla, R. M. Kamens, *Atmos. Environ.* 29(10) (1995) 1171-1181
- 25 Z. Fan, R. M. Kamens, J. Zhang, J. Hu, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 2821-2827

- 26 E. S. C. Kwok, W. P. Harger, J. Arey, R. Atkinson, *Environ. Sci. Technol.*, 28(3) (1994), 521-527
- 27 R. Atkinson, J. Arey, *Environ Health Perspect.*, 102(Suppl 4) (1994) 117-126
- 28 D. Schuetzle, T. L. Riley, T. J. Prater, *Anal. Chem.* 54 (1982) 265.271
- 29 N. K. Wilson, T. R. McCurdy, J. C. Chuang, *Atmos. Environ.* 29(19) (1995) 2575-2584
- 30 R. M. Kamens, J. Guo, Z. Guo, S. R. McDow, *Atmos. Environ.* 24A(5) (1990) 1161-1173
- 31 J. Arey, B. Zielinska, R. Atkinson, A. M. Winer, T. Ramdahl, J. N. Pitts Jr., *Atmos. Environ.* 20 (1987) 2339-2345
- 32 http://prfdec.natur.cuni.cz/~analchem/www/LAB113/npah_a.htm
- 33 C. Venkataraman, J. M. Lyons, S. K. Friedlander, *Environ. Sci. Technol.* 28 (1995) 555-562
- 34 G. Mamantov, E.L. Wehry, „Sorption and chemical transformation of PAH's on coal fly ash“, *GRA&I* 03 (1996)
- 35 W. Behnke, W. Holländer, W. Koch, F. Nolting, C. Zetzsch, *Atmos. Environ.* 22(6) (1988) 1113-1120
- 36 G. Mamantov, E.L. Wehry, „Sorption and chemical transformation of PAH's on coal fly ash“ *Govt Reports Announcements & Index (GRA&I)*, Issue 03. (1996)
- 37 D. Grosjean, K. Fung, J. Harrison, *Environ. Sci. Technol.* 17 (1983) 673-679
- 38 R. M. Kamens, Z. Guo, J. N. Fulcher, D. A. Bell, *Environ. Sci. Technol.* 22 (1988) 103-106
- 39 Z. Fan, R. M. Kamens, J. Hu, J. Zhang, S. McDow, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 1358-1364
- 40 A. Koizume, N. Saitoh, T. Suzuki, S. Kamiyama, *Arch. Env. Health* 49(2) (1994) 87
- 41 D. Helmig, J. Arey, W. Harger, R. Atkinson, J. Lopez-Cancio, *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992) 2207-2213
- 42 T. Enya, H. Suzuki, T. Watanabe, T. Hirayama, Y. Hisamatsu, *Environ. Sci. Technol.* 31(10) (1997) 2772-2776
- 43 T. Enya, H. Suzuki, Y. Hisamatsu, *Synthesis* 11 (1997) 1273-1276
- 44 T. Enya, H. Suzuki, Y. Hisamatsu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 71(9) (1998) 2221-2228
- 45 B. Ames, J. Mc Cann, E. Yamasaki, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1975) 2281-2285
- 46 D. Maron, B. Ames, „Revised methods for the salmonella mutagenicity test“, *Handbook of mutagenicity test procedures* (1984) Elsevier
- 47 S. Kevekordes, J. Porziy, T. Gebel, H. Dunkelberg, *ZentralBl. Hygiene und Umweltmedizin* 200(5-6) (1998) 531-541
- 48 L. R. Brooks, T. J. Hughes, L. D. Claxton, B. Austeren, R. Brenner, F. Kremer, *Environ. Health Perspect.* 106(6) (1998) 1435-1440
- 49 T.E. Graedel, D. T. Hawkins, L. D. Claxton, „Atmospheric Chemical Compounds Sources, Occurrence, and Bioassay“ (1986) Academic Press

- 50 P. Gee, D. M. Maron, B. N. Ames, Proc. Natl. Acad. Sci., 91 (1994) 11606-11610
- 51 K. Randerath, M. V. Reddy, R.C. Gupta, Proc. Natl. Acad. Sci. 78 (1981) 6126-6129
- 52 K. Randerath, P. Sriram, B. Moorthy, J.P. Aston, R.A. Baan, P.T. van den Berg, E.D. Booth, W.P. Watson, Chemico-Biological Interactions 110(1-2) (1998) 85-102
- 53 H. H. Schmeiser, C. A. Bieler, BIOForum 4 (1997) 144-148
- 54 J. Lewtas, J. Chuang, M. Nishioka, B. Petersen, Intern. J. Environ. Anal. Chem. 39 (1990) 245-256
- 55 R.C. Garner, C.A. Stanton, C.N. Martin, F.L. Chow, W. Thomas, D. Hubner, R. Herrmann, Environ. Mutat. 8 (1986) 1986
- 56 Hannigan, MP; Cass, GR; Penman, BW; Crespi, CL; Lafleur, AL; Busby, WF; Thilly, WG; Simoneit, BRT, Environ. Sci. Technol. 32(22) (1998) 3502-3514
- 57 W. P. Harger, J. Arey, R. Atkinson, Atmos. Environ. 26A(13) (1992) 2463-2466
- 58 D. J. Thompson, L. Brooks, M.G. Nishioka, J. Lewtas, R. B. Zweidinger, Intern. J. Environ. Anal. Chem. 53 (1993) 312-335
- 59 S.-W. Zhou, G.-Y. Ren, S.-Y. Yu, Atmos. Environ. 23(4) (1989) 863-867
- 60 A. Sicherer-Roetman, M. Ramlal, C. E. Voogd, H.J.Th. Bloemen, Atmos. Environ. 22(12) (1988) 2803-2808
- 61 P. Fernandez, J. M. Bayona, J. Chromatogr. 625 (1992) 141-149
- 62 J. M. Bayona, M- Casellas, P. Fernandez, A. M. Solanas, J. Albaiges, Chemosphere 29(3) (1994) 441-450
- 63 D. M. DeMarini, M. L. Shelton, D. A. Bell, Environ. Mol. Mutagen. 24 (1994) 262-275
- 64 T. J. Hughes, J. Lewtas, L. D. Claxton, Mutat. Res. 391 (1997) 243-258
- 65 N. R. Khalili, P. A. Scheff, T. M. Holsen, Atmos. Environ. 29(4) (1995) 533-542
- 66 W. F. Rogge, L. M. Hildemann, M. A. Mazurek, G. R. Cass, Environ. Sci. Technol. 27 (1993) 636-651
- 67 C. M. Sparacino, S. E. Frazier, M. G. Nishioka, J. Lewtas, Intern. J. Environ. Anal. Chem. 39 (1990) 257-270
- 68 Durant, JL; Lafleur, AL; Plummer, EF; Taghizadeh, K; Busby, WF; Thilly, WG, Environ. Sci. Technol. 32(13) (1998) 1894-1906
- 69 R. Sempere, K. Kawamura, Atmos. Environ. 28(3) (1994) 449-459
- 70 T.A. Rocha, H. Horvath, J.A. Oliveira, Science of the Total Environment. 236(1-3) (1999) 231-236
- 71 L. A. Gundel, L. M. Daisey, L. R. F. de Carvalho, N. Y. Kado, D. Schuetzle, Environ. Sci. Technol. 27 (1993) 2112-2119
- 72 <http://www.uvm.baden-wuerttemberg.de/lfu/abt3/luftdat.htm>
- 73 L. R. Snyder, J. Chromatogr. 92 (1974) 223-230
- 74 Unger K. K., Weber E., „Handbuch der HPLC Teil 1“, GIT Verlag 1995
- 75 A.M. van den Braken, N. M. Spijker, J. Lugtenburg, J. Cornelisse, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 106 (1987) 628-640

- 76 A.M. van den Braken, C. Tintel, M. van't Zelfde, J. Lugtenburg, J. Cornelisse, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 106 (1987) 120-128
- 77 C. J. van Haeringen, N. F. Aten, J. Cornelisse, J. Lugtenburg, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 111 (1992) 335-344
- 78 J. Lewtas, J. Gallagher, IARC Sci Publ 104 (1990) 252-260
- 79 J. Lewtas, Environ. Health Persp. 100 (1993) 211-221
- 80 D. M. DeMarini, J. Lewtas, Toxicol. Environ. Chem. 49 (1995) 157-166
- 81 A. Kao, S. Friedlander, Environ. Sci. Technol. 29 (1995) 19-28
- 82 D. L. Poster, R. M. Hoff, J. E. Baker, Environ. Sci. Technol. 29 (1995) 1990-1997
- 83 A. S. Sideropoulos, S. Specht, Microbios. 77 (1994) 167-179
- 84 S. Monarca, R. Crebelli, D. Feretti, A. Zanardini, S. Fuselli, L. Filini, S. Resola, P.G. Bonardelli, G. Nardi, Sci. Total Environ. 205(2-3) (1997) 137-144
- 85 I. Dörr, „Untersuchungen zur Genotoxizität partikelgebundener organischer Luftschadstoffe“ (1997) Dissertation, Hygiene-Institut Heidelberg
- 86 B.A. Benner, Govt Reports Announcements & Index (GRA&I), Issue 14 (1999)
- 87 L. D. Claxton et al, Mutat. Res 276 (1992) 23
- 88 R. Scram et al., Environ. Health Perspec. 104 (1996) 699-713
- 89 E. Randerath, T.F. Danna, K. Randerath, Mut. Res. 268 (1992) 139-153
- 90 J.E. Gallagher, M.J. Kohan, M.H. George, J. Lewtas, Carcinogenesis 12 (1988) 1685-1691
- 91 K. Savela, M.J. Kohan, D. Walsh, F. Perera, K. Hemminki, J. Lewtas, Environ. Health Perspect. 104 Suppl.3 (1996) 687-690
- 92 J. Topinka, L.R. Schwarz, F. Kiefer, F.J. Wiebel, O. Gajdos, P. Vidova, L. Dobias, M. Fried, R. J. Sram, T. Wolff, Mutat. Res. 419(1-3) (1998) 91-105
- 93 C.A. Bieler, M. Wiessler, L. Erdinger, H. Suzuki, T. Enya, H.H. Schmeiser, Mutat. Res. 439(2) (1999) 307-311
- 94 L. Erdinger, K. Höpker, H.-G. Sonntag, 22nd Annual Meeting of the EEMS, Berlin, 1992
- 95 H. Lee, S. M. Law, S. T. Lin, Toxicol. Lett. 58(1) (1991) 59-67
- 96 G. Krishna, T. Ong, W.-J. Whong, J. Nath, Mutat. Res. 124 (1983), 112-120
- 97 G. Krishna, T. Ong, W.-J. Whong, J. Nath, Mutat. Res. 124 (1983), 121-128
- 98 R. Niessner, Environmental Analysis (1993) 3-18
- 99 W. Dehnen, N. Pitz, R. Tomingas, Cancer Lett. 4 (1977) 5-12
- 100 B.S. De Martinis, N.Y. Kado, L.R. de Carvalho, R. A. Okamoto, L.A. Gundel, Mutat. Res. 446(1) (1999) 83-94
- 101 H. J. Moriske, I. Block, H. Schleibinger, H. Rüden, Zentralbl. Bakt. Mikrob. Hyg. B. 181 (1985) 240-271
- 102 A. E. Legzdins, B. E. McCarry, C. H. Marvin, D. W. Bryant, Int. J. Env. Analyt. Chem. 60 (1995) 79-94

- 103 R. Barale, L. Giromini, S. Del-Ry, B. Barnini, M. Bulleri, I. Barraï, F. Valerio, M. Pala, J. He, *Environ. Health Perspect.* 102 Suppl 4 (1994) 67-73
- 104 D. M. DeMarini, M. L. Shelton, D. A. Bell, *Environ. Mol. Mutagen.* 24 (1994) 262-275
- 105 I. Dörr, „Chemische Charakterisierung und mutagene Aktivität partikelgebundener organischer Luftschadstoffe“ Diplomarbeit, Hygiene Institut und Physikalisch-Chemisches Institut der Universität Heidelberg 1994
- 106 W. Cautreel, K. van Cauwenberghe, *Atmos. Environ.* 10 (1976) 447-457
- 107 W. Cautreel, K. van Cauwenberghe, *J. Chromato.* 131 (1977) 253-264
- 108 E. Wauters, I. Lenelle, *Fresenius Environ. Bull.*, 8(9-10) (1999) 629-637
- 109 S. A. Wise, *Environ. Anal.* (1993) 403-446
- 110 S. A. Wise, B. A. Benner, S. N. Chester, L. R. Hilpert, C. R. Vogt W. E. May, *Anal. Chem.* 58 (1986) 3067-3077
- 111 K. P. Naikwadi, G. M. Charboneau, F. W. Karasek, R. E. Clement, *J. Chromato.* 371 (1987) 227-237
- 112 D.T.J. Smith, *Fresenius Environ. Bull.*, 8(9-10) (1999) 557-566
- 113 J. König, E. Balfanz, W. Funke, T. Romanowski, *Anal. Chem.* 55 (1983) 599-603
- 114 M. Niederer, *Environ. Sci. Poll. Res.* 5(4) (1998) 209-216
- 115 Y. Yokouchi, Y. Ambe, *Atmos. Environ.* 20(9) (1986) 1727-1734
- 116 G. Becker, A. Colmsjo, C. Ostman, *Environ. Sci. Technol.* 33(9) (1999) 1321-1327
- 117 H. Kataoka, K. Kijima, G. Maruo, *Bull. Environ. Contamin. & Toxicol* 60(1) (1998) 60-67
- 118 C. Bross, S. Springer, G. Sontag, *Deut. Lebensm. Rdsch.* 93(12) (1997) 384-386
- 119 H. Yoshino, K. Urano, *Sci. Tot. Environ.* 215(1-2) (1998) 41-49
- 120 UMEG, „Luftmessnetz des Landes Baden-Württemberg“ UMEG (Stand: 15.03.1996)